

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM *Felis catus domesticus* DE
ÁREA URBANA ENDÊMICA DA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

Sebastiana Adriana Pereira Sousa
Orientadora: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

GOIÂNIA
2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
 DE TESES E
 DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem resarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

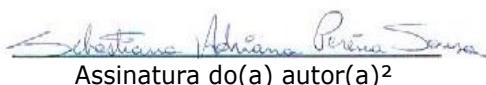
Nome completo do autor: Sebastiana Adriana Pereira Sousa

Título do trabalho: DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM *Felis catus domesticus* DE ÁREA URBANA ENDÊMICA DA REGIÃO NORTE DO BRASIL

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



 Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 15 /01/2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

SEBASTIANA ADRIANA PEREIRA SOUSA

**DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM *Felis catus domesticus* DE
ÁREA URBANA ENDÊMICA DA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle das doenças infecciosas dos animais

Orientadora:

Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme- EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Helcileia Dias Santos - EMVZ/UFT

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares - EVZ/UFG

GOIÂNIA
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sousa, Sebastiana Adriana Pereira

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE EM *Felis catus domesticus* DE ÁREA URBANA ENDÉMICA DA REGIÃO NORTE DO BRASIL

[manuscrito] / Sebastiana Adriana Pereira Sousa. - 2017.
21, 62 f., il.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme; co-orientadora Dra. Helcileia Dias Santos; co-orientador Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. amastigota. 2. anticorpo. 3. gato. 4. *Leishmania* spp.. 5. reação em cadeia pela polimerase. I. Jayme, Dra. Valéria de Sá, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **250** DE DEFESA DE TESE DE **DOUTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-
 2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
 3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Sebastiana Adriana Pereira**
 4 **Sousa**. Às **08h30min** do dia **15/12/2017**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-
 5 Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de
 6 Goiás, Campus II Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada
 7 para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-
 8 Graduando (a) **Sebastiana Adriana Pereira Sousa**, intitulada **“Diagnóstico de Leishmania spp.**
 9 **em felinos domésticos (Felis catus domesticus) de área urbana endêmica do Tocantins”**,
 10 apresentada para obtenção do **Título de Doutor em Ciência Animal**, junto à Área de
 11 Concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** desta Universidade. O
 12 Presidente da Comissão Julgadora **Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme**, iniciando os trabalhos,
 13 concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Sebastiana Adriana Pereira Sousa** para exposição em
 14 **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem
 15 sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo
 16 máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores
 17 Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em
 18 sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou**
 19 **Reprovado (a):**

20 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme
 21 Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta
 22 Profa. Dra. Samara Rocha Galvão
 23 Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto
 24 Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes
 25 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Sebastiana**
 26 **Adriana Pereira Sousa**, **habilitada** [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a))]
 27 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Aprovado

Aprovado

28 _____
 29 _____
 30 _____
 31 _____
 32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38

39

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

40 Diagnóstico de leishmaniose em Felis catus domésticos de
 41 área urbana endêmica da região Norte do Brasil

42

43

44

45

46

Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme**, lavrei a presente ata que, após
lida e achada conforme foi por todos assinada.

47

48 Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

49 Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta

50 Profa. Dra. Samara Rocha Galvão

51 Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto

52 Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes

Aos pesquisadores, profissionais e acadêmicos que, com esforço, dedicam-se ao estudo epidemiológico de doenças zoonóticas e não zoonóticas, e ao desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que contribuam não só para a preservação da saúde animal, mas principalmente para a segurança da vida humana.

AGRADECIMENTOS

Ao Supremo Criador, Rei da Eternidade, A Fonte da Verdade, nosso Senhor JEOVÁ, que me conhece minunciosamente e que me observa em todos os momentos da minha vida. A Ele eu agradeço por me criar, por me amar, por me apoiar e por me segurar com sua mão direita de justiça. Ele merece e sempre irá merecer toda a glória, toda a honra e o que há de melhor em nós! Muito obrigada JEOVÁ, por me amar tanto!!

Agradeço o imenso apoio recebido da minha mãe, Neuzelina. Obrigada mãe, por sempre estar ao meu lado... Obrigada por seu amor, pelas palavras de encorajamento, pelos conselhos... Saiba que sem sua ajuda eu não teria completado mais esta etapa!!

À minha congregação do coração: Jardim Pompéia. Sempre vou agradecer por tamanho amor e receptividade demonstrados para comigo! Agradeço a todos vocês por terem me acolhido de forma tão calorosa enquanto estive em Goiânia! Sem dúvidas posso falar que vivi muitos dos meus melhores dias com vocês!!

Gerlande e Terezinha, obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelos almoços, pelos conselhos valiosos... Obrigada pela terna amizade! Raíssa, obrigada pelo genuíno companheirismo, pelo encorajamento, pelas gargalhadas, digamos que “diferentes” (afinal, quem disse que não se pode extrapolar os padrões da seriedade as vezes ne??). Irmã Mônica, Maria Rodrigues, dona Fátima e Joana, muito obrigada por me acolherem em suas casas quando precisei... Agradeço não apenas por isso, mas principalmente pelo apoio e pelas palavras de incentivo!! Foram e são de muita importância para mim...

Também fazem parte de minha grande família a Daniela, que conquistou minha amizade com seu carinho, consideração e discrição; as irmãs Marcelinha e Mariana Brandão, as quais sempre mostraram consideração para comigo, além de compartilhar conselhos para meu crescimento; a minha irmã Ivonete que me presenteou com sua preciosa amizade; os queridos irmãos Augusto e Rebecca Lemes, que prestaram sua ajuda desde o início de tudo (muito obrigada pelas caronas, pelas conversas, dicas, e acima de tudo pela animação!!!); a dona Sônia, sempre tão bondosa e carinhosa...O meu muito obrigada sempre!!

Ao irmão Ilton, Cida, Jéssica, Marciana, irmão Sérgio, Iharinha, Geuber, Gilmar Júnior, Kairon, Nara e Gabi, muito obrigada pela amizade e pela ajuda, principalmente quando o assunto foi mudança... (Irmão Ilton quem o diga né!!!). Em especial, agradeço ainda às queridas pioneiras Zuleide e Keila por fazerem parte da minha trajetória, por terem compartilhado comigo todo seu conhecimento e por terem me dado tamanho apoio!!

Às amigas Monica Calixto, Hedylaine Nunes, Rosa Amaral, Priscila Carvalho, Marcela Andrade e Cirlene de Oliveira-Sobral agradeço pela sincera amizade, pelas palavras de incentivo, consolo e fortalecimento nos momentos em que precisei!! Muito obrigada! A amizade de vocês é preciosa para mim.

Agradeço o carinho dado pelos meus tios Silvia, Rita, Loreny, Tereza e Jairzinho. Às primas Eudina, Jaynara, Diva e Eudilene eu agradeço pelas injeções de ânimo e por terem mostrado seu exemplo quando o assunto é perseverança! Muito obrigada por fazerem parte dessa história!

Gostaria de agradecer a minha orientadora, professora Dra. Valéria de Sá Jayme pela sua orientação e acima de tudo por sua paciência, serenidade e bondade de coração!! Muito obrigada profa por ter contribuído para essa importante etapa da minha trajetória!

Dentre as muitas pessoas que colaboraram para que esse trabalho pudesse ser realizado, dedico um agradecimento especial à professora Dra. Helcileia Dias Santos. Profa., devo dizer que sem sua ajuda eu não teria conseguido. Foi sob sua orientação, sua paciência, dedicação, e bom senso que pude desenvolver as várias etapas que compõem este trabalho. Muito obrigada profa, não só pela orientação em sentido acadêmico, mas também pelas orientações para a vida!!

O meu agradecimento especial se estende aos meus colegas veterinários e amigos Samara Rocha Galvão e Taiã Mairon Peixoto Ribeiro do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal do Tocantins. Muito obrigada Samara e Taiã por toda a ajuda!! E que ajuda!!! Digo que vocês foram mais que essenciais durante todo o período experimental... Obrigada Samara, por ter me ajudado tanto no manejo dos animais, necropsias e atividades laboratoriais, como em sentido pessoal... Obrigada pela amizade, pela sinceridade, pelas caronas, pela animação, pelos conselhos para a vida!! Ao Taiã agradeço não só por toda a ajuda em sentido braçal, mas também por sua alegria, incentivo e amizade! À vocês, os meus sinceros agradecimentos!

Agradeço à toda a equipe do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araguaína-TO, em especial aos Médicos Veterinários Monaliza Souto, Admilson Modesto e Luzia Araújo, por terem aberto suas portas e tornar possível as coletas de material biológico de parte dos felinos utilizados nessa pesquisa. Agradeço o auxílio e disposição das médicas veterinárias Aline Marinho, Cristiane Carvalho e Adriana Carreira. Muito obrigada pelo apoio de todos!!!

Agradeço a professora Dra. Silvia Minharro Barbosa, a técnica Cristiane Alves e a Doutoranda Karina Almeida do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, por terem contribuído grandemente para o meu conhecimento no que diz

respeito às análises moleculares. Professora Silvia, muito obrigada pela orientação! Cristiane, agradeço imensamente por ter me ajudado tanto na parte prática!! Obrigada a todas!

Ao professor Dr. Guido Fontgalland, à Dra. Adriana Marques, Dr. Osvaldo Neto e ao técnico Winder de Oliveira do Laboratório de Biologia Molecular da Escola e Veterinária e Zootecnia da UFG eu agradeço por toda a ajuda! Obrigada professor Guido, por sua disponibilidade, por sua paciência, e por me orientar em parte das minhas análises. À Adriana, ao Osvaldo e ao Winder eu agradeço por terem se colocado à disposição para auxiliar tanto em sentido teórico como prático. Obrigada a Todos!!

À Professora Dra. Miriam Leandro Dorta, à mestrandra Cálita Marques e à técnica Natália Brandão, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP-UFG), eu agradeço por terem contribuído grandemente para a realização deste trabalho. Agradeço por todo o treinamento disponibilizado e pelo fornecimento de material biológico, como cepas referência de *Leishmania* spp. Muito obrigada pela sincera ajuda!!

À Claudailsa Maria, à Professora Dra. Elda Dias e aos discentes Ronaira, Aurélio, Giovana, Kayla, Ruth, Gisele, Dillana, Suiane, Simone, Géssica, Sanderleia, Cassio, Herbert, Lhayza, Vanessa e Antônio eu agradeço toda a ajuda prestada, tanto na parte de coleta como no processamento das amostras. O meu muito obrigada!!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado junto ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás (UFG), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Tocantins, e à Universidade Federal do Tocantins (UFT)/Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (Propesq).

Por fim, dedico um agradecimento especial a todos os animais, seres criados com amor e que refletem tal amor pela capacidade de dar, mesmo quando não recebem nada em troca. Agradeço aos animais, pelos quais multipliquei meu carinho e respeito e sem os quais a concretização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada!!!

“Ouvi falar a teu respeito,
Mas agora te vejo com os meus próprios
olhos.” Jó 42:5

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Agente etiológico.....	24
2.2 Leishmaniose felina.....	26
2.3 Métodos de diagnóstico.....	31
2.3.1 Diretos.....	31
2.3.2 Indiretos.....	32
2.3.3 Moleculares.....	34
2.4 Tratamento, profilaxia e controle.....	37
3. REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2- ANTICORPOS ANTI-<i>Leishmania</i> spp. EM <i>Felis catus domesticus</i>	
DE ÁREA ENDÊMICA URBANA NO NORTE DO	
BRASIL.....	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4. CONCLUSÃO.....	59
5. REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO 3- USO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE E DO	
MÉTODO PARASITOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO	
DE LEISHMANIOSE VISCERAL <i>Felis catus domesticus</i> DE	
ÁREA ENDÊMICA URBANA.....	64
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4. CONCLUSÃO.....	76
5. REFERÊNCIAS.....	76

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
ANEXO A - Ficha de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	
da Universidade Federal do Tocantins.....	83

LISTA DE FIGURAS

<p>FIGURA 1- Perfil espaço temporal de casos humanos de leishmaniose visceral no estado do Tocantins de 2012 a 2016. Observar distribuição de casos no município de Araguaína (coloração marrom escura). Fonte: Adaptado de Afonso et al.....</p> <p>FIGURA 2 - Felinos com leishmaniose tegumentar americana causada por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>. Visualizar: (A) úlcera cutânea no plano nasal (seta); (B) lesão característica na mucosa nasal (seta). Fonte: Adaptado de Schubach et al.....</p> <p>FIGURA 3 - Felino infectado por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>. Visualizar (A): Lesão nodular nasal de aproximadamente um cm de diâmetro (seta); (B): Protuberâncias nodulares na borda do pavilhão auricular. Fonte: Adaptado de Rougeron et al.....</p> <p>FIGURA 4- Felinos com leishmaniose visceral causada por <i>L. chagasi</i>. Visualizar (A): região cervical dorsal apresentando alopecia, eritema e exsudação; (B): pavilhão auricular esquerdo evidenciando ulceração e formação de crostas hemorrágicas. Fonte: Adaptado de Vides et al.....</p> <p>FIGURA 5- Felino com leishmaniose visceral causada por <i>L (L.) infantum chagasi</i>. Observar magresa e a presença de lesões cutâneas nas regiões oculares, nos pavilhões auricularres e nas extremidades dos membros pélvicos e torácicos.....</p> <p>FIGURA 6- Presença de <i>Lutzomyia longipalpis</i> no estado do Tocantins. Fonte: Adaptado de Afonso et al.....</p> <p>FIGURA 7 - Demonstração visual de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. em amostras teciduais de felino doméstico (G 96) proveniente do município de Araguaína-Tocantins. Observar protozoários (setas) em amostras de: (A) Linfonodo poplíteo direito; (B) Linfonodo poplíteo esquerdo; (C) Baço; (D) Fígado. (HE, 100X, escala = 6 µm).....</p> <p>FIGURA 8- Reação em Cadeia pela Polimerase para <i>L. infantum</i> em amostras biológicas de felinos domésticos testadas com o par de primer MC1 e MC2. Observar: (M) Marcador peso molecular de 100pb; (1) controle positivo - cepa MHOM/BR/74/PP75; (2) baço G10; (3) baço G56; (4)</p>	<p>23</p> <p>29</p> <p>30</p> <p>30</p> <p>31</p> <p>50</p> <p>70</p>
--	---

sangue G56; (5) medula G56; (6) Sangue G77; (7) Controle negativo - água deionizada. Verificar a positividade de todas as amostras testadas (poços 2 ao 6) pela distribuição das bandas a uma altura de 447pb em gel de agarose 1,5%.....	71
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Relação de títulos de títulos de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. obtidos de felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins, submetidos à RIFI no período de 2015 a 2017..... TABELA 2 - Registros epidemiológicos da presença de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. em felinos do Brasil nos últimos nove anos..... TABELA 3 - Fatores relacionados à infecção por <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> em felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins, no período de 2015 a 2017..... TABELA 4- Sinais clínicos relacionados à infecção por <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> em felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins, no período de 2015 a 2017..... TABELA 5- Registros epidemiológicos da espécie <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> diagnosticadas em felinos domésticos por meio de métodos moleculares no período 2007-2017..... TABELA 6- Fatores de associação à infecção por <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i> em felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins..... 	53 55 56 58 72 75
---	----------------------------------

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Sinais clínicos em gatos infectados por diferentes espécies de <i>Leishmania</i> spp.....	27
QUADRO 2 - Relação de primers recentemente utilizados no diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp. por meio da reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR).....	35
QUADRO 3- Endonucleases de restrição utilizadas no estudo do polimorfismo de fragmentos obtidos por meio da restrição dos produtos da PCR (RFLP-PCR) para a diferenciação de espécies de <i>Leishmania</i> spp.....	36
QUADRO 4 - Felinos domésticos provenientes de Araguaína, Tocantins, positivos para <i>Leishmania</i> spp., segundo o método de diagnóstico utilizado, tipos de tecido parasitado e sinais clínicos observados.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
CCZ	Centro de controle de zoonoses
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAT	Teste de aglutinação direta (<i>Direct Agglutination test</i>)
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP®	<i>Dual Path Platform</i> , Bio-Manguinhos/FIOCRUZ
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
EMVZ	Escola de Medicina Veterinária e zootecnia
FCoV	Coronavírus Felino
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
LC	Leishmaniose cutânea
LDPK	Leishmaniose dermal pós kala-Azar
LF	Leishmaniose felina
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVF	Leishmaniose visceral felina
IC	Intervalo de confiança
IMIQ	Imunoistoquímica
ITS	Espaçador interno transcrito (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
kDNA	Ácido desoxirribonucleico presente nos minicírculos do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> spp.
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde

NNN	Meio de cultura Novy-MacNeal-Nicolle
OIE	Organização para a Saúde Animal
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	Ácido ribonucléico ribossômico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RFLP-PCR	Reação em cadeia pela polimerase – Polimorfismo de Fragmento de Restrição (<i>Polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SSU	Menor subunidade (<i>Small-subunit</i>)
TRIs	Testes rápidos imunocromatográficos
UFT	Universidade Federal do Tocantins
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

RESUMO

Tendo em vista que o Tocantins mostra-se um dos principais estados brasileiros com maior número de casos de leishmaniose visceral humana e canina e que o gato pode atuar como possível reservatório da doença, objetivou-se detectar a presença de *Leishmania* spp. em felinos domésticos do município endêmico de Araguaína, estado do Tocantins, abordando as possíveis associações com a infecção (características individuais dos animais, presença de sinais clínicos e co-infecções). Para tal, amostras de sangue, medula óssea, linfonodo, fígado, baço e pele foram analisadas por meio do exame direto, Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR). Amostras de soro também foram testadas para o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FeLV) utilizando o teste SNAPshot Dx, IDEXX®. Anticorpos anti- *Leishmania* spp. foram detectados em 26,2% (22/84) (IC: 17,2% - 36,9%) dos animais. Desses, 22,7% (5/22) (IC: 0,74% - 10,12%) foram reativos para FeLV, sendo que um deles também mostrou positividade para FIV. Não houve associação entre essas infecções e a leishmaniose ($p=0,1189$). Variáveis como sexo, comprimento do pelo, cor da pelagem, estado corporal, idade e raça não tiveram associação com a soropositividade ($p>0,05$). A frequência de *L. (L.) infantum chagasi* obtida pela PCR foi de 4,4% (5/113) (IC: 1,5% - 10%) e o resultado obtido por meio do exame parasitológico direto, foi de 5,3% (3/57) (IC: 1,1% - 14,6%). Dentre os animais positivos no diagnóstico molecular (5/113), 75% (3/4) das amostras de baço, linfonodo submandibular e pele, 60% (3/5) das amostras de sangue e 33,33% (1/3) da amostras de medula mostraram positividade. Dos animais que apresentaram formas amastigotas no exame direto (3/57), todos os tecidos testados foram positivos (3/3). A concordância entre PCR e exame parasitológico foi considerada moderada (valor de Kappa = 0,544, IC: 0,2874 – 0,8006). Houve associação entre positividade e animais que apresentaram pelo menos um sinal clínico ($p=0,0231$). Dentre estes sinais, esplenomegalia ($p=0,0069$) e hepatomegalia ($p=0,0008$) foram estatisticamente significativos. Os resultados obtidos aqui representam considerável impacto do ponto de vista de saúde pública, uma vez que a leishmaniose é grave uma zoonose presente principalmente regiões subdesenvolvidas e em processo de urbanização, como é o caso do Tocantins. Assim, recomenda-se o desenvolvimento e a intensificação de medidas de controle direcionadas à espécie felina, tais como conscientização de órgãos e profissionais de saúde, orientação da população quanto à importância da guarda responsável, assistência veterinária e cuidados ambientais, e capacitação dos profissionais veterinários de forma a atuarem no diagnóstico preciso da infecção.

Palavras-chave: amastigota; anticorpo; gato; *Leishmania* spp.; reação em cadeia pela polimerase

ABSTRACT

Considering that Tocantins is one of the main brazilian states with the greatest number of cases of human and canine visceral leishmaniasis and that the cat can act as a possible reservoir for the disease, it was aimed to detect the presence of *Leishmania* spp. in domestic cats of the endemic municipality of Araguaína, state of Tocantins, approaching the possible associations with the infection (individual characteristics of the animals, presence of clinical signs and co-infections). For this, blood, bone marrow, lymph node, liver, spleen and skin samples were analyzed by direct examination, Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Serum samples were also tested for Feline immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) using the SNAPshot Dx, IDEXX® test. Anti-*Leishmania* spp. antibodies were detected in 26.2% (22/84) (IC: 17.2% - 36.9%) of the animals. Of these, 22.7% (5/22) (CI: 0.74% - 10.12%) were reactive for FeLV, one of which also showed positivity for FIV. There was no association between these infections and leishmaniasis ($p = 0.1189$). Variables such as sex, hair length, coat color, body condition, age and race had no association with seropositivity ($p > 0.05$). The frequency of *L. (L.) infantum chagasi* obtained by PCR was 4.4% (5/113) (CI: 1.5% - 10%) and the result obtained through direct parasitological examination was 5.3% (3/57) (CI: 1.1% - 14.6%). Among the positive animals in the molecular diagnosis (5/113), 75% (3/4) of the spleen, submandibular lymph nodes and skin samples, 60% (3/5) of the blood samples and 33.33% (1/3) of the bone marrow samples showed positivity. Of the animals that presented amastigote forms in the direct examination (3/57), all tested tissues were positive (3/3). The agreement between PCR and parasitological examination was considered moderate ($Kappa = 0.544$, CI: 0.2874 - 0.8006). There was an association between positivity and animals presenting at least one clinical sign ($p = 0.0231$). Among these signs, splenomegaly ($p = 0.0069$) and hepatomegaly ($p = 0.0008$) were statistically significant. The results obtained here represent a considerable impact from the point of view of public health, since the leishmaniasis is serious a zoonosis present mainly undeveloped regions and in the process of urbanization, as is the case of Tocantins. Thus, it is recommended the development and intensification of control measures directed to the feline species, such as the awareness of organs and health professionals, the orientation of the population regarding the importance of responsible care, veterinary assistance and environmental care, and training of veterinary professionals in order to act in the precise diagnosis of the infection.

Keywords: amastigote; antibody; cat; *Leishmania* spp.; polymerase chain reaction

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* distribuídas mundialmente. Em humanos a infecção pode originar formas clínicas distintas: leishmaniose visceral (LV), também conhecida como kala-azar, leishmaniose dermal pós kala-Azar (LDPK) e leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea - LC e leishmaniose mucocutânea - LMC). Embora esta última seja a forma mais comum da doença, a LV apresenta maior gravidade, podendo ser fatal⁽¹⁾.

No ano de 2015, o número de casos autóctones registrados junto à Organização Mundial de Saúde foi de 3.456 para LV e 46.304 para LC somente nas Américas. Entre os países mais afetados no continente aparecem Brasil, Bolívia, Colômbia e Peru⁽¹⁾. Nesse contexto, ressalta-se que a ocorrência de leishmaniose prevalece em grande parte em países em desenvolvimento⁽²⁾ e áreas geográficas de maior pobreza⁽³⁾, onde há falta de recursos e investimentos em pesquisa que auxiliem no controle da enfermidade, como por exemplo o desenvolvimento de vacinas⁽²⁾.

No Brasil registrou-se, em 2016, 3.200 casos confirmados de LV⁽⁴⁾ e 12.690 para a forma tegumentar⁽⁵⁾. Tratando-se apenas da forma visceral, estados brasileiros como Maranhão, Minas Gerais, Pará, Ceará e Tocantins vêm destacando-se com o maior número de casos⁽⁴⁾. Em termos de elevada incidência, dados do Ministério da Saúde referentes a 2015, posicionaram o estado do Tocantins no primeiro lugar no *ranking* nacional (12,2/100.000 habitantes)⁽⁶⁾.

Ao considerar a distribuição de casos de LV no estado do Tocantins, estes estão concentrados nos municípios de Araguaína, Palmas (capital), Porto Nacional, Paraíso do Tocantins, Araguatins e Tocantinópolis, que compõem 66% dos casos⁽⁷⁾. No ano de 2015, por exemplo, Araguaína e Palmas foram responsáveis por 79 e 52 dos 203 casos humanos, respectivamente⁽⁸⁾.

Considerado área de transmissão intensa para LV, o município de Araguaína é o principal responsável pelo aumento de casos humanos no estado (Figura 1)⁽⁷⁾. Além disso, o município também é endêmico para a leishmaniose visceral canina, sendo responsável por índices elevados de infecção, como o verificado por Santos et al.⁽⁹⁾ que observaram uma frequência de 40,7% em cães examinados no período de 2007 a 2014.

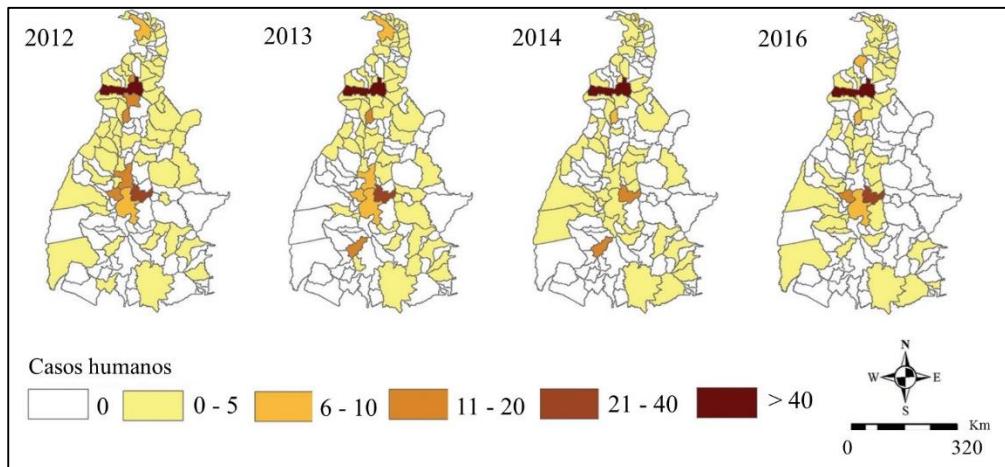


FIGURA 1- Perfil espaço temporal de casos humanos de leishmaniose visceral no estado do Tocantins de 2012 a 2016. Observar distribuição de casos no município de Araguaína (coloração marrom escura).
Fonte: Adaptado de Afonso et al.⁽⁷⁾

A LV é transmitida a humanos e animais por meio da picada de fêmeas flebotomíneas⁽¹⁰⁾ pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Animais silvestres como *Speothos venaticus* (cão do mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará) e *Cerdocyon thous* (raposa do mato)⁽¹¹⁾ podem atuar como reservatórios, apesar do cão doméstico ser considerado o principal reservatório urbano^(12, 13). Outras espécies de vertebrados como roedores, equídeos e felinos também já foram evidenciadas com a doença⁽¹⁴⁾.

Indivíduos da espécie felina já foram diagnosticados infectados por *Leishmania infantum* por meio de xenodiagnóstico^(15, 16). Pesquisas recentes têm apontado os felinos domésticos como fonte de infecção⁽¹⁵⁻¹⁷⁾, propondo-os como reservatório doméstico adicional⁽¹⁵⁾ e/ou hospedeiros secundários⁽¹⁸⁾, alternativos ou acidentais⁽¹⁹⁾. Ressalta-se ainda que vetores como o *Lutzomyia longipalpis*, principal espécie vetora da LV no Brasil⁽²⁰⁾, apresentam hábitos alimentares ecléticos, alimentando-se de sangue de aves, roedores, humanos, gambás, bois, cavalos e cães⁽²¹⁾. Assim sendo, os gatos também poderiam atuar como fonte de alimento.

Tratando-se do diagnóstico, a doença em sua forma visceral pode ser investigada por meio do reconhecimento dos sinais clínicos e do uso de testes laboratoriais, como o exame parasitológico, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) do agente por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Esses são considerados importantes para alcançar um resultado definitivo^(22, 23). Vale ressaltar que os testes rápidos imunocromatográficos (TRIs) também vêm sendo utilizados como método de triagem para leishmaniose visceral canina⁽²⁴⁾.

Tendo em vista que o Tocantins mostra-se um dos principais estados com maior número de casos de leishmaniose humana, que os felinos domésticos têm tido crescente papel como animais de estimação, mantendo estreita relação com os seres humanos⁽²⁵⁾, e que a falta de um diagnóstico precoce para a leishmaniose felina pode significar a permanência de um possível reservatório no ambiente e risco de transmissão⁽²⁶⁾, o diagnóstico eficaz da infecção em animais dessa região endêmica é de extrema importância. Ressalta-se que a estimativa populacional felina no estado do Tocantins durante a vacinação antirrábica do ano de 2017 chegou a 64.048 animais, sendo que a maior parte da população (11,8%) foi proveniente da cidade de Araguaína⁽²⁷⁾. Esse fato reforça a necessidade de pesquisas relacionadas à leishmaniose felina, de forma que auxiliem no esclarecimento do papel do gato no ciclo da doença e no posterior controle da mesma.

Assim, objetivou-se detectar a presença de *Leishmania* spp. em felinos domésticos do município endêmico de Araguaína, estado do Tocantins, por meio do método parasitológico direto, da Reação de Imunofluorescência Indireta e da Reação em cadeia pela polimerase, abordando as possíveis associações com a infecção (características individuais dos animais, presença de sinais clínicos e co-infecções).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae⁽²⁸⁾. Esses protozoários têm a capacidade de acometer humanos e animais, ocasionando diferentes formas clínicas da doença⁽²⁹⁾.

A primeira observação de leishmaniose referiu-se à apresentação tegumentar, feita em 1885 pelo Major David Douglas Cunningham, na Índia. Cunningham visualizou células medindo 12,6 µm x 8,8 µm contendo vários “Corpos Nucleados” de “única massa nuclear” em amostras de tecido cutâneo. Estes achados caracterizaram o macrófago hospedeiro contendo inúmeras formas amastigotas que mais tarde foram denominadas *Leishmania major*. Tempos depois, em 1906, na Rússia, um pesquisador chamado Lihe nomeou o protozoário como *Leishmania tropica*⁽³⁰⁾.

O agente causador da leishmaniose visceral foi descrito em 1903 por William Boog Leishman, em Londres, e Charles Donovan em Madras, sul da Índia. Eles descobriram “organismos ovais não flagelados” em amostras de baço de pacientes com Febre Dum Dum (Kala Azar). Estes organismos foram denominados inicialmente como “corpos Leishman-

donovan". Entretanto, Ronald Ross usou a denominação *Leishmania donovani* e, a partir desse momento estabeleceu-se o gênero *Leishmania*. No ano seguinte pesquisadores, como Félix Mesnil e o próprio William Boog Leishman, notaram similaridade entre as formas que causavam a doença visceral e a cutânea⁽³⁰⁾.

Sabe-se hoje que os protozoários do gênero *Leishmania* são dimórficos, apresentando dois estágios morfológicos principais: amastigota e promastigota. A amastigota é encontrada no fagolisossomo de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro mamífero, apresentam forma arredondada ou oval, medindo aproximadamente 2,5-6,8µm em diâmetro, e possuindo cinetoplasto intracelular contendo o ácido desoxirriboucleico (DNA) mitocondrial. Já a promastigota é uma forma extracelular encontrada no intestino dos vetores flebotomíneos, possui um longo flagelo anterior, é dotada de motilidade e mede cerca de 15-30 µm de comprimento⁽³¹⁾.

Atualmente existem mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* distribuídas mundialmente⁽¹⁾. No Brasil, a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é a responsável por causar leishmaniose em sua forma visceral^(28, 32), enquanto que a forma cutânea da doença é ocasionada, na maioria dos casos, pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*⁽³³⁾.

O flebótomo vetor desse protozoário tem por volta de dois a três milímetros de comprimento e é encontrado em todas as regiões intertropicais e temperadas do mundo. Geralmente a fêmea deposita seus ovos em tocas de roedores, troncos de árvores, prédios em ruínas, rachaduras, abrigos de animais e lixo doméstico, onde as larvas podem encontrar a matéria orgânica, calor e umidade que necessitam para se desenvolver⁽¹⁰⁾. Uma vez que precisa de sangue para o desenvolvimento de seus ovos, a fêmea torna-se infectada com *Leishmania* spp.⁽¹⁰⁾ no momento em que ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas a partir do sangue de animais infectados⁽³⁴⁾.

No trato digestivo anterior da fêmea ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as formas amastigotas, que se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas promastigotas. Estas, por sua vez, transformam-se em paramastigotas e colonizam o esôfago e a faringe do vetor. A partir de então as paramastigotas se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas⁽³⁴⁾ e são inoculadas em novos indivíduos no momento da picada, fechando o ciclo de transmissão⁽³⁵⁾.

Pesquisas desenvolvidas no Brasil com o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetora da LV no país⁽²⁰⁾, têm evidenciado preferência desses por sangue de aves e roedores, humanos, gambás, bois, cavalos e cães^(21, 36), demonstrando o caráter oportunista da espécie.

Informações como esta são valiosas, visto que o conhecimento dos hábitos alimentares a partir do estudo do conteúdo intestinal dos vetores, permite a identificação dos potenciais reservatórios de *Leishmania* spp.⁽²¹⁾. Além de o vetor se comportar de maneira eclética quanto a preferência alimentar, outro ponto importante no que tange à infecção pelo agente etiológico da leishmaniose, principalmente em regiões endêmicas, é o fator impacto ambiental, já que há correlação entre questões como o desmatamento e a possível emergência de surtos⁽⁷⁾.

2.2 Leishmaniose felina

A leishmaniose em gatos foi descrita pela primeira vez em 1912, na Argélia⁽³⁷⁾. A partir de então, a doença em felinos vem sendo alvo de estudos em diversas regiões do mundo⁽²⁹⁾, tais como Argentina⁽³⁸⁾, Egito⁽³⁹⁾, Espanha⁽⁴⁰⁾, Grécia⁽²⁹⁾ Jerusalém⁽⁴¹⁾, Irã⁽¹²⁾, Itália⁽⁴²⁾, México⁽⁴³⁾, Portugal⁽⁴⁴⁾ e Turquia⁽¹⁴⁾. No Brasil, a infecção felina foi registrada no ano de 1962⁽⁴⁵⁾. Somente no ano de 2002 a espécie agora conhecida como *L. chagasi* foi diagnosticada em um gato nativo de Cotia, São Paulo, área onde nenhum caso autóctone de leishmaniose visceral humana ou canina havia sido relatado⁽⁴⁶⁾.

Embora haja discussão acerca do papel do gato no ciclo de transmissão da leishmaniose, algumas pesquisas propõem que ele atue como reservatório doméstico adicional⁽¹⁵⁾ e/ou hospedeiros secundários⁽¹⁸⁾, alternativos ou acidentais⁽¹⁹⁾. Entretanto, estudos com xenodiagnóstico realizados na Itália e no Brasil mostraram evidências de que o gato pode se comportar como reservatório da leishmaniose visceral, uma vez que tem a capacidade de transmitir o protozoário ao vetor^(15, 16).

Um fato notório a respeito da leishmaniose felina é que a doença tem facilidade de expansão, principalmente em animais de áreas endêmicas com relatos de infecção canina e humana^(31, 47). Também é digno de nota que os vetores têm uma alta capacidade de adaptação a diferentes ambientes e hospedeiros vertebrados⁽²⁵⁾, o que pode contribuir para a infecção felina. Assim, a doença deve ser considerada quanto ao diagnóstico diferencial para outras afecções nesses animais⁽²⁹⁾.

Atualmente, sete espécies de *Leishmania* foram identificadas infectando felinos. Trata-se de *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo⁽⁴⁸⁾, *L. major*⁽¹⁸⁾ e *L. tropica* no Velho Mundo⁽¹⁴⁾ e *L. infantum*, tanto no Novo como no Velho Mundo⁽⁴⁸⁾. Dessas, a *L. infantum* parece ser a mais frequentemente encontrada^(41, 44, 49-54). Ainda pode ocorrer a co-infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, como já evidenciado em felinos da Turquia (*L. tropica* e *L. infantum*)⁽¹⁴⁾ e México (*L. braziliensis* e *L. infantum*; *L. infantum* e *L. mexicana*; *L. mexicana* e *L. braziliensis*)⁽⁴³⁾.

De acordo com Gramiccia⁽³¹⁾, os felinos podem ser considerados suspeitos de leishmaniose quando são provenientes de áreas endêmicas, ou tenham estado nestas por um período de tempo, e apresentem sinais como linfadenomegalia, uveíte e dermatite exfoliativa/ulcerativa ou nodular⁽³¹⁾. A forma cutânea da leishmaniose em felinos inclui sinais clínicos como formação de lesões nodulares e ulcerativas, lesões papulares, dermatite generalizada, alopecia e lesões endurecidas na região do focinho, orelhas, lábios e pálpebras⁽³¹⁾. Já na forma visceral pode haver linfadenopatia, secreção ocular mucopurulenta, ulcerações na cavidade oral, opacidade de córnea, alopecia e eritema cutâneo⁽⁵⁵⁾. A ocorrência de sinais inespecíficos, como febre, perda de peso, estomatite e enterite também é relatada⁽²⁵⁾. No Quadro 1 relaciona-se alguns dos sinais clínicos encontrados em felinos infectados, tanto na forma tegumentar, como na visceral.

QUADRO 2 - Sinais clínicos em gatos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* spp.

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR FELINA			
Autor	País	Sinais clínicos	Espécie
Ruiz et al. ⁽³⁸⁾	Argentina	Lesão ulcerativa de bordas elevadas na região periocular	<i>L. braziliensis</i>
Souza et al. ⁽⁵⁶⁾	Brasil	Lesão nodular no focinho, orelha e região digital	<i>L. amazonensis</i>
Schubach et al. ⁽⁵⁷⁾	Brasil	Úlceras cutâneas e lesão na mucosa nasal	<i>L. braziliensis</i>
Simoes-Mattos et al. ⁽²⁶⁾	Brasil	Estudo experimental: Pápulas no pavilhão auricular e narina; pápulas satélites e disseminação das lesões; ulcerações e formação de nódulo de aspecto irregular	<i>L. braziliensis</i>
Rougeron et al. ⁽⁵⁸⁾	Guiana Francesa	Úlcera nasal; nódulos de tamanhos diferentes no pavilhão auricular	<i>L. braziliensis</i>
LEISHMANIOSE VISCERAL FELINA			
Autor	País	Sinais clínicos	Espécies
Metzdorf et al. ⁽⁵⁹⁾	Brasil	Complexo gengivite/estomatite; perda de peso; mucopurulência nasal e ocular; úlceras orais; alopecia	<i>L. infantum</i>
Noé et al. ⁽²⁵⁾	Brasil	Dermatoses caracterizadas por alopecia, pelo rarefeito, laceração e dermatite ulcerativa; Febre; perda de peso; estomatite; enterite	<i>L. chagasi</i>

QUADRO 3 - Sinais clínicos em gatos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* spp.
(continuação)

LEISHMANIOSE VISCERAL FELINA			
Autor	País	Sinais clínicos	Espécies
Coelho et al.⁽⁴⁷⁾	Brasil	Extensa dermatite, crostas e pequenas úlceras na região da cabeça e superfícies palmar e plantar das patas	<i>L. chagasi</i>
Vides et al.⁽⁵⁵⁾	Brasil	Lesões na cabeça (pavilhão auricular, envolvimento generalizado e lesões na região das narinas); Lesões nos membros, no dorso, na cauda e no abdômen; alopecia, principalmente no pavilhão auricular, membros, dorso, abdômen e cauda; Eritema no pavilhão auricular, abdômen, membros, região das narinas e região cervical; úlceras com crostas hemorrágicas no pavilhão auricular; Linfadenopatia; desidratação; perda de peso; diarreia; secreção ocular mucopurulenta bilateral; alterações no estado de consciência; ulcerações na cavidade oral; dispneia; secreção purulenta bilateral nasal; opacidade de córnea	<i>L. chagasi</i>
Costa et al.⁽⁶⁰⁾	Brasil	Lesões dermatológicas crostosas na região cervical dorsal; hepatoesplenomegalia	<i>L. chagasi</i>
Savani et al.⁽⁴⁶⁾	Brasil	Lesão nodular na região do focinho; desidratação; perda de peso; linfadenomegalia	<i>L. chagasi</i>
Sherry et al.⁽⁶¹⁾	Espanha	Dermatite generalizada; hiperqueratose; úlcera labial; alopecia ventral generalizada; descarga nasal; presença do complexo respiratório felino; diarreia crônica; uveíte; úlcera nasal; lesões de ponta de orelha; gengivoestomatite	<i>L. infantum</i>
Chatzis et al.⁽³²⁾	Grécia	Alopecia-hipotricose; crostas; úlceras; pápulas; blefarite; anorexia; vômito; diarreia; linfadenomegalia; hepatomegalia; icterícia	<i>L. infantum</i>
Spada et al.⁽⁴²⁾	Itália	Escoriações da região da face; linfadenomegalia	<i>L. infantum</i>
Poli et al.⁽⁶²⁾	Itália	Letargia; perda de peso; lesão nodular ulcerativa na pálpebra; estomatite ulcerativa grave; linfadenomegalia generalizada; hepatomegalia	<i>L. infantum</i>

QUADRO 4 - Sinais clínicos em gatos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* spp. (continuação)

LEISHMANIOSE VISCERAL FELINA			
Autor	País	Sinais clínicos	Espécies
Hatam et al.⁽⁶³⁾	Irã	Lesões cutâneas	<i>L. infantum</i>
Nasereddin et al.⁽⁴¹⁾	Israel	Úlcera cutânea	<i>L. infantum</i>
Vita et al.⁽⁶⁴⁾	Itália	Desidratação; linfadenomegalia; descarga ocular; febre; anorexia; vômito; perda de peso; descarga nasal; lesões oculares e cutâneas; depressão; otite; congestão de mucosas; mortalidade neonatal; distensão abdominal; poliúria; polidipsia; hematúria; palidez de mucosa; diarreia crônica	
Maia et al.⁽⁶⁵⁾	Portugal	Icterícia e alopecia	<i>L. infantum</i>
ESPÉCIE NÃO IDENTIFICADA			
Autor	País	Sinais clínicos	Gênero
Hervas et al.⁽⁶⁶⁾	Espanha	Primeiro caso: vômito e icterícia; Segundo caso: histórico de abortos e alopecia recorrente na região do abdômen e cabeça; ulceração de protuberâncias ósseas; ulceração sobre as saliências ósseas isquiáticas; descamação com alopecia difusa bilateral do terço posterior da abdome; descamação, alopecia e eritema da borda das orelhas; linfadenomegalia poplítea	<i>Leishmania</i> spp.

Alguns dos sinais clínicos considerados no quadro acima podem ser visualizados nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Entretanto, é importante ressaltar que apesar da ampla variedade de sinais nem sempre haverá manifestação clínica^(49, 67).

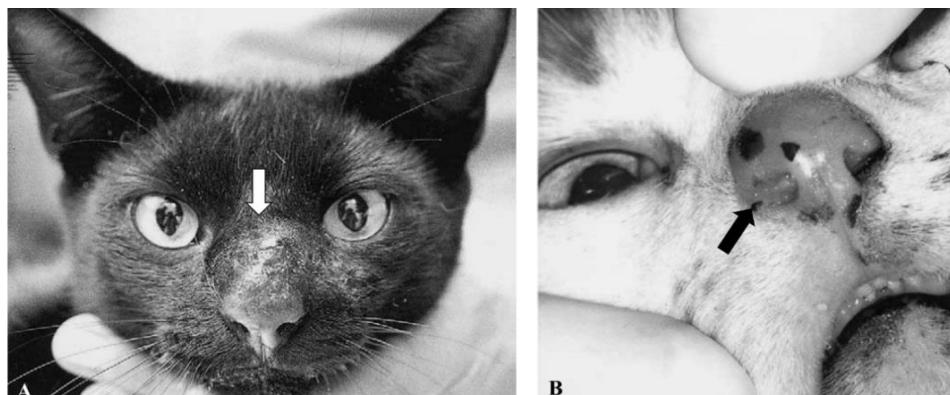


FIGURA 2 - Felinos com leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Visualizar: (A) úlcera cutânea no plano nasal (seta); (B) lesão característica na mucosa nasal (seta). Fonte: Adaptado de Schubach et al.⁽⁵⁷⁾



FIGURA 3 - Felino infectado por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Visualizar (A): Lesão nodular nasal de aproximadamente um cm de diâmetro (seta); (B): Protuberâncias nodulares na borda do pavilhão auricular. Fonte: Adaptado de Rougeron et al.⁽⁵⁸⁾

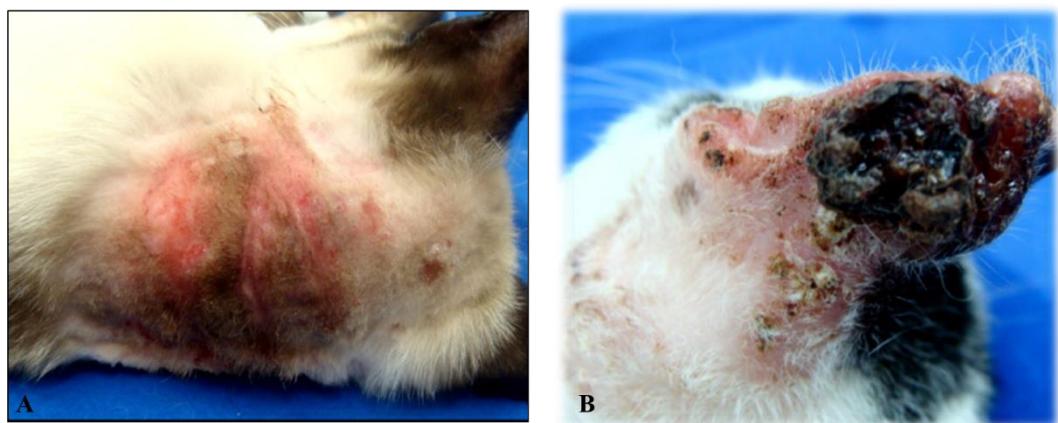


FIGURA 4 - Felinos com leishmaniose visceral causada por *L. chagasi*.

Visualizar (A): região cervical dorsal apresentando alopecia, eritema e exsudação; (B): pavilhão auricular esquerdo evidenciando ulceração e formação de crostas hemorrágicas. Fonte: Adaptado de Vides et al.⁽⁵⁵⁾



FIGURA 5 - Felino com leishmaniose visceral causada por *L. (L.) infantum chagasi*. Observar magresa e a presença de lesões cutâneas nas regiões oculares, nos pavilhões auricularres e nas extremidades dos membros pélvicos e torácicos.

Quanto aos fatores predisponentes para a infecção, há indícios de que indivíduos adultos, com idade superior a 24 meses,⁽⁵²⁾ e machos,⁽⁵⁰⁾ apresentem maior chance de se infectar. Além disso, os animais provenientes de ambiente rural⁽⁵²⁾ ou de vida livre (rua) tendem ser mais infectados, provavelmente devido ao maior contato com os vetores⁽⁴⁴⁾. Co-infecções com o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)^(42, 50) e o Coronavírus Felino (FCoV)⁽⁴²⁾ também já foram relatados como fatores associados à doença.

2.3 Métodos de diagnóstico

Os métodos de diagnóstico aplicáveis ao gato são os mesmos empregados para cães. A abordagem diagnóstica geral da leishmaniose em animais de companhia deve ser baseada no histórico de casos clínicos, achados laboratoriais específicos e resultados de testes diretos (análise parasitológica), indiretos (que avaliam a resposta imune do hospedeiro ao parasita) e moleculares⁽³¹⁾.

2.3.1 Diretos

O diagnóstico direto pode ser realizado por meio da visualização microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em células advindas de medula óssea, baço⁽¹⁷⁾, fígado, linfonodo⁽⁶⁰⁾ e pele⁽³¹⁾. Os protozoários são observados tanto no interior das células, como extracelularmente, uma vez que células altamente infectadas podem sofrer lise⁽³¹⁾.

O exame parasitológico, como também é denominado, tem alta especificidade de gênero e não envolve custos elevados. No entanto, pode apresentar uma baixa sensibilidade, dependendo do nível de parasitemia e do material biológico coletado, o que influencia na capacidade de detecção dos animais positivos⁽³⁴⁾, gerando resultados falso-negativos. Além disso, essa abordagem pode ser caracterizada como invasiva⁽⁶⁸⁾ e, embora seja de fácil execução, necessita de treinamento por parte do examinador e não exclui a importância de utilizar métodos sorológicos ou moleculares⁽⁹⁾.

O cultivo e isolamento de *Leishmania* spp.⁽⁶⁹⁾, bem como os exames de histopatologia ou imunoistoquímica (IMIQ) também podem ser realizados⁽⁷⁰⁾. Dentre esses, a cultura é o único procedimento que permite isolar e manter a população de leishmanias infectantes (promastigotas). No entanto, a técnica limita-se pelo fato de exigir um longo período de incubação (até 30 dias)⁽⁷¹⁾. Para tal, os meios de cultura Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)⁽¹²⁾ e Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino, recomendados para *L. infantum*⁽¹⁸⁾, e o meio bifásico (NNN e Meio Drosophila de Schneider) suplementado com 10% de soro fetal bovino, para cepas como *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, podem ser utilizados⁽⁵⁷⁾.

2.3.2 Indiretos

Em gatos a presença de títulos detectáveis é, por vezes, transitória, mesmo em animais submetidos a uma pressão parasitária⁽⁶⁹⁾. Devido a fatores como a não validação dos títulos recomendados^(40, 47, 72), o uso do diagnóstico sorológico nesses animais ainda não está padronizado como para leishmaniose canina. No entanto, técnicas como o Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA)⁽³¹⁾, a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)⁽⁷³⁾ e o teste de aglutinação direta (*Direct agglutination test* - DAT)⁽⁵²⁾ têm sido empregadas.

A forma visceral da leishmaniose geralmente é diagnosticada pela detecção de IgG que se liga especificamente a抗ígenos de *Leishmania* spp. Estes ensaios são utilizados para o diagnóstico individual, mas podem também ser usados para pesquisas de campo⁽⁶⁸⁾. Os métodos mais comuns são o ELISA e a RIFI⁽⁷¹⁾, considerados valiosos para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* em felinos⁽⁷⁴⁾.

No Brasil, o Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LV em cães pelo uso de testes rápidos imunocromatográficos (TRIs) como opção de triagem e o ELISA como teste confirmatório⁽³⁾. Para tal, o TRI utilizado é o DPP® (Dual Path Platform, Bio-

Manguinhos/FIOCRUZ) que dispõe de um antígeno obtido a partir da proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26). No entanto, há também o Alere Leishmaniose Ac *Test Kit* fornecido pela empresa Alere TM e registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)⁽²⁴⁾. Vale ressaltar que apesar do uso dessas técnicas, a sensibilidade dos antígenos empregados ainda não satisfaz as expectativas, o que leva crer que o emprego de novos antígenos a serem empregados em tiras imunocromatográficas apresenta uma perspectiva bastante animadora⁽³⁾.

A RIFI, por sua vez, é caracterizada por apresentar sensibilidade e especificidade altas. Por isso, é recomendada pela Organização para a Saúde Animal (OIE) como método sorológico de referência⁽⁷¹⁾. Este teste, utiliza o parasito íntegro como antígeno, é bastante útil em estudos Epidemiológicos⁽⁷⁵⁾. Para a realização do mesmo, diluições seriadas dos soros a serem testados são depositadas sobre lâminas de microscopia sensibilizadas com formas promastigotas de *L. infantum*. A ligação antígeno anticorpo é revelada pelo uso de anti-anticorpos marcados com fluorócromos. Durante a leitura microscópica, a avaliação da intensidade de fluorescência é subjetiva em títulos positivos baixos, o que torna-se um fator limitante do ensaio⁽⁷¹⁾. O *cut-off* para esta técnica em felinos é variável, havendo descrições do uso de diferentes diluições como 1:40^(47, 50, 55, 73, 76), 1:100⁽⁴⁰⁾ e 1:200⁽⁷²⁾.

O DAT também permite a detecção de imunoglobulinas contra *Leishmania* spp. ⁽³⁾. Recentemente, o uso deste teste no diagnóstico da leishmaniose felina tem aumentado, principalmente em países de recursos limitados⁽⁷⁷⁾, como Angola⁽⁷⁸⁾ e Irã⁽¹²⁾. Essa técnica é caracterizada como simples e barata, podendo ser utilizada no diagnóstico ou em estudos soroepidemiológicos de LV⁽¹⁸⁾. Alguns autores sugerem que a técnica também apresente altas sensibilidade⁽⁷⁷⁾ e especificidade, podendo ser uma ferramenta relevante no diagnóstico da doença⁽⁴⁴⁾. No entanto, a padronização e o controle de qualidade do antígeno são bastante complexos⁽⁷⁹⁾.

Todavia, apesar das técnicas sorológicas serem utilizadas para diagnóstico da leishmaniose vicular, Simões-Mattos et al.⁽²⁶⁾ mencionam-a como não sendo um bom marcador da evolução clínica da leishmaniose tegumentar felina, visto que a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* em soro de gatos com lesões cutâneas podem levar a um diagnóstico equivocado. Também neste ponto, acredita-se que o uso da sorologia como única forma de diagnóstico pode subestimar os resultados positivos⁽⁸⁰⁾.

2.3.3 Moleculares

Embora a sorologia e os testes microscópicos sejam amplamente utilizados, o isolamento ou a presença do DNA de *Leishmania* spp. em tecidos representam evidências de que o agente realmente é responsável pela infecção do hospedeiro⁽¹⁸⁾. Nesse sentido, métodos moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e suas variações, vêm ganhando destaque, uma vez que apresentam alta especificidade^(81, 82), são capazes de diferenciar as espécies causadoras das formas visceral, cutânea e mucocutânea^(18, 83, 84), fornecem dados que quantificam o DNA do parasito na amostra estudada⁽²³⁾ e podem ser realizadas em diversos tipos de materiais biológicos^(85, 86).

Para Maia et al.⁽⁶⁷⁾ essas ferramentas devem ser aplicadas ao diagnóstico da leishmaniose felina. A PCR convencional^(49, 87), a PCR em tempo real^(42, 70) e o estudo do polimorfismo de fragmentos obtidos por meio da restrição dos produtos da PCR (RFLP-PCR) vêm sendo utilizados com frequência no diagnóstico da infecção^(25, 59). Demais variações da PCR, como Nested-PCR⁽¹⁴⁾ e Multiplex-PCR também são citadas⁽²³⁾.

De maneira geral, o objetivo da PCR é promover a amplificação exponencial de um segmento específico do DNA utilizando uma única sequência molde⁽⁸⁸⁾. Para que isso ocorra, sequências específicas de nucleotídeos iniciadores sintéticos são utilizadas. Os iniciadores, ou *primers*, delimitam o fragmento alvo da fita de DNA a ser amplificado, o qual corresponde à sequência de nucleotídeos do DNA do agente etiológico pesquisado⁽⁸⁹⁾.

Para a detecção molecular de *Leishmania* spp., geralmente são empregados *primers* desenhados a partir de áreas conservadas de genes que codificam as subunidades menores do ácido ribonucleico ribossômico (Small-subunit- SSU rRNA), dos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania* spp. (kDNA)⁽⁹⁰⁾, do miniexon de *Leishmania* spp. e do espaçado interno transrito do ribossomo (Internal Transcribed Spacer - ITS)⁽⁹¹⁾ ITS 1 e 2⁽⁹²⁾. Há evidências de que, os *primers* mais utilizados são obtidos de sequências do kDNA⁽⁷⁰⁾. Alguns dos primers usados na detecção de *Leishmania* spp. pela PCR convencional, podem ser visualizados no Quadro 2.

QUADRO 5 – Relação de primers recentemente utilizados no diagnóstico de *Leishmania* spp. por meio da reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR).

Par de primer	Sequências	Fragmento alvo	Autor	Agente
RV1 RV2	5'CTTTCTGGTCCTCCGGTAGG3' 5'CCACCCGGCCCTATTACACC AA3'	- (kDNA)	Mohammadi ha et al. ⁽⁹³⁾ Mohammadi ha et al. ⁽⁹⁴⁾ Lachaud et al. ⁽⁹⁵⁾	<i>L. infantum</i>
RV1 RV2	5'CTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG3' 5'CCACCTGGCCTATTACACCA3'	145pb (kDNA)	Solcà et al. ⁽⁸¹⁾ Gomes et al. ⁽⁸³⁾ Lachaud et al. ⁽⁹⁰⁾	<i>L. infantum</i>
B1 B2	5'GTTAGCCGATGGTGGTCTG3' 5'CACCATTTCGATTG3'	447pb (kDNA)	Rocha et al. ⁽⁹¹⁾	<i>L. infantum</i>
Linf.1- 23F Linf.1- 154R	5'TCCCAAACCTTCTGGTCCT3' 5'TTACACCAACCCCCAGTTTC3'	132pb (kDNA)	De Paiva Cavalcanti et al. ⁽⁹⁶⁾	<i>L. infantum</i>
F R	5' (C/G)(C/G)(G/C)CC(C/A)CTA T(T/A)TTACACCAACCCC 3' 5'GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA3'	120pb (kDNA)	Quaresma et al. ⁽⁹⁷⁾	<i>Leishmania</i>
N13A N13B	5'AACTTTCTGGTCCTCCGG3' 5'CCCCCAGTTCCCGCCC3'	120pb (kDNA)	Francino et al. ⁽⁹⁸⁾	<i>L. infantum</i>
MC1 MC2	5'GTTAGCCGATGGTGGTCTG3' 5'CACCCATTTCGATTG3'	447pb (kDNA)	Cortes et al. ⁽⁸²⁾	<i>L. infantum</i>
13a 13b	5'GTGGGGGAGGGGCGTTCT3' 5'ATTACACCAACCCCCAGTT3'	120pb (kDNA)	Queiroz et al. ⁽⁹⁹⁾ Nunes et al. ⁽¹⁰⁰⁾ Rodgers et al. ⁽¹⁰¹⁾ Benassi et al. (102)	<i>Leishmania</i> spp.
			Metzdorf et al. ⁽⁵⁹⁾	

QUADRO 6 – Relação de primers recentemente utilizados no diagnóstico de *Leishmania* spp. por meio da reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR) (continuação).

Par de primer	Sequências	Fragmento alvo	Autor	Agente
AJS31 DBY	5'GGGGTTGGTGTAAAATAGGGCC 3' 5'CCAGTTCCGCCCGGGAG3'	805pb (kDNA)	Reithinger et al. ⁽¹⁰³⁾	Complexo <i>L. donovani</i>
Forward Reverse	5'GGG(G/T)AGGGCGTTCT(G/C)C GAA3' 5'(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)T TACACCAA CCCC3'	120pb (kDNA)	Coura-Vital et al. ⁽¹⁰⁴⁾ ; Oliveira et al. ⁽¹⁰⁵⁾ Degrave et al. ⁽¹⁰⁶⁾ ; Metzdorf et al. ⁽⁵⁹⁾	<i>Leishmania</i> spp.
F LINR1 7	5'GGGGTTGTTGTAAAATAGGG3' 5'TTTGAACGGGATTCTG3'	- (kDNA)	Nemati et al. ⁽¹⁸⁾	<i>L. infantum</i> , <i>L. tropica</i> , e <i>L. major</i>

Tratando-se das variações da PCR utilizadas no diagnóstico da leishmaniose, a RFLP-PCR pode distinguir o perfil molecular de espécies muito próximas filogeneticamente.⁽⁹⁷⁾ Isso se dá por meio da adição de endonucleases, ou enzimas, de restrição ao DNA amplificado pela PCR convencional, visando fragmentar as fitas de DNA em uma região previamente conhecida.⁽⁸⁹⁾ No quadro 3 exemplifica-se algumas das endonucleases envolvidas na reação.

QUADRO 7 - Endonucleases de restrição utilizadas no estudo do polimorfismo de fragmentos obtidos por meio da restrição dos produtos da PCR (RFLP-PCR) para a diferenciação de espécies de *Leishmania* spp.

Endonuclease	Região a ser fragmentada	Autor
		Mohammadiha et al. ⁽⁹³⁾
Hae III	\downarrow -G-G-C-C- -C-C-G-G- \uparrow	Coura-Vital et al. ⁽¹⁰⁴⁾ Rocha et al. ⁽⁹¹⁾ Quaresma et al. ⁽⁹⁷⁾ De Andrade et al. ⁽⁸⁴⁾ Volpini et al. ⁽¹⁰⁷⁾

QUADRO 8 - Endonucleases de restrição utilizadas no estudo do polimorfismo de fragmentos obtidos por meio da restrição dos produtos da PCR (RFLP-PCR) para a diferenciação de espécies de *Leishmania* spp. (continuação)

Endonuclease	Região a ser fragmentada	Autor
BstU1	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ -C-G-C-G- \\ -G-C-G-C- \\ \uparrow \end{array} $	Haouas et al. ⁽¹⁰⁸⁾
Taq1	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ -T-C-G-A- \\ -A-G-C-T- \\ \uparrow \end{array} $	
ApaLI	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ -G-T-G-C-A-C- \\ -C-A-C-G-T-G- \\ \uparrow \end{array} $	De Andrade et al. ⁽⁸⁴⁾
MspI	—	Noé et al. ⁽²⁵⁾

A RFLP-PCR pode contribuir muito para identificação das espécies *Leishmania* spp.⁽⁸⁴⁾. Diferentes perfis de banda já formam descritos em espécies como *L. infantum*^(25, 84, 91, 93, 97), *L. braziliensis*⁽⁸⁴⁾ e *L. amazonensis*⁽⁹⁷⁾. Assim, a técnica é considerada específica⁽⁹¹⁾, podendo evitar a eutanásia de animais infectados por espécies não causadoras de LV, reduzindo os custos de tal procedimento em países em desenvolvimento⁽⁹⁷⁾. Ressalta-se que o uso deste método na pesquisa da leishmaniose felina tem sido evidenciado, tornando-o uma ferramenta de valor^(25, 59).

Outra variação da PCR utilizada no diagnóstico da leishmaniose é a PCR em tempo real, que apresenta alta sensibilidade⁽¹⁰⁹⁾. Esta tem como principal vantagem sua capacidade de quantificação e por isso é considerada uma ótima ferramenta na determinação da carga parasitária dos animais infectados por *Leishmania* spp.^(97, 110). Assim é possível auxiliar no acompanhamento da parasitemia em animais tratados, contribuindo para o desenvolvimento de novas vacinas ou fármacos⁽⁹⁸⁾.

2.4 Tratamento, profilaxia e controle

Considerando a espécie canina, o princípio ativo atualmente aceitável para o tratamento da leishmaniose visceral no Brasil é o Milteforam, autorizado recentemente pelo MAPA por meio da Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS (respeitando ao instituído pela Portaria

Interministerial nº1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA) ^(111, 112). No entanto, a combinação de drogas como antimoniato de meglumina (100mg/kg/dia, por via subcutânea) e alopurinol (10mg/kg/dia, via oral) ou o uso isolado de alopurinol já foram descritos⁽¹¹⁰⁾.

No caso dos gatos, embora possam servir como reservatórios de ambas as formas de leishmaniose⁽¹¹³⁾, estes ainda não estão inclusos na cadeia de transmissão da doença⁽²⁵⁾. Talvez por isso, até o momento não haja uma substância específica para o tratamento de felinos infectados por *Leishmania* spp⁽¹¹³⁾, tampouco procedimentos que auxiliem no controle e profilaxia direcionados a esses animais⁽²⁵⁾.

Entretanto, tendo em vista que qualquer animal saudável que viva ou visite áreas endêmicas necessita de proteção⁽³¹⁾, deve-se proceder com medidas de prevenção contra a infecção, o que inclui a aplicação de métodos de diagnóstico sensíveis, o uso de coleiras inseticidas e a pulverização com princípios eficazes⁽¹¹⁴⁾. Dentre as classes de agentes utilizados cita-se a deltametrina, lambdacyalotrina, alfacypermetrina, cypermetrina, cyflutrina, Betacyflutrina⁽³⁴⁾.

Os colares de liberação lenta têm duração de vários meses, sendo uma opção prática para a proteção dos animais contra os vetores de *Leishmania* spp.⁽³¹⁾. Há recomendação do uso de piretróides para repelir os flebotomíneos^(31, 115). Apesar desses agentes não serem indicados para a espécie felina devido a sua toxicidade⁽⁶⁹⁾, a coleira impregnada com flumetrina e imidacloprida é considerada uma opção confiável.⁽¹¹³⁾

Ainda como medida preventiva, a vacinação contra *L. infantum* pode ser usada para cães⁽³¹⁾. Nesse respeito, a vacina Leish-Tec®, do laboratório Hertape Calier Saúde Animal é a utilizada no Brasil, visto que apresenta registro concedido pelo MAPA⁽¹¹⁶⁾. A vacinação de felinos contra leishmaniose ainda não está prevista. Por tanto, ressalta-se a importância de pesquisas que contribuam para a melhoria da vigilância epidemiológica quando se trata dessa espécie.

3. REFERÊNCIAS

1. WHO. Weekly epidemiological record. World Health Organization; 2017. p. 557–72.
2. Pace D. Leishmaniasis. Journal of Infection. 2014;69 (Supplement 1):S10-S8.
3. Faria AR, Andrade HMd. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2012;3:47-57.

4. Brasil. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016 Portal da Saúde – Ministério da Saúde. ; 2017.
5. Brasil. Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016 Portal da Saúde – Ministério da Saúde 2017.
6. Brasil. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015 <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Coeficiente%20de%20Incidncia.pdf>: Ministério da Saúde; 2017
7. Afonso MMS, Chaves SAM, Magalhães MAFM, Gracie R, Azevedo C, Carvalho BMd, et al. Ecoepidemiology of American Visceral Leishmaniasis in Tocantins State, Brazil: Factors Associated with the Occurrence and Spreading of the Vector *Lutzomyia* (*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). In: Claborn D, editor. The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. Rijeka: InTech; 2017. p. Ch. 06.
8. Leishmaniose - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - Tocantins [Internet]. 2017. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvto.def>.
9. Santos HD, Galvão SR, Dias FEF, Ribeiro TMP, Negreiros Filho O, Sousa SAP, et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. Ciência Rural. 2017;47.
10. Organization WH. Leishmaniasis: World Health Organization; 2014 [Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>].
11. Jusi MM, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM, Tenorio Mda S, Sousa Lde O, Machado RZ. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011;20(3):219-22.
12. Mohebali M, Malmasi A, Khodabakhsh M, Zarei Z, Akhouni B, Hajjaran H, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Northwest Iran: The role of cats in endemic areas of visceral leishmaniosis. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. 2017;9:13-6.
13. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* to the natural vector. Vet Parasitol. 2013;196(3-4):296-300.
14. Can H, Döskaya M, Özdemir HG, Şahar EA, Karakavuk M, Pektaş B, et al. Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. Experimental Parasitology. 2016;167:109-14.
15. Da Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo ND, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Veterinary Parasitology. 2010;174(1-2):150-4.
16. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology. 2007;145(3-4):357-60.

17. Coelho WM, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani KD. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;176(2-3):281-2.
18. Nemati T, Khanmohammadi M, Bazmani A, Mirsamadi N, Koshki MHK, Mohebali M, et al. Study on Leishmania infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2015;5(1):40-3.
19. Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology.* 2011;27(8):341-4.
20. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):811-27.
21. Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008;41:365-8.
22. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1º ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. p. 120.
23. Vasoo S, Pritt BS. Molecular Diagnostics and Parasitic Disease. *Clinics in Laboratory Medicine.* 2013;33(3):461-503.
24. Marcelino AP, Souza, Filho JA. Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina2015 Dez, 01:[17 p.]. Available from: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2015/09/instru%C3%A7%C3%A9%C5%8B-teste-rapido-Alere-LVC-manual.pdf>.
25. Noé P, Domingos SL, Oshiro ET, Lima RB, Pirmez C, Pedroso TC, et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from visceral leishmaniasis endemic area in Brazil Ciência Animal [Internet]. 2015 15 Out 2017; 25(4):[03-14 pp.]. Available from: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo01_2015_4.pdf.
26. Simoes-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata-Junior RC, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology.* 2005;127(3-4):199-208.
27. Resolução - CIB/TO N°. 011/2017, 22 de fevereiro de 2017., N°. 011/2017 (2017).
28. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(5):577-9.
29. Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2009;11(8):728-30.

30. Hart DT. Cutaneous and visceral leishmaniasis: a historical perspective Cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1985;79(5):740-1.
31. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*. 2011;181(1):23-30.
32. Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet Parasitol*. 2014;202.
33. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de vigilância epidemiológica. 7 ° ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 813.
34. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
35. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;305-18.
36. Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Gomes AC. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. *BEPA Boletim Epidemiológico Paulista* (Online). 2007;4:02-7.
37. Sergent E, Sergent E, Lombard J, Quilichini M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull Soc Pathol Exot [Internet]*. 1912; 5:[93-8 pp.].
38. Ruiz RM, Ramírez NN, Alegre AE, Bastiani CE, De Biasio MB. Detección de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en gato doméstico de Corrientes, Argentina, por técnicas de biología molecular. *Revista veterinaria*. 2015;26:147-50.
39. Morsy TA, Abou el Seoud SM. Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol*. 1994;24(1):199-204.
40. Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors*. 2014;7.
41. Nasreddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol*. 2008;158.
42. Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, et al. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;45:53-8.

43. Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012;35.
44. Maia C, Ramos C, Coimbra M, Cardoso L, Campino L. Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology International*. 2015;64(2):154-6.
45. Deane L, Deane M. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* [Internet]. 1962; 4:[198-212 pp.].
46. Savani E, Camargo M, De Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SRN, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2004;120(3):229-33.
47. Coelho WM, Lima VM, Amarante AF, Langoni H, Pereira VB, Abdelnour A. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19.
48. Pennisi M-G, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):302.
49. Dincer E, Gargari S, Ozkul A, Ergunay K. Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(4):690-7.
50. Sobrinho LSV, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, de Lima VMF, et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2012;187(1-2):302-6.
51. Pennisi MG, Lupo T, Malara D, Masucci M, Migliazzo A, Lombardo G. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *J Feline Med Surg*. 2012;14.
52. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*. 2010;174(1-2):37-42.
53. Ayllon T, Tesouro MA, Amusategui I, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. In: Sparagano OAE, Maillard JC, Figueroa JV, editors. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Prediction and Prevention*. Annals of the New York Academy of Sciences. 11492008. p. 361-4.
54. Martin-Sanchez J, Acedo C, Munoz-Perez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Marquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*. 2007;145(3-4):267-73.

55. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2011;178(1-2):22-8.
56. Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;128.
57. Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira SA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;98(3):165-7.
58. Rougeron V, Catzeflis F, Hide M, De Meeus T, Banuls AL. First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. *Veterinary Parasitology*. 2011;181(2-4):325-8.
59. Metzdorf IP, Da Costa Lima Junior MS, de Fatima Cepa Matos M, de Souza Filho AF, de Souza Tsujisaki RA, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*. 2017;166:121-5.
60. Costa T, Rossi C, Laurenti M, Gomes A, Vides J, Sobrinho L, et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. São Paulo: Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science; 2010. p. 213-7.
61. Sherry K, Miró G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11.
62. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*. 2002;106.
63. Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10.
64. Vita S, Santori D, Aguzzi I, Petrotta E, Luciani A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet Res Commun*. 2005;29 Suppl 2:319-21.
65. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebelo E. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol*. 2010;174.
66. Hervas J, Chacón-M De Lara F, Sanchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, et al. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *Journal of Feline Medicine & Surgery*. 1999;1(2):101-5.
67. Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(4):555-9.

68. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008;175(1):45-52.
69. Bourdoiseau G. Leishmaniose féline : actualités. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.* 2011;46(1):23-6.
70. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology.* 2008;158(4):274-87.
71. Gradoni L, Gramiccia M. Leishmaniosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). 6 ed. Paris: Office International des Epizooties; 2008. p. 240–50.
72. Athanasiou LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS. Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Veterinary Parasitology.* 2013;192(1–3):91-7.
73. Cardia DFF, Camossi LG, Neto LdS, Langoni H, Bresciani KDS. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2013;197(3–4):634-7.
74. Chatzis MK, Leontides L, Athanasiou LV, Papadopoulos E, Kasabalis D, Mylonakis M. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp Parasitol.* 2014;147.
75. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1-88.
76. Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, da Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, et al. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cassia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical.* 2009;42(2):141-5.
77. Hasnain MG, Ghosh P, Baker J, Mondal D. An evaluation of the performance of direct agglutination test on filter paper blood sample for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(2):342-4.
78. Lopes AP, Oliveira AC, Granada S, Rodrigues FT, Papadopoulos E, Schallig H, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic cats from Luanda, Angola. *Veterinary Parasitology.* 2017;239:15-8.
79. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* [Internet]. 2004 05 mai 2014; 7(3):[338-49 pp.]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v7n3/11.pdf>.
80. Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76.

81. Solcà MdS, Guedes CES, Nascimento EG, Oliveira GGdS, Santos WLcd, Fraga DBM, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*. 2012;184(2–4):133-40.
82. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(1):12-7.
83. Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MF, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2007;144(3-4):234-41.
84. De Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol*. 2006;140(3-4):231-8.
85. De Assis J, de Queiroz NM, da Silveira ReC, Nunes CM, Oliveira TM, Junior AC, et al. [Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira, SP]. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19(1):17-25.
86. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. 2004;125(3–4):251-62.
87. Oliveira TMFS, Pereira VF, Benvenga GU, Martin MFA, Benassi JC, Silva DTd, et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2015;24:220-2.
88. Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;64(0):196-211.
89. Lodish, Berk, Matzudaira, Kaiser, Krieger, Scott, et al. *Molecular Cell Biology*. 5° ed2004. 961 p.
90. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(1):210-5.
91. Rocha MN, Margonari C, Presot IM, Soares RP. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;68(4):401-9.
92. Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 2016;164(Supplement C):43-8.
93. Mohammadiha A, Haghghi A, Mohebali M, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct

agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. Veterinary Parasitology. 2013;192(1-3):83-90.

94. Mohammadiha A, Mohebali M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. Experimental Parasitology. 2013;133(1):89-94.
95. Lachaud L, Chabbert E, Dubessy P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology. 2002;125(Pt 3):197-207.
96. De Paiva Cavalcanti M, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y, Abath FGC. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. The Veterinary Journal. 2009;182(2):356-8.
97. Quaresma PF, Murta SM, Ferreira EeC, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop. 2009;111(3):289-94.
98. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology. 2006;137(3-4):214-21.
99. De Queiroz NM, da Silveira RC, de Noronha AC, Jr., Oliveira TM, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet Parasitol. 2011;178(1-2):1-8.
100. Nunes C, Dias A, Gottardi F, De Paula H, De Azevedo M, De Lima V, et al. Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase para diagnóstico da Leishmaniose Visceral em sangue de cães Rev Bras Parasitol Vet [Internet]. 2007; 16(1):[5-9 pp.]. Available from: http://www.rbpv.ufrrj.br/documentos/1612007/c1615_9.pdf.
101. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Exp Parasitol. 1990;71(3):267-75.
102. Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. Experimental Parasitology. 2017;177:93-7.
103. Reithinger R, Quinnell R, Alexander B, Davies C. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. Jornal of Clinical Microbiology [Internet]. 2002; 40(7):[2352-6 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120577/>.
104. Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(8):e1291.

105. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2005;129(3-4):219-27.
106. Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994;89(3):463-9.
107. Volpini ÂC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. *PCR-RFLP to identify Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*. 2004;90(1):31-7.
108. Haouas N, Garrab S, Gorcii M, Khorchani H, Chargui N, Ravel C, et al. Development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for *Leishmania major/ Leishmania killicki/ Leishmania infantum* discrimination from clinical samples, application in a Tunisian focus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;68(2):152-8.
109. Naranjo C, Fondevila D, Altet L, Francino O, Ríos J, Roura X, et al. Evaluation of the presence of *Leishmania* spp. by real-time PCR in the lacrimal glands of dogs with leishmaniosis. *The Veterinary Journal*. 2012;193(1):168-73.
110. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*. 2008;177(2):279-82.
111. Brasil. Nota Técnica Conjunta n° 001/2016
MAPA/MS <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf> Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); 2016.
112. SBMT. Tratamento de cães com LVC fica autorizado com o Milteforan® <http://www.sbmt.org.br/portal/tratamento-de-caes-com-lvc-fica-autorizado-com-o-milteforan/>: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (SBMT); 2016.
113. Noé P, Babo-Terra VJ. Leishmaniose felina - revisão de literatura. *Clínica Veterinária*. 2016:p. 56-8.
114. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*. 2012;28(12):531-8.
115. Maia-Elkhouri ANS, Alves WA, Sousa-Gomes MLd, Sena JMd, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*. 2008;24:2941-7.
116. Nota de Esclarecimento sobre as vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA, (2009).

CAPÍTULO 2- ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM *Felis catus domesticus* DE ÁREA ENDÊMICA URBANA NO NORTE DO BRASIL

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma zoonose de distribuição mundial que tem o cão doméstico como principal reservatório doméstico. Devido a expansão geográfica e à urbanização dessa enfermidade, estados brasileiros como o Tocantins vêm relatando um número de casos humanos cada vez maior, o que reflete a importância da infecção em saúde pública. Nesse contexto, possíveis reservatórios adicionais como os gatos têm sido estudados. O objetivo do estudo foi avaliar a soropositividade de felinos domésticos para *Leishmania* spp. no município de Araguaína, estado do Tocantins, região endêmica para a zoonose, e associá-la a possíveis fatores de risco, como características individuais dos animais, presença de sinais clínicos e possíveis co-infecções. Amostras de soro de 84 felinos domésticos, sendo 47 fêmeas e 37 machos, foram analisadas por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Considerou-se como positivos os animais com título ≥ 40 . As amostras de soro também foram testadas para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) por meio do teste SNAPshot Dx, IDEXX®. A frequência de anticorpos anti- *Leishmania* spp. foi de 26,2% (22/84) (IC: 17,2% - 36,9%), sendo que o título de 40 foi o mais frequente. Entre estes, 9,09% (2/22) apresentaram esplenomegalia, 13,63% (3/22) hepatomegalia, 13,63% (3/22) lesão de pele, 4,54% (1/22) lesão ocular e 45,45% (10/22) linfadenomegalia. Tratando-se dos animais sintomáticos, 29,3% (12/41) foram reativos. Variáveis como sexo, comprimento do pelo, cor da pelagem, estado corporal, idade, raça e presença de sinais clínicos não tiveram associação com a soropositividade ($p>0,05$). Dentre os animais reativos para *Leishmania* spp., 22,7% (5/22) (IC: 0,74% - 10,12%) reagiram para FeLV, sendo que um deles também mostrou positividade para FIV. Não houve associação entre essas infecções e a leishmaniose em felinos ($p=0,1189$). A frequência de anticorpos anti- *Leishmania* spp. aqui observada pode estar relacionada ao comportamento da enfermidade na região, que é considerada área de transmissão intensa para leishmaniose visceral humana e canina. Os resultados obtidos aletam para a possibilidade de inclusão da espécie felina como sendo hospedeira da leishmaniose visceral na região. Assim, chama-se atenção para o emprego de medidas de controle que envolvam os gatos, principalmente em áreas favoráveis ao desenvolvimento dos vetores.

Palavras-chave: gato; leishmaniose visceral; reação de imunofluorescência indireta; zoonose

ANTI-*Leishmania* spp. ANTIBODIES IN *Felis catus domesticus* OF URBAN ENDEMIC AREA IN NORTH OF BRAZIL

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a zoonosis of worldwide distribution that has the domestic dog as the main domestic reservoir. Due to the geographic expansion and urbanization of this disease, Brazilian states such as Tocantins have been reporting a growing number of human cases, which reflects the importance of public health infection. In this context, possible additional reservoirs such as cats have been studied. The objective of the study was to evaluate the seropositivity of domestic felines to *Leishmania* spp. in the municipality of Araguaína, state of Tocantins, an endemic region for zoonosis, and associate it with possible risk factors, such as individual animal characteristics, presence of clinical signs and possible co-infections. Serum samples

from 84 domestic cats, 47 females and 37 males, were analyzed by means of the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). Animals with a titre ≥ 40 were considered positive. Serum samples were also tested for feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) by the SNAPshot Dx, IDEXX® test. The frequency of anti-*Leishmania* spp. was 26.2% (22/84) (CI: 17.2% - 36.9%), and the 40 titer was the most frequent. Among these, 9.09% (2/22) had splenomegaly, 13.63% (3/22) hepatomegaly, 13.63% (3/22) skin lesion, 4.54% (1/22) ocular lesion and 45.45% (10/22) lymphadenomegaly. As for the symptomatic animals, 29.3% (12/41) were reactive. Variables such as sex, hair length, coat color, body condition, age, breed and presence of clinical signs had no association with seropositivity ($p > 0.05$). Among the animals reactive to *Leishmania* spp., 22.7% (5/22) (CI: 0.74% - 10, 12%) reacted to FeLV, one of which also showed positivity for IVF. There was no association between these infections and leishmaniasis in felines ($p = 0.1119$). The frequency of anti-*Leishmania* spp. observed here may be related to the behavior of the disease in the region, which is considered an intense transmission area for human and canine visceral leishmaniasis. The results obtained highlight the possibility of inclusion of the feline species as host of visceral leishmaniasis in the region. Thus, we call attention to the use of control measures involving cats, especially in areas favorable to the development of vectors.

Keywords: cat; visceral leishmaniasis; immunofluorescence antibody test; zoonosis

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) constitui-se em uma grave zoonose, com grande impacto em saúde pública, uma vez que pode ser fatal⁽¹⁾. A enfermidade ocorre principalmente no Brasil, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia, Quênia e Somália, que juntos são responsáveis por 90% dos casos humanos globais registrados perante à Organização Mundial de Saúde⁽¹⁾.

O Brasil enfrenta expansão geográfica e urbanização da LV, havendo uma correlação entre o desmatamento e a possível emergência de surtos, já que a doença persiste em áreas com mudanças ambientais. Nesse respeito, o aumento de áreas desmatadas permaneceu constante no estado do Tocantins, que também mostrou expansão no registro de casos humanos, especialmente no município de Araguaína, considerado área de transmissão intensa⁽²⁾.

Nesse estado, o número de casos humanos da doença registrados entre os anos de 2000 e 2015 foi de 4.476 em 124 de seus 139 municípios⁽²⁾. Só no município de Araguaína, em 2015, foram notificados 79 dos 203 casos humanos notificados no estado⁽³⁾. Ressalta-se ainda que a cidade apresenta elevada frequência de leishmaniose visceral canina (LVC)⁽⁴⁾.

A enfermidade é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*⁽⁵⁾ e embora seu principal reservatório doméstico e peridoméstico seja o cão^(6, 7), a espécie felina vem sendo amplamente estudada^(8, 9). Nesse contexto, o potencial de transmissão do parasito do gato doméstico para vetores como *Lutzomyia longipalpis*⁽¹⁰⁾ e *Phlebotomus perniciosus*⁽¹¹⁾ já é conhecido por meio do xenodiagnóstico, sugerindo-o como um reservatório doméstico

adicional da doença⁽¹⁰⁾. Atualmente no Brasil, duas espécies vetoras estão relacionadas com a transmissão da LV. Trata-se da *L. cruzi* e da *L. longipalpis*, considerada a principal⁽¹²⁾. Esta espécie comporta-se como o elo mais importante da transmissão e a sua clara urbanização tem sido o principal desafio para a vigilância e controle da leishmaniose. No tocante à urbanização de *L. longipalpis*, no estado do Tocantins, por exemplo, há distribuição uniforme desse vetor e sua ocorrência está relacionada a municípios onde há registros de casos humanos autóctones (Figura 6)⁽²⁾.

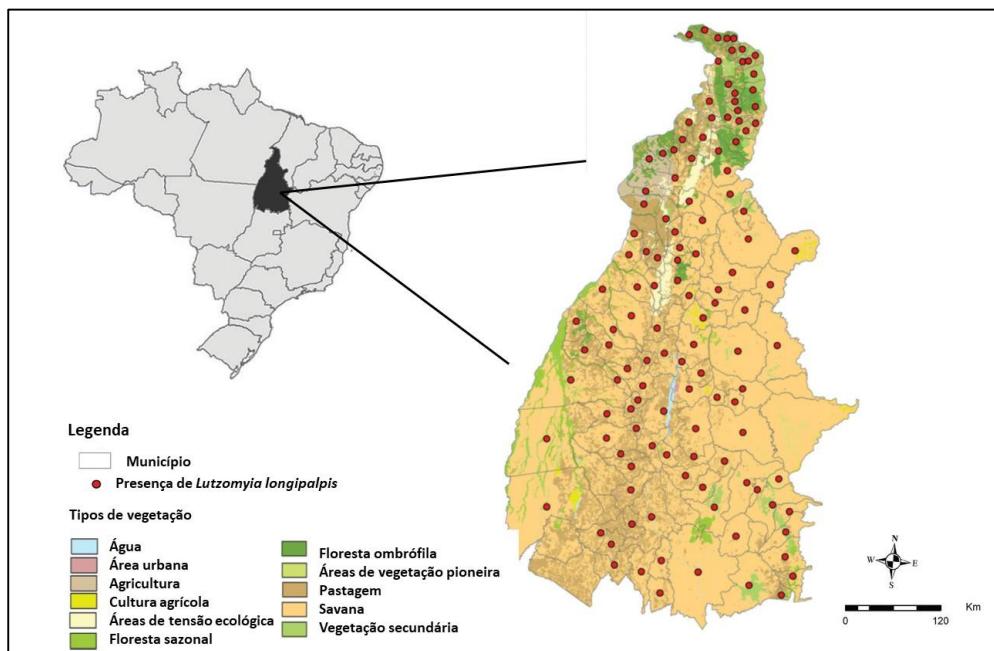


FIGURA 6- Presença de *Lutzomyia longipalpis* no estado do Tocantins.

Fonte: Adaptado de Afonso et al.⁽²⁾

Estudos realizados em países como Portugal^(13, 14), Irã^(9, 15), Turquia⁽¹⁶⁾, Itália⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, México⁽²⁰⁾, Espanha⁽²¹⁾, Grécia⁽²²⁾ e Jerusalém⁽²³⁾ demonstraram a presença de anticorpos contra antígenos de *L. infantum*, apontando para a distribuição mundial da infecção felina. No Brasil, a doença já foi constatada em felinos dos estados de Pernambuco⁽²⁴⁾, Pará⁽²⁵⁾, São Paulo⁽²⁶⁻³⁰⁾ e Mato Grosso do Sul^(31, 32).

Tratando-se de diagnóstico, embora as técnicas moleculares representem um grande avanço no diagnóstico da leishmaniose, principalmente devido a sua elevada acurácia⁽³³⁾, métodos sorológicos, tais como o Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA), a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)⁽¹²⁾ e o teste de aglutinação direta (*Direct agglutination test* -DAT) também são utilizados⁽¹⁴⁾. Apesar da disponibilidade

destes métodos, há exceções quanto à situação em que os mesmos são empregados. Em cães por exemplo, o Ministério da Saúde do Brasil preconiza o uso do como o O DPP® (Dual Path Platform, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), um teste rápido imunocromatográfico (TRI) para e triagem e o ELISA como teste confirmatório da doença⁽³³⁾.

Para o diagnóstico da infecção felina, a Reação de Imunofluorescência Indireta tem mostrado resultados satisfatórios. Diferentes frequências foram obtidas em países como Espanha (28,3% - 183⁽³⁴⁾, 3,2% - 346⁽²¹⁾, 1,29% - 233⁽³⁵⁾), Itália (30% - 90⁽¹⁷⁾, 16,3% - 203⁽³⁶⁾, 6,9% de 419⁽¹⁸⁾, 0,9% de 110⁽³⁷⁾) Portugal (1,3% de 76⁽³⁸⁾, 0,6% de 180⁽³⁹⁾) e Turquia (15,2% de 1101)⁽¹⁶⁾. Assim, o emprego desta técnica pode ser bastante útil em estudos epidemiológicos⁽⁴⁰⁾.

Como a maioria dos casos de infecção felina parece concentrar-se em áreas endêmicas⁽⁴¹⁾, com relatos prévios de infecção canina e humana⁽⁴²⁾, pesquisas envolvendo a espécie em regiões não estudadas, como o Estado de Tocantins, são de grande importância. Diante do exposto, este estudo foi conduzido com o objetivo de verificar a soropositividade de felinos domésticos para *Leishmania* spp. por meio da RIFI no município endêmico de Araguaína, estado do Tocantins, e associá-la a possíveis fatores de risco, como características individuais dos animais, presença de sinais clínicos e possíveis co-infecções.

2. MATERIAL E MÉTODOS

População estudada

A população estudada originou-se da cidade de Araguaína, situada no extremo norte do estado do Tocantins. A cidade compreende uma área de 4000,4 Km², com latitude de 7°11'26" sul, longitude de 48°12'28" oeste e altitude de 236m, apresenta clima tropical úmido, com temperatura máxima de 32°C e mínima de 20°C⁽⁴³⁾, e uma população em torno de 173.112 habitantes⁽⁴⁴⁾.

Um total de 84 felinos recebidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína e/ou submetidos a atendimento médico veterinário foram amostrados por conveniência conforme a taxa de recolhimento/procedimentos clínicos realizados. Esses animais foram classificados em jovens (<6 meses) e adultos (>6 meses) e a condição corporal foi dividida em escore bom (>4/9) e escore ruim (<3/9), de acordo com Spada et al.⁽¹⁷⁾ No momento da coleta das amostras foram obtidos dados como raça, cor e comprimento do pelo e presença de sinais clínicos (lesão de pele, lesão ocular, linfoadenomegalia, hepatomegalia e/ou esplenomegalia)

de parte dos animais. Essas características foram analisadas como possíveis fatores de risco, embora sua avaliação não tenha sido possível para todos os animais.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins sob o protocolo número 23101.0000874-38.

Amostras biológicas

As amostras foram coletadas no período de 2015-2017. Para tal, foi realizada sedação do animal com Ketamina (10mg/Kg) e antisepsia local com álcool a 70%. Logo após procedeu-se com a punção da veia jugular com agulha 25x12mm acoplada a seringa estéril de 5mL. Cada amostra foi depositada em tubo sem anticoagulante, e em seguida centrifugada a 2.500 r.p.m., durante 10 minutos. As frações séricas foram transferidas para microtubos e estocadas a -20 °C para posterior processamento.

Produção de antígeno

Para a produção do antígeno, foram usadas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) cultivadas em meio RPMI. Após um período mínimo de cinco dias a partir do último repique, as culturas foram centrifugadas a 2.800 rpm por 10 minutos, sendo o *pellet* ressuspensos e lavado três vezes em 10mL de PBS a 0,01 M, pH 7,2. Em seguida, os parasitos foram fixados em solução de paraformaldeído diluído em PBS a 4% por duas horas sob agitação de 15 rpm (Homogeneizador k45-1510, Kasvi®) e novamente lavados três vezes em PBS. O sedimento foi ressuspensido em PBS até atingir uma concentração de 4×10^6 promastigotas/mL de acordo com Pedras et al.⁽⁴⁵⁾.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

O teste baseou-se na metodologia descrita por Pedras et al.⁽⁴⁵⁾. Após sensibilização (10 μ l de antígeno a 37°C por 2 horas) e deposição de 10 μ l de soro diluído em PBS a partir da diluição 1:20, as lâminas foram incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida, as mesmas foram submetidas a três lavagens em PBS por três minutos, uma lavagem rápida em água destilada e a secagem em estufa a 37 °C por 10 minutos. A diluição do conjugado em PBS contendo 0,004% de Azul de Evans foi estabelecida em 1:100. Foi utilizado anticorpo anti-IgG de gato conjugado à Fluoresceína (*Goat anti-Cat Fite Affinity*, Life tech®). Procedeu-se então com adição de 10 μ l de conjugado.

As etapas finais incluíram repetição das incubações, lavagens e secagens, conforme descrito anteriormente. Ao final da reação duas gotas de glicerina tamponada foram depositadas

sobre as lâminas. Estas foram cobertas com lamínula e examinadas em Microscópio fluorescente equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100 W com potência de ampliação de 400x. Foram consideradas positivas amostras com titulação ≥ 40 . A leitura foi realizada por dois examinadores e foram consideradas positivas as amostras que exibiram fluorescência de membrana ou citoplasma, semelhante ao descrito por Chatzis et al.⁽⁴⁶⁾. Amostras que tiveram resultados discordante entre os examinadores foram testadas novamente.

Co-infecção por FIV e FeLV

As amostras de soro foram testadas para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) por meio do teste imunocromatográfico SNAPshot Dx, IDEXX® de acordo com as intruções do fabricante.

Análise estatística

As associações entre o resultado da sorologia e as variáveis sexo, idade, raça, sinais clínicos e co infecções foram avaliadas utilizando-se o teste Qui-quadrado (χ^2) ou Exato de Fischer (em variáveis com $<$ cinco observações), com erro estatístico de 5% e $p < 0,05$. A análise foi realizada com auxílio do programa Epi Info 3.5.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas amostras de soro de 84 animais. Dentre estes, 47 eram fêmeas e 37 machos. A frequência de anticorpos contra *Leishmania* spp., a partir da diluição 1:40, foi de 26,2% (22/84), com IC de 17,2% - 36,9%. O título de 40 foi o mais frequente entre os animais. A maior titulação observada foi de 1280, responsável por 9,1% das amostras positivas (Tabela 1).

TABELA 1 – Relação de títulos de anticorpos anti- *Leishmania* spp. obtidos de felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins, submetidos à RIFI no período de 2015 a 2017.

Título	Frequência	Porcentagem (%)	Intervalo de confiança
40	9	40,9	20,7 - 63,6
80	5	22,7	7,8 - 45,4
160	4	18,2	5,2 - 40,3
640	2	9,1	1,1 - 29,2
1280	2	9,1	1,1 - 29,2
Total	22	100%	-

A frequência obtida aqui assemelha-se ao observado em animais do Irã (24,27%)⁽¹⁵⁾, Espanha (28,3%)⁽³⁴⁾ e também do estado brasileiro de São Paulo (25,45%)⁽²⁸⁾. Considerado significativo, esse resultado pode ser justificado pelo fato do município de Araguaína ser endêmico para leishmaniose visceral humana e canina^(2, 4), apresentando constante presença do vetor *L. longipalpis*⁽²⁾. Partindo desse pressuposto, são relevantes as possibilidades da espécie envolvida na infecção felina ser identificada como *L. (L.) infantum chagasi*.

A presença da infecção felina foi relatada em animais de vários países do mundo, como por exemplo, Turquia⁽¹⁶⁾, Portugal^(13, 14), Grécia⁽²²⁾, México⁽²⁰⁾ e Israel⁽²³⁾, todos utilizando a sorologia como método de diagnóstico. De forma geral, a maior e a menor frequência já encontradas por pesquisadores foram: 30%, observada na Itália⁽¹⁷⁾ e 0,52%, evidenciada no Brasil⁽²⁶⁾, respectivamente. Esses dados auxiliam na visualização da distribuição mundial da leishmaniose felina e servem de alerta quanto à infecção, chamando atenção para a necessidade de medidas de controle que envolvam os gatos domésticos.

Assim como o município de Araguaína, em outras regiões endêmicas brasileiras foi apontada a presença de anticorpos anti- *Leishmania* spp., como é o caso da cidade de Araçatuba, no estado de São Paulo (Tabela 2). Informações como essa fortalecem a afirmação de que locais onde hajam relatos prévios de infecção canina e humana sejam áreas de risco para o surgimento da leishmaniose felina^(41, 42).

TABELA 2 - Registros epidemiológicos da presença de anticorpos anti- *Leishmania* spp. em felinos do Brasil nos últimos nove anos.

Autor	Localidade	Ano	Número de amostras	Frequência (%)	Teste	Antígeno usado
Noé et al. ⁽³¹⁾	Campo grande - Mato Grosso do Sul	2015	110	7,27	RIFI	<i>Leishmania chagasi</i>
Oliveira et al. ⁽²⁵⁾	Belém – Pará	2015	443	4,06 e 5,64	RIFI e DAT	<i>L. major</i>

TABELA 2 - Registros epidemiológicos da presença de anticorpos anti- *Leishmania* spp. em felinos do Brasil nos últimos nove anos (continuação).

Autor	Localidade	Ano	Número de amostras	Frequência (%)	Teste	Antígeno usado
Cardia et al. ⁽²⁶⁾	Araçatuba - São Paulo	2013	386	0,52	RIFI	<i>Leishmania</i> spp.
Sobrinho et al. ⁽²⁷⁾	Araçatuba - São Paulo	2012	302	4,64 e 12,91	RIFI e ELISA- prot A CAG-	<i>L. chagasi</i>
Neto et al. ⁽²⁹⁾	Araçatuba - São Paulo	2011	113	13,3, 15,9 e 23	ELISA; RK39- ELISA; e FML- ELISA	<i>L. chagasi</i>
Bresciani et al. ⁽³⁰⁾	Araçatuba - São Paulo	2010	283	0,7	RIFI	<i>Leishmania</i> spp.
Costa et al. ⁽⁴⁷⁾	Araçatuba - São Paulo	2010	200	14,5	ELISA- IgG	<i>L. chagasi</i>
Silva et al. ⁽²⁴⁾	Pernambuco	2010	153	3,9	ELISA	<i>L. chagasi</i>
Vides et al. ⁽²⁸⁾	Araçatuba - São Paulo	2009- 2008	55	25,45 e 10,9	ELISA- prot A, e RIFI	<i>L. chagasi</i>

O ponto de corte estabelecido para a RIFI foi 40, mas alguns animais apresentaram titulações de até 1280, o que pode representar a infecção ativa. Os pontos de corte sugeridos para essa reação em gatos são 200⁽⁴⁸⁾, 100⁽²¹⁾, 80⁽¹⁸⁾ e 40^(16, 17, 26-28, 34, 39, 42, 49, 50). Esta última é a

titulação mais utilizada, estando de acordo com o procedimento aqui adotado. Apesar disso, vale ressaltar que até o momento não há um consenso em relação a esse valor para LV em felinos⁽¹⁶⁾.

Analizando a variável sexo, 24,3% (9/37) dos machos e 27,3% (13/47) das fêmeas foram positivos. A positividade foi maior em animais de pelo curto (31,8%), pelagem escura (35,7%), com escore corporal bom (29,8%), jovens (33,33%) e da raça Siamesa (40%). Entretanto, nenhuma dessas variáveis apresentou associação estatisticamente significativa com a soropositividade ($p>0,05$) (Tabela 3).

TABELA 3 – Fatores relacionados à infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins, no período de 2015 a 2017.

Variável	N	+	(%)	OR	IC	P
Comprimento do pelo						0,162
Curto	66	21	(31,8)			
Longo	5	0	(0)			
Cor da pelagem				0,469	(0,114 - 1,933)	0,243
Clara	29	6	(20,7)			
Escura	14	5	(35,7)			
				3,441	(0,632 - 18,721)	0,131
Mista ou rajada	26	9	(34,6)			
NI	15	2	(13,3)			
Estado corporal				1,487	(0,279 - 7,908)	0,488
Bom	57	17	(29,8)			
Ruim	9	2	(22,2)			
Idade				0,724	(0,062 - 8,407)	0,613
Adulto	79	21	(26,6)			
Jovem	3	1	(33,33)			
Raça				1,921	(0,295 - 12,497)	0,405
SRD	66	17	(25,8)			
Siamês	5	2	(40)			
Sexo				1,189	(0,443- 3,189)	0,924
Fêmea	47	13	(27,3)			
Macho	37	9	(24,3)			

N: número de animais; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de p; NI: não informado; SRD: sem raça definida.

Tratando-se desta variável, Sobrinho et al.⁽²⁷⁾ observaram associação ($p=0,0316$) entre machos e a ocorrência da infecção ao estudarem felinos de uma área endêmica. Em região também endêmica Cardoso et al.⁽¹⁴⁾ encontraram diferença significativa entre os valores de soroprevalência em fêmeas e machos ($p = 0,045$ com IC: 2,1-9,1), tendo a última condição constituindo-se fator de risco para a doença. É sugestivo que ao percorrer maiores distâncias a procura das fêmeas, o contato do macho com o vetor da leishmaniose seja facilitado.

Apesar dessa possível tendência, Nasereddin et al.⁽²³⁾ não evidenciaram nenhuma predisposição em relação ao sexo. Ressalta-se que, ao contrário dos autores citados anteriormente, em sua pesquisa esses últimos pesquisadores trabalharam com amostragem inferior a 300 animais, o que pode ser um ponto importante para justificar tal achado. De modo similar, os resultados obtidos no presente estudo foram advindos de uma amostragem pequena. Reforça-se então a importância de considerar um número maior de animais em estudos epidemiológicos.

Diferente do observado aqui com relação à idade dos gatos estudados, há evidências de que maior frequência de positivos ocorra em animais adultos⁽¹⁴⁾. Apesar do aumento da idade possibilitar maior chance de infecção, é possível que em áreas de elevada incidência da LV, a presença do vetor em diversos ambientes favoreça a infecção de forma homogênea, atingindo todas as idades. Comparado às variáveis estudadas, alguns autores relataram que fatores intrínsecos, como raça, faixa etária e sexo parecem não influenciar na susceptibilidade de cães^(30, 51), corroborando com o que foi aqui observado para os gatos.

Os felinos pesquisados foram provenientes de área urbana, aspecto importante, uma vez que diferentes ambientes podem influenciar no surgimento de condições para multiplicação de vetores. Com relação a este tópico, Cardoso et al.⁽¹⁴⁾ observaram diferença significativa ($p < 0,001$ com IC: 4,7-19,7) entre os gatos soroprevalentes de ambiente rural e aqueles de áreas urbanas, sendo os gatos de ambientes rurais mais pré-dispostos à infecção. Porém, com o avanço da leishmaniose visceral para os centros urbanos, é possível que este padrão de ocorrência a doença sofra alterações com a evolução da doença felina nas cidades.

Dentre os animais sintomáticos, 29,3% (12/41) foram reativos. Considerando-se os positivos, observou-se que 9,09% destes apresentaram esplenomegalia (2/22), 13,63% hepatomegalia (3/22), 13,63% lesão de pele (3/22), 4,54% lesão ocular (1/22) e 45,45% linfadenomegalia (10/22). Embora sinais como hepatomegalia, lesão de pele e linfadenomegalia tenham sido observados com maior frequência, nenhum deles teve associação com a soropositividade dos animais (Tabela 4).

Com relação aos animais assintomáticos positivos (23,3% - 10/43), Noé et al.⁽³¹⁾ mencionam que a não manifestação dos sinais pode ser resultado do controle da infecção ou da detecção após a diminuição ou eliminação do parasito. De acordo com esses autores, resultados assim indicam resistência natural dos gatos à infecção por *Leishmania* spp.

Alterações dermatológicas, tais como alopecia, eritema e úlceras, foram os principais sinais clínicos encontrados nos estudos de Vides et al.⁽²⁸⁾. Outros autores evidenciaram ainda uma associação positiva ($p=0,028$) entre sinais clínicos cutâneos e a infecção por *L. infantum*

⁽⁵²⁾. No entanto, como reportado neste trabalho, há relatos de não associação entre soropositividade^(14, 46) ou título⁽¹⁵⁾ e estado de saúde dos gatos.

TABELA 4 – Sinais clínicos relacionados à infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins, no período de 2015 a 2017.

Varável	N	+ (%)	OR	IC	P
Sinal Clínico			1,365	(0,514 -3,624)	0,705
Sintomático	41	12 (29,3)			
Assintomático	43	10 (23,3)			
Esplenomegalia			6,100	0,524 - 70,904	0,166
Sim	3	2 (66,7)			
Não	81	20 (24,7)			
Hepatomegalia			4,736	(0,735 -30,493)	0,109
Sim	5	3 (60)			
Não	79	19 (24,1)			
Lesão de pele			0,386	(0,101 - 1,467)	0,124
Sim	21	3 (14,3)			
Não	63	19 (30,2)			
Lesão ocular			0,936	(0,092 -9,505)	0,710
Sim	4	1 (25)			
Não	80	21 (26,3)			
Linfadenomegalia			2,037	(0,747 - 5,551)	0,254
Sim	28	10 (35,7)			
Não	56	12 (21,4)			

N: número de animais; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de p; NI: não informado; SRD: sem raça definida.

A frequência de linfadenomegalia observada neste estudo corrobora com os registros de Vita et al.⁽³⁶⁾, que constataram a presença de linfadenomegalia e descarga ocular (15,8%) perda de peso, descarga nasal, lesões oculares e cutâneas (9,7%) e aumento generalizado dos linfonodos (6,5%) em felinos com leishmaniose visceral na região de Abruzzo, na Itália⁽³⁶⁾. Por outro lado, embora sinais como espleno e hepatomegalia ainda não tenha sido descrito em outras pesquisas com felinos, estes são classificados como um dos mais comuns em cães infectados⁽⁵³⁾.

Pondera-se, com base nos resultados obtidos e nos reportados em outras pesquisas, que embora não sejam considerados marcadores para a infecção, a presença de lesões cutâneas e linfadenomegalia, por exemplo, pode auxiliar no diagnóstico clínico da leishmaniose visceral felina.

A frequência da infecção por FIV e/ou FelV foi de 13,1% (IC: 6,7% - 22,2%) (11/84). Com referência à presença de co-infecção, 22,7% (OR: 2,7451; IC: 0,7444 – 10,1236) (5/22) dos animais que apresentaram anticorpos para *Leishmania* spp. foram reativos para FelV, sendo

que um deles também mostrou positividade para FIV. No entanto, não foi constatada associação entre essas viroses e a leishmaniose ($p=0,1189$). Apesar desse fato, há relatos da associação entre leishmaniose visceral e a infecção pelo FIV⁽²⁷⁾ e Coronavírus Felino (FCoV)⁽¹⁷⁾. De acordo com Martín-Sánchez et al.⁽³⁴⁾, infecções como essas podem contribuir para diferentes condições imunossupressoras nos gatos, o que poderia favorecer a multiplicação de *Leishmania* spp.

4. CONCLUSÃO

Anticorpos anti- *Leishmania* spp. estão presentes em felinos de Araguaína, Tocantins.

Sexo, comprimento e cor da pelagem, escore corporal, idade, presença de sinais clínicos e co-infecções por FIV e FeLV não se constituem em fatores de risco para a infecção pelo protozoário em gatos do município endêmico de Araguaína, Tocantins.

5. REFERÊNCIAS

1. WHO. Weekly Epidemiological Record. N 38 ed. Switzerland: World Health Organization; 2017. p. 557-72.
2. Afonso MMS, Chaves SAM, Magalhães MAFM, Gracie R, Azevedo C, Carvalho BM, et al. Ecoepidemiology of American Visceral Leishmaniasis in Tocantins State, Brazil: Factors Associated with the Occurrence and Spreading of the Vector *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). In: Claborn D, editor. The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. Rijeka: InTech; 2017. p. Ch. 06.
3. Leishmaniose - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação - Tocantins [Internet]. 2017. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvto.def>.
4. Santos HD, Galvão SR, Dias FEF, Ribeiro TMP, Negreiros Filho O, Sousa SAP, et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. Ciência Rural. 2017;47.
5. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(5):577-9.
6. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009;136.
7. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008;24.

8. Lopes AP, Oliveira AC, Granada S, Rodrigues FT, Papadopoulos E, Schallig H, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic cats from Luanda, Angola. *Veterinary Parasitology*. 2017;239:15-8.
9. Nemati T, Khanmohammadi M, Bazmani A, Mirsamadi N, Koshki MHK, Mohebali M, et al. Study on Leishmania infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5(1):40-3.
10. Da Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo ND, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2010;174(1-2):150-4.
11. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 2007;145(3-4):357-60.
12. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde: Guia de vigilância epidemiológica. 7 ° ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 813.
13. Maia C, Ramos C, Coimbra M, Cardoso L, Campino L. Prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen and antibodies to *Leishmania infantum* in cats from southern Portugal. *Parasitology International*. 2015;64(2):154-6.
14. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*. 2010;174(1-2):37-42.
15. Mohebali M, Malmasi A, Khodabakhsh M, Zarei Z, Akhouni B, Hajjaran H, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Northwest Iran: The role of cats in endemic areas of visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2017;9:13-6.
16. Can H, Döşkaya M, Özdemir HG, Şahar EA, Karakavuk M, Pektaş B, et al. Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. *Experimental Parasitology*. 2016;167:109-14.
17. Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, et al. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;45:53-8.
18. Pennisi MG, Lupo T, Malara D, Masucci M, Migliazzo A, Lombardo G. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *J Feline Med Surg*. 2012;14.
19. Pennisi M-G, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):302.
20. Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*

- antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35.
21. Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors.* 2014;7.
 22. Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2009;11(8):728-30.
 23. Nasreddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. *Veterinary Parasitology.* 2008;158(4):364-9.
 24. Silva RCN, Ramos RAN, Pimentel DdS, Oliveira GMdA, Carvalho GAd, Santana MdA, et al. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2014;47:108-9.
 25. Oliveira GC, Paiz LM, Menozzi BD, Lima MdS, Moraes CCGd, Langoni H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2015;24:464-70.
 26. Cardia DFF, Camossi LG, Neto LdS, Langoni H, Bresciani KDS. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2013;197(3-4):634-7.
 27. Sobrinho LSV, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, de Lima VMF, et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* 2012;187(1-2):302-6.
 28. Vides JP, Schwartd TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2011;178(1-2):22-8.
 29. Neto LS, Sobrinho LSV, Martins CO, Machado RZ, Marcondes M, de Lima VMF. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Veterinary Parasitology.* 2011;177(3-4):374-7.
 30. Bresciani KD, Serrano AC, Matos LV, Savani ES, D'Auria SR, Perri SH, et al. [Occurrence de *Leishmania* spp. in domestic cats from Araçatuba, SP]. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(2):127-9.
 31. Noé P, Domingos SL, Oshiro ET, Lima RB, Pirmez C, Pedroso TC, et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from visceral leishmaniasis endemic area in Brazil Ciência Animal [Internet]. 2015 15 Out 2017; 25(4):[03-14 pp.]. Available from: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo01_2015_4.pdf.
 32. Metzdorf IP, da Costa Lima Junior MS, de Fatima Cepa Matos M, de Souza Filho AF, de Souza Tsujisaki RA, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum*

- in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*. 2017;166:121-5.
33. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2012;3:47-57.
34. Martin-Sanchez J, Acedo C, Munoz-Perez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Marquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*. 2007;145(3-4):267-73.
35. Ayllon T, Tesouro MA, Amusategui I, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. In: Sparagano OAE, Maillard JC, Figueroa JV, editors. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Prediction and Prevention*. Annals of the New York Academy of Sciences. 11492008. p. 361-4.
36. Vita S, Santori D, Aguzzi I, Petrotta E, Luciani A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet Res Commun*. 2005;29 Suppl 2:319-21.
37. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*. 2002;106(3):181-91.
38. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol*. 2010;174(3-4):336-40.
39. Duarte A, Castro I, Fonseca Im P, Almeida V, Carvalho Lm M, Meireles J. Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *J Feline Med Surg*. 2010;12.
40. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88.
41. Oliveira TMFS, Pereira VF, Benvenega GU, Martin MFA, Benassi JC, Silva DTd, et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2015;24:220-2.
42. Coelho WM, Lima VM, Amarante AF, Langoni H, Pereira VB, Abdelnour A. Occurrence of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19.
43. SEPLAN. Aspectos Geográficos do município de Araguaína-TO Tocantins; 2008.
44. IBGE . Tocantins. Araguaína: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE; 2017 [Available from: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=170210>].
45. Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;102(2):172-8.

46. Chatzis MK, Leontides L, Athanasiou LV, Papadopoulos E, Kasabalis D, Mylonakis M. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp Parasitol.* 2014;147.
47. Costa T, Rossi C, Laurenti M, Gomes A, Vides J, Sobrinho L, et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. São Paulo: Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science; 2010. p. 213-7.
48. Athanasiou LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS. Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Veterinary Parasitology.* 2013;192(1-3):91-7.
49. Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, da Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, et al. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cassia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical.* 2009;42(2):141-5.
50. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol.* 2002;106.
51. Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NC MR, Sousa VRF. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2009;42:156-9.
52. Sherry K, Miró G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11.
53. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010;236(11):1184-91.

CAPÍTULO 3- USO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE E DO MÉTODO PARASITOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM *Felis catus domesticus* DE ÁREA ENDÊMICA URBANA

RESUMO

A leishmaniose visceral representa grande impacto em saúde pública, o que faz necessária a investigação da infecção de hospedeiros urbanos e possíveis reservatórios, principalmente em regiões com grande ocorrência de casos, como o estado do Tocantins, situado na região Norte do Brasil. Desta forma, objetivou-se detectar a presença de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em felinos domésticos do município de Araguaína, considerado endêmico para leishmaniose visceral canina e humana. Para tal, a PCR convencional, específica para a espécie *L. (L.) infantum*, e a pesquisa microscópica direta do parasito em amostras de tecido foram usadas como métodos de diagnóstico. Amostras de sangue, medula óssea, linfonodo, fígado, baço e pele provenientes de 113 animais foram analisadas por meio da pesquisa microscópica direta do parasito e da PCR. A frequência de *L. (L.) infantum chagasi* obtida pela PCR foi de 4,4% (5/113) (IC: 1,5% - 10%) e o resultado obtido por meio do exame parasitológico direto, foi de 5,3% (3/57) (IC: 1,1% - 14,6%). De forma geral, considerando ambos os testes, a positividade observada para *Leishmania* spp. foi de 5,3% (6/113) (IC: 2,0 % - 11,2%). Dentre os animais positivos na PCR (5/113), 75% (3/4) das amostras de baço, linfonodo submandibular e pele, 60% (3/5) das amostras de sangue e 33,33% (1/3) da amostras de medula mostraram positividade. Por outro lado, todos os tecidos (baço, fígado, linfonodo submandibular, linfonodo poplíteo e medula óssea) dos animais que apresentaram formas amastigotas no exame direto (3/57), foram positivos. A concordância entre PCR e exame parasitológico foi considerada moderada (valor de Kappa = 0.544, IC: 0.2874 - 0.8006). Os animais que apresentaram pelo menos um sinal clínico tiveram maior possibilidade de serem positivos ($p=0,0231$). Dentre os sinais clínicos estudados, a presença de esplenomegalia ($p=0,0069$) e hepatomegalia ($p=0,0008$) estão associados à infecção por *L. (L.) infantum chagasi* em gatos. Os resultados indicam que gatos atuam como portadores desse protozoário no município de Araguaína, Tocantins. A presença de DNA do agente em amostras de pele é relevante, uma vez que alerta quanto ao potencial desta espécie atuar como fonte de infecção para o vetor.

Palavras-chave: ácido desoxirribonucleico; gato; *Leismania* spp.

USE OF THE CHAIN REACTION BY POLYMERASE AND PARASITOLOGICAL METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIOSIS IN *Felis catus domesticus* FROM URBAN ENDEMIC AREA

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis represents a great impact on public health, which makes it necessary to investigate the infection of urban hosts and possible reservoirs, especially in regions with a high incidence of cases, such as the state of Tocantins, located in the northern region of Brazil. The objective of this study was to detect the presence of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

in domestic cats of the municipality of Araguaína, considered endemic for canine and human visceral leishmaniasis. For this, conventional PCR, specific for the *L. (L.) infantum* specie, and direct microscopic research of the parasite on tissue samples were used as diagnostic methods. Samples of blood, bone marrow, lymph node, liver, spleen and skin from 113 animals were analyzed by direct microscopic examination of the parasite and the PCR. The frequency of *L. (L.) infantum chagasi* obtained by PCR was 4.4% (5/113) (CI: 1.5% - 10%) and the result obtained through direct parasitological examination was 5.3% (3/57) (CI: 1.1% - 14.6%). In general, considering both tests, the positivity observed for *Leishmania* spp. was 5.3% (6/113) (CI: 2.0% - 11.2%). Among the positive animals in the PCR (5/113), 75% (3/4) of the spleen, submandibular lymph node and skin samples, 60% (3/5) of the blood samples and 33.33% (1/3) of the bone marrow samples showed positivity. On the other hand, all tissues (spleen, liver, submandibular lymph node, popliteal lymph node and bone marrow) of the animals that presented amastigotes forms in the direct examination (3/57) were positive. The agreement between PCR and parasitological examination was considered moderate (Kappa = 0.544, CI: 0.2874 - 0.8006). Animals that presented at least one clinical sign were more likely to be positive ($p = 0.0231$). Among the clinical signs studied, the presence of splenomegaly ($p = 0.0069$) and hepatomegaly ($p = 0.0008$) were associated with *L. (L.) infantum chagasi* infection in cats. The results indicate that cats act as carriers of this protozoan in the municipality of Araguaína, Tocantins. The presence of DNA of the agent in skin samples is relevant, since it warns about the potential of this specie to act as source of infection for the vector.

Keywords: deoxyribonucleic acid; cat; *Leishmania* spp.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada um grave problema mundial de saúde pública⁽¹⁾. Pesquisas direcionadas ao estudo de possíveis novos reservatórios, como os gatos domésticos, são de grande importância, principalmente em regiões que apresentam alta incidência humana⁽²⁾. Nesse âmbito, há registros da ocorrência de felinos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*⁽³⁾, protozoário causador da LV⁽⁴⁾, e por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsáveis pelo desenvolvimento da forma cutânea da doença^(5, 6).

No Brasil, a leishmaniose visceral felina (LVF) já foi diagnosticada nos estados de Pernambuco⁽⁷⁾, Pará⁽⁸⁾, São Paulo^(9, 10) e Mato Grosso do Sul^(11, 12), dentre os quais o Pará se destaca pela alta incidência de LV humana⁽¹³⁾. De forma similar, estados como Maranhão, Minas Gerais, Ceará e Tocantins destacam-se quanto a presença da infecção em humanos⁽¹³⁾. Em termos de elevada incidência, dados do Ministério da Saúde referentes ao ano de 2015, posicionaram o estado do Tocantins no primeiro lugar no ranking nacional (12,2/100.000 habitantes)⁽¹⁴⁾, tendo o município de Araguaína como principal responsável pelo aumento de casos humanos no estado⁽¹⁵⁾.

De forma geral, métodos diretos, como o exame parasitológico direto⁽¹⁶⁾, e indiretos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio imunoenzimático (ELISA), podem ser utilizados no diagnóstico da LVF^(5, 17). Entretanto, seu uso como único método não é indicado⁽¹⁸⁾, uma vez que animais infectados podem apresentar níveis baixos de IgG no estágio inicial da infecção⁽¹⁹⁾ ou os desenvolverem de maneira tardia, até mesmo após o surgimento de lesões⁽¹⁸⁾. Diante disso, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) pode ser utilizada, visto que tem sido uma importante ferramenta no diagnóstico da leishmaniose felina^(19, 20) e é capaz de identificar o protozoário em diversos tipos de amostras, como sangue, tecidos frescos ou fixados em formalina^(21, 22), pele, baço, fígado, linfonodo e medula óssea⁽²³⁾, conjuntiva⁽²³⁻²⁵⁾ e suabes nasal e oral⁽²⁶⁾.

Há indícios de que nos gatos, a identificação das espécies seja tão importante quanto o conhecimento da prevalência da enfermidade, uma vez que a determinação do agente causal é essencial para a compreensão epidemiológica da doença e para o conhecimento de sua apresentação clínica nestes animais^(27, 28). Assim, objetivou-se detectar a presença de *L. (L.) infantum chagasi* em felinos domésticos do município de Araguaína-TO, região norte do Brasil, considerado endêmico para leishmaniose visceral canina e humana, por meio da PCR convencional, específica para o *L. (L.) infantum*, e da pesquisa microscópica direta do parasito em amostras de tecido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

População estudada

A população estudada originou-se do município de Araguaína, classificado como área de transmissão intensa para leishmaniose visceral,⁽²⁹⁾. A cidade está localizada na região Norte do Brasil e compreende um área de 4000,4 Km², com latitude de 7°11'26" sul, longitude de 48°12'28" oeste e altitude de 236m⁽³⁰⁾.

Um total de 113 felinos provenientes de domicílios, clínicas veterinárias e do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade foi amostrado por conveniência, conforme a taxa de recolhimento/procedimentos clínicos realizados. Dos 113 animais, 57 foram necropsiados, o que possibilitou, além da coleta de sangue, a obtenção de amostras de medula e fragmentos dos linfonodos submandibulares e poplíteos, baço e fígado. Ressalta-se também que amostras de pele foram obtidas de 56 dos animais necropsiados.

Os métodos empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ) da Universidade Federal do Tocantins (UFT) sob o protocolo número 23101.000874-38.

Amostras biológicas

As amostras de sangue foram coletadas após sedação do animal com Ketamina (10mg/Kg) e antisepsia local com álcool a 70%. Procedeu-se então com a punção da veia jugular, utilizando agulha 25x12mm acoplada a seringa estéril de 5mL. As amostras foram depositadas em tubos contendo anticoagulante (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid* - EDTA), depois transferidas para microtubos de 1,5mL e armazenadas a -20 °C até o momento do seu processamento.

A medula foi obtida após anestesia geral (Propofol, 5-7 mg/Kg IV) e posicionamento do animal em decúbito lateral. Para tal, a área correspondente à região proximal do fêmur foi tricotomizada e submetida à antisepsia com solução de clorexidina a 0,5% e/ou álcool a 70%. Em seguida, foi realizada uma perfuração da região do trocanter maior com o auxílio de uma agulha 40x12mm, segundo o descrito por Mendonça et al.⁽³¹⁾. A coleta do material foi possível após a conexão de uma seringa de 10 mL contendo anticoagulante (heparina). Em seguida, os animais foram eutanasiados (Propofol, 5-7 mg/Kg IV + Cloreto de Potássio 19,1%, 1mL/Kg, IV) e submetidos a necropsia para obtenção de fragmentos de órgãos e pele. Sob condições de assepsia, parte de todos os tecidos coletados foi transeferida para tubos de polipropileno e armazenada a -20 °C para a extração do DNA.

Extração de DNA

As amostras de sangue, medula óssea, linfonodo submandibular direito, baço e pele foram submetidas à extração do DNA genômico total pelo *Kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep* (Sigma-Aldrich®, United States), conforme as recomendações do fabricante.

Detecção molecular de *L. (L.) infantum chagasi*

Amostras de DNA de sangue, medula, baço, linfonodo submandibular direito e pele dos 113 animais do experimento foram submetidas à PCR convencional específica para a detecção de *L. (L.) infantum*. A reação foi realizada por meio dos *primers* MC1 (5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3') e MC2 (5'-CACCCATTTCGATTTG-3'), que amplifica uma sequência de 447pb obtidos a partir do DNA contido nos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA), segundo a metodologia descrita por Cortes et al.⁽³²⁾. Como

controles positivos e negativos foram usados, respectivamente, DNA da cepa *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e água deionizada.

Para a amplificação utilizou-se termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, United States) sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C por cinco minutos; 40 ciclos de desnaturação à 95 °C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 30 segundos e extenção a 72 °C por um minuto; e um ciclo de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Para a leitura, 10µL dos produtos da PCR foram homogeneizados em 2,5µL de azul de bromofenol a 0,25% e aplicados em gel de agarose a 1,5% (Agarose LE, Uniscience®, Brasil) contendo 3,8µL de brometo de etídio. A eletroforese foi conduzida em cuba de eletroforese (Bio-rad®, United States) sob 140V por cinco minutos, seguido por um período de 45 minutos a 110V. A visualização foi feita por meio de transiluminador de luz UV.

Exame parasitológico direto

Para o exame parasitológico, foram realizados esfregaço de medula óssea e *imprints* de fragmentos de baço, fígado e linfonodos poplíteos direito (LPD) e esquerdo (LPE) e submandibulares direito (LSMD) e esquerdo (LSME). As lâminas foram fixadas em álcool metílico, coradas pelo método Panótico rápido e submetidas ao exame parasitológico por microscopia direta em objetiva de imersão (100X).

Análise estatística

Os resultados foram transferidos para um banco de dados e a análise descritiva foi executada usando o programa Epi Info 3.5.4. Variáveis como sexo, idade e presença de sinais clínicos foram analisadas quanto à associação com a positividade. Para tal, os testes de qui-quadrado com correção de Yates e Exato de Fischer (em variáveis com resultados < 5) foram calculados com erro estatístico de 5% e $p < 0,05$. A intensidade da concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico pela estatística Kappa, bem como os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram realizados com auxílio do programa OpenEpi, Versão 3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de *L. (L.) infantum chagasi* obtida pela PCR foi de 4,4% (5/113) (IC: 1,5% - 10%) e o resultado obtido por meio do exame parasitológico direto foi de 5,3% (3/57) (IC: 1,1% - 14,6%). De forma geral, considerando ambos os testes, a positividade observada para *Leishmania* spp. foi de 5,3% (6/113) (IC: 2,0 % - 11,2%) (Quadro 4).

QUADRO 4 - Felinos domésticos provenientes de Araguaína, Tocantins, positivos para *Leishmania* spp., segundo o método de diagnóstico utilizado, tipos de tecido parasitado e sinais clínicos observados.

Animal	Teste	Tipo de amostra	Sinais clínicos
G 10	PCR	Baço	Linfoadenomegalia
G 28	Parasitológico	Baço, Fígado, LPE, LPD, LSME, LSMD, Medula	Linfoadenomegalia Hepatomegalia
G 30	PCR	LSMD, Pele	Linfoadenomegalia, lesão de pele
G 56	Parasitológico	Baço, Fígado, LSME, LSMD, LPE, LPD, Medula	Hepatomegalia Esplenomegalia
	PCR	Baço, LSMD, Medula, Pele, Sangue	
G 77	PCR	Sangue	Não
G96*	Parasitológico	Baço, Fígado, LSMD, LPE, LPD	Hepatomegalia Esplenomegalia
	PCR	Baço, LSMD, Pele, Sangue	

G: gato; LPD: linfonodo poplíteo direito; LPE: linfonodo poplíteo esquerdo; LSMD: linfonodo submandibular direito; LSME: linfonodo submandibular e esquerdo.

*Amostras de LSME e medula do G96 não foram analisadas

Dentre os animais positivos na PCR (5/113), 75% (3/4) das amostras de baço, linfonodo submandibular e pele, 60% (3/5) das amostras de sangue e 33,33% (1/3) da amostras de medula mostraram positividade. Por outro lado, todos os tecidos (baço, fígado, linfonodo submandibular, linfonodo poplíteo e medula óssea) dos animais que apresentaram formas amastigotas no exame direto (3/57), foram positivos (3/3). As figuras 7 e 8 evidenciam a positividade de amostras analisadas.

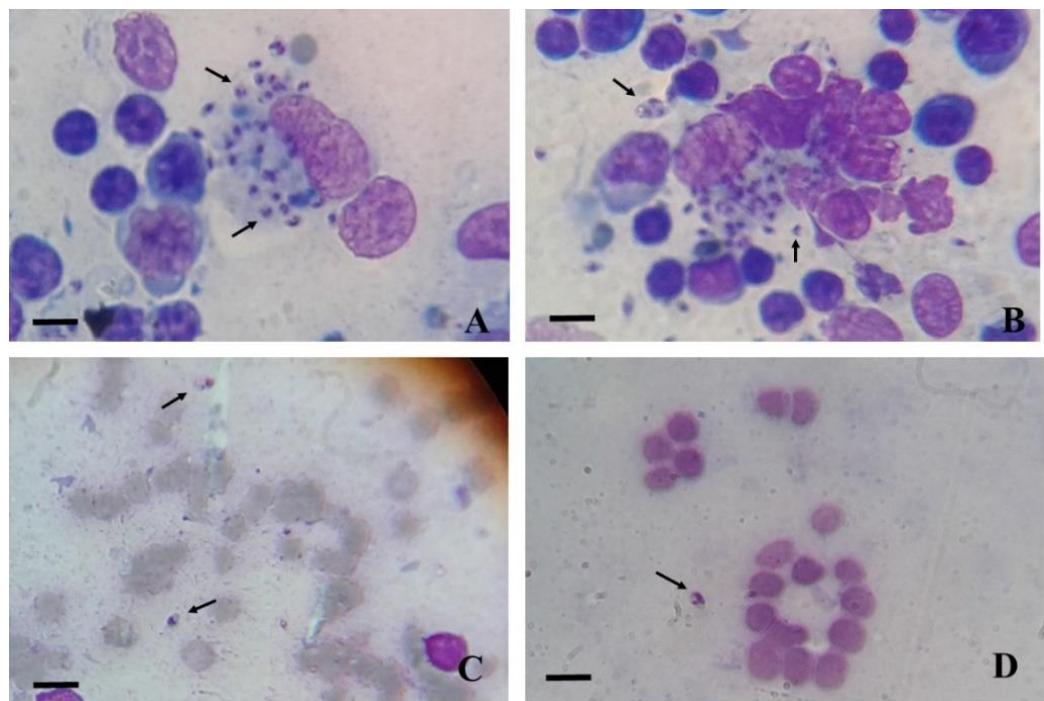


FIGURA 7 - Demonstração visual de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras teciduais de felino doméstico (G 96) proveniente do município de Araguaína, Tocantins. Observar protozoários (setas) em amostras de: (A) Linfonodo poplíteo direito; (B) Linfonodo poplíteo esquerdo; (C) Baço; (D) Fígado. (HE, 100X, escala = 6 μ m).

Quando comparada ao exame parasitológico como padrão ouro, a PCR apresentou sensibilidade de 66,67% (IC: 20.77% - 93.85%), especificidade de 96.3% (IC: 87.46% - 98.98%), VPP de 50% (IC: 15% - 85%) e VPN de 98.11% (90.06% - 99.67%). A concordância entre os testes foi considerada moderada, com referência ao valor de Kappa = 0.544 (IC: 0.2874 - 0.8006).

A detecção *L. (L.) infantum chagasi* aqui relatada foi obtida pela PCR convencional, a qual tem mostrado bons resultados quando comparada a técnicas como PCR em tempo real^(33, 34), cultura de tecidos⁽³⁵⁾, histoquímica e imunoistoquímica⁽³⁶⁾, sendo eficaz no diagnóstico de *L. infantum* em gatos provenientes de vários países^(3, 37, 38). Portanto, a PCR convencional pode ser vista como uma ferramenta eficiente para o diagnóstico da enfermidade nesses animais.

Tratando-se dos iniciadores usados neste estudo (Figura 7), esses têm sido reportados como altamente específicos, tanto em amostras clínicas, como sangue, medula, baço, linfonodo e pele, como em culturas e amostras em papel filtro⁽³²⁾. Tais primers também vêm sendo utilizados com frequência⁽³⁹⁻⁴¹⁾, o que reflete sua eficácia quando se trata de diagnóstico.

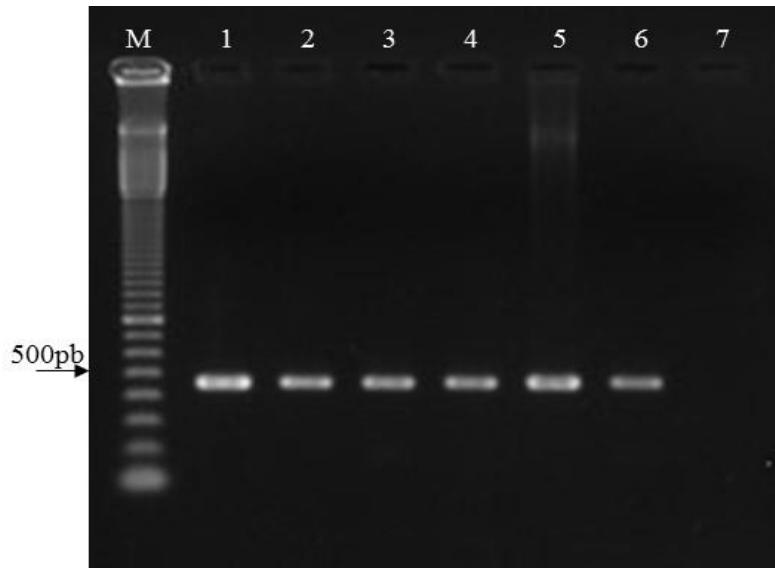


FIGURA 8 - Reação em Cadeia pela Polimerase para *L. infantum* em amostras biológicas de felinos domésticos testadas com o par de primer MC1 e MC2. Observar (M) Marcador peso molecular de 100pb; (1) controle positivo - cepa MHOM/BR/74/PP75; (2) baço G10; (3) baço G56; (4) sangue G56; (5) medula G56; (6) Sangue G77; (7) Controle negativo - água deionizada. Verificar a positividade de todas as amostras testadas (poços 2 ao 6) pela distribuição das bandas a uma altura de 447pb em gel de agarose a 1,5%.

Concordando com o resultado obtido nesta pesquisa, *L. (L.) infantum chagasi* tem sido a espécie diagnosticada com maior frequência em felinos domésticos por meio de métodos moleculares. Também é notável que a maioria dos registros dessa infecção são oriundos de regiões endêmicas de países como Brasil^{(12) (11)}, Espanha⁽²⁰⁾, e Turquia⁽¹⁹⁾ (Tabela 5). Isto aponta para o papel do gato como possível reservatório, principalmente em áreas endêmicas para leishmaniose humana e/ou canina e reforça a necessidade de diagnóstico em felinos dessas regiões.

TABELA 5 - Registros epidemiológicos da espécie de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* diagnosticadas em felinos domésticos por meio de métodos moleculares no período 2007-2017.

Autor	País (Localidade)	Ano	Número de amostras	Frequência (%)	Teste	Espécie encontrada
Metzdorf et al. ⁽¹²⁾	Brasil	2017	100	6	RFLP-PCR	<i>L. infantum</i>
Mohebali et al. ⁽⁴²⁾	Irã	2017	103	0,97	Nested PCR	<i>L. infantum</i>
Can te al. ⁽¹⁹⁾	Turquia	2016	1101	0,54	Nested PCR	<i>L. tropica e L. infantum</i>
Spada et al. ⁽⁴³⁾	Itália	2016	90	2,2	qPCR	<i>Leishmania infantum</i>
Dincer et al. ⁽⁴⁴⁾	Turquia	2015	22	4,5	PCR	<i>L. infantum</i>
Noé et al. ⁽¹¹⁾	Brasil	2015	110	2,72	RFLP – PCR	<i>L. chagasi</i>
Chatzis et al. ⁽³⁾	Grécia	2014	100	41	PCR	<i>L. infantum</i>
Pennisi et al. ⁽⁴⁵⁾	Itália	2012	207	18,3	PCR	<i>L. infantum</i>
Coelho et al. ⁽⁴⁶⁾	Brasil	2011	52	5,76	PCR	<i>L. chagasi</i>
Hatam et al. ⁽⁴⁷⁾	Irã	2010	40	10	PCR	<i>L. infantum</i>

TABELA 5 - Registros epidemiológicos das espécies de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* diagnosticadas em felinos domésticos por meio de métodos moleculares no período 2007-2017 (continuação).

Autor	País (Localidade)	Ano	Número de amostras	Frequência (%)	Teste	Espécie encontrada
Maia et al.⁽³⁸⁾	Portugal	2010	138	20,3	PCR	<i>L. chagasi</i>
Vides et al.⁽¹⁰⁾	Brasil	2009- 2008	55	9,09	qPCR	<i>L. chagasi</i>
Sherry et al.⁽⁴⁸⁾	Espanha	2008	105	8,7	qPCR	<i>L. chagasi</i>
Martín-Sánchez et al.⁽²⁰⁾	Espanha	2007	183	25,7	PCR	<i>L. infantum</i>

Considerando o resultado do exame direto, um dos animais (G28 - Quadro 4) apresentou formas amastigotas em todas as amostras estudadas (baço, fígado, linfonodos e medula). Por outro lado, a PCR específica para *L. (L.) infantum chagasi* demonstrou resultado negativo. Esse dado infere que os gatos do município de Araguaína apresentem infecção por mais de uma espécie. Situações semelhantes já foram descritas no Brasil, como é o caso de infecções ocasionadas por *L. amazonenses* e *L. braziliensis* nos estados brasileiros do Mato Grosso do Sul⁽⁴⁹⁾ e Rio de Janeiro⁽⁶⁾, ambas relacionadas à presença de sinais clínicos cutâneos, tais como úlceras e/ou lesões cutâneas.

Destaca-se que o resultado obtido no exame parasitológico é considerado relevante quando comparado aos já observados em felinos de outras regiões brasileiras consideradas endêmicas, as quais apresentaram frequência de 4% (8/200)⁽⁵⁰⁾, 0,7% (2/283)⁽⁵¹⁾, 4% (4/100)⁽¹²⁾, 9,93% (30/302)⁽⁹⁾ e 18,18% (10/55)⁽¹⁰⁾. Isso mostra que embora apresente uma sensibilidade baixa, o método direto prefigura uma boa ferramenta para detecção do gênero *Leishmania* spp., uma vez que tem alta especificidade e baixo custo⁽¹⁶⁾. Tais características demonstram a adequação de sua utilização em regiões endêmicas, permitindo rápido diagnóstico, que por sua vez embasaria o desencadeamento de estratégias de controle visando reduzir a incidência de casos humanos e animais.

Nos animais que foram positivos nesse exame, todas as amostras teciduais, como baço, fígado, linfonodo submandibular, linfonodo poplíteo e medula óssea, apresentaram formas

amastigotas de *Leishmania* (3/3). De forma similar, Metzdorf et al.⁽¹²⁾ encontraram positividade em todos os tecidos dos animais positivos estudados. Em contrapartida, Costa et al.⁽⁵⁰⁾ evidenciaram que de 20 animais reativos, 87,5% foram positivos em amostras de linfonodo, 37,5% em medula óssea, 25% em baço e 12,5% em fígado. Estes dados compararam-se também aos obtidos por Vides et al.⁽¹⁰⁾, os quais observaram 70% de positividade em medula óssea, 40% em baço, 30% nos linfonodos e 20% no fígado, e Sobrinho et al.⁽⁹⁾, que evidenciaram 30% em amostras de linfonodo e 20% em medula óssea. Com base nos resultados obtidos e os reportados na literatura, as amostras de linfonodo e medula óssea parecem constituir bons materiais para o diagnóstico parasitológico em felinos.

Considerando as amostras positivas pela PCR, as maiores frequências foram obtidas na pele, linfonodo e baço (75% - 3/4), seguidas de amostras de sangue (60% - 3/5) e de medula (33,33% - 1/3). A título de comparação, Chatzis et al.⁽³⁾ observaram 18,2% de positividade para biópsias de pele e 16% em medula óssea, Pennisi et al.⁽⁴⁵⁾ evidenciaram positividade de 11,7% em linfonodo e 7,8% em sangue (7,8%) e Vita et al.⁽⁵²⁾ encontraram positividade de todas as amostras de linfonodo de gatos reagentes na RIFI. Estas informações analisadas em conjunto sugerem que tecidos como pele e linfonodo sejam os mais indicados para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral em gatos, o que é relevante, visto que assegura um procedimento de alta sensibilidade.

Ao se avaliar os fatores associados à positividade dos animais, não houve diferença significativa em relação ao sexo e a idade (Tabela 6). Embora alguns estudos tenham evidenciado predisposição para a infecção em machos^(9, 53), a falta de associação observada em relação ao sexo também foi relatada por Pennisi et al.⁽⁴⁵⁾. Com relação à idade, ao contrário do observado aqui, há evidências de que felinos maiores de três anos apresentem maior prevalência⁽⁴⁵⁾. Apesar disso, infere-se que ambos os fatores, sexo e idade, não interferiram na infecção de felinos.

TABELA 6- Fatores de associação à infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em felinos domésticos provenientes da cidade de Araguaína, Tocantins.

Varável	N	+	(%)	OR	IC	P
Idade				0,21	(0,019 - 2,249)	0,259
Adulto	100	5	(5)			
Jovem	5	1	(20)			
Sexo				1,75	(0,308 - 9,989)	0,418
Fêmea	61	4	(6,6)			
Macho	52	2	(3,8)			
Sinal Clínico				9,86	(1,110 - 87,601)	0,023*
Sintomático	41	5	(12,2)			
Assintomático	72	1	(1,4)			
Esplenomegalia				53,00	(3,937 - 713,447)	0,006*
Sim	3	2	(66,7)			
Não	110	4	(3,6)			
Hepatomegalia				52,50	(6,266 - 439,870)	0,0008*
Sim	5	3	(60)			
Não	108	3	(2,8)			
Lesão de pele				0,87	(0,096 - 7,863)	0,690
Sim	21	1	(4,8)			
Não	92	5	(5,4)			
Lesão ocular				-	-	0,801
Sim	4	0	(0)			
Não	109	6	(5,5)			
Linfoadenomegalia				3,280	(0,622 – 17,282)	0,160
Sim	28	3	(10,7)			
Não	85	3	(3,5)			

N: número de animais; OR: *Odds ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de p; NI: não informado; SRD: sem raça definida.

*Valor de p estatisticamente significativo (p<0,05)

A tabela 6 evidencia que a presença de pelo menos um sinal clínico foi associada aos resultados positivos ($p=0,0231$). Os sinais avaliados foram: esplenomegalia, hepatomegalia, lesão de pele, lesão ocular e linfadenomegalia. Dentre estes, esplenomegalia ($p=0,0069$) e hepatomegalia ($p=0,0008$) foram estatisticamente significativas. De forma similar, Chatzis et al.⁽³⁾ observaram associação entre positividade e os felinos com pelo menos um sinal sistêmico na PCR ($p=0,042$). Em outros estudos, porém, foi relatada independência entre esses fatores, tanto no cão⁽⁵⁴⁾ como no gato^(33, 45), o que revela a necessidade de se ampliar pesquisas neste sentido.

O fato de os sinais esplenomegalia e hepatomegalia terem sido estatisticamente significativos sugere que a avaliação destes parâmetros em gatos, por parte do médico veterinário, associando ou não à possibilidade de infecção por *L.(L.) infantum chagasi*, se faz

necessária. Apesar da presença de lesões de pele não ter sido estatisticamente significativa neste estudo, Vides et al.⁽¹⁰⁾ encontraram alta associação entre lesões dermatológicas e animais positivos. Dentre estas, a formação de crostas na região cervical dorsal, acompanhadas de hepatoesplenomegalia foi evidenciada em 25% dos animais positivos de uma pesquisa no estado de São Paulo⁽⁵⁰⁾. Ainda neste estado foi reportado um caso em que o animal apresentava extensa dermatite, crostas e pequenas úlceras na região da cabeça e superfícies palmar e plantar das patas⁽²⁾. Esses relatos mostram que, embora sem significância nos animais incluídos neste estudo, essas lesões podem ser de grande valia no diagnóstico clínico da leishmaniose visceral felina, assim como o são em cães.

De forma inespecífica, sinais como complexo gengivite/estomatite, perda de peso, mucopurulência nasal e ocular, úlceras orais, alopecia⁽¹²⁾, escoriações da região da face e linfadenomegalia⁽⁴³⁾, bem como, dermatite alérgica a pulgas e infestação por piolhos⁽¹²⁾, já foram evidenciados em felinos positivos. Por estar presente em situações de infecção, a linfadenomegalia aqui observada, embora não significativa estatisticamente, indica a necessidade de atenção por parte do clínico veterinário.

4. CONCLUSÃO

Formas amastigotas de *Leishmania* spp. e DNA de *L. (L.) infantum chagasi* são detectáveis em tecidos de felinos domésticos de Araguaína, Tocantins, região endêmica para leishmaniose visceral. Assim, estes animais atuam como portadores do agente neste município.

A ocorrência de outra espécie além da *L. (L.) infantum chagasi* em felinos de Araguaína, Tocantins, deve ser estudada.

A positividade encontrada em amostras de pele aponta potencial transmissão da leishmania durante a picada pelo vetor.

Variáveis como sexo e a idade não interferem na positividade de felinos domésticos. Por outro lado, a presença de pelo menos um sinal clínico, como esplenomegalia e/ou hepatomegalia está associada à infecção por *L. (L.) infantum chagasi*.

5. REFERÊNCIAS

1. WHO. Weekly Epidemiological Record. N 38 ed. Switzerland: World Health Organization; 2017. p. 557-72.

2. Coelho WM, Lima VM, Amarante AF, Langoni H, Pereira VB, Abdelnour A, et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(4):256-8.
3. Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet Parasitol.* 2014;202.
4. Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(5):577-9.
5. Longoni SS, López-Cespedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35.
6. Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira SA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2004;98(3):165-7.
7. Silva RCN, Ramos RAN, Pimentel DdS, Oliveira GMdA, Carvalho GAd, Santana MdA, et al. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2014;47:108-9.
8. Oliveira GC, Paiz LM, Menozzi BD, Lima MS, Moraes CCGd, Langoni H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2015;24:464-70.
9. Sobrinho LSV, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, de Lima VMF, et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* 2012;187(1-2):302-6.
10. Vides JP, Schwartd TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2011;178(1-2):22-8.
11. Noé P, Domingos SL, Oshiro ET, Lima RB, Pirmez C, Pedroso TC, et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from visceral leishmaniasis endemic area in Brazil Ciência Animal [Internet]. 2015 15 Out 2017; 25(4):[03-14 pp.]. Available from: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo01_2015_4.pdf.
12. Metzdorf IP, da Costa Lima Junior MS, de Fatima Cepa Matos M, de Souza Filho AF, de Souza Tsujisaki RA, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica.* 2017;166:121-5.

13. Brasil. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016 Portal da Saúde – Ministério da Saúde. ; 2017.
14. Brasil. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015 <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Coeficiente%20de%20Incidncia.pdf>; Ministério da Saúde; 2017.
15. Afonso MMS, Chaves SAM, Magalhães MAFM, Gracie R, Azevedo C, Carvalho BM, et al. Ecoepidemiology of American Visceral Leishmaniasis in Tocantins State, Brazil: Factors Associated with the Occurrence and Spreading of the Vector *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). In: Claborn D, editor. The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. Rijeka: InTech; 2017. p. Ch. 06.
16. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
17. Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? Parasit Vectors. 2014;7.
18. Simões L, Bevilaqua CM, Mattos MR, Pompeu MM. Feline leishmaniasis uncommon or unknown? Ver Portug Ciênc Vet [Internet]. 2004; 550:[78-87 pp.].
19. Can H, Döşkaya M, Özdemir HG, Şahar EA, Karakavuk M, Pektaş B, et al. Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. Experimental Parasitology. 2016;167:109-14.
20. Martin-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Marquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. Veterinary Parasitology. 2007;145(3-4):267-73.
21. Bartlett J, Stirling B. Methods in Molecular Biology: PCR Protocols. 2º ed. Stirling B, editor. Totowa: Humana Press; 2003. 181-3 p.
22. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(1):210-5.
23. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Veterinary Parasitology. 2004;125(3-4):251-62.
24. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. J Infect Dis. 2004;189(9):1729-33.
25. Geisweid K, Weber K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. The Veterinary Journal. 2013;198(1):187-92.

26. Ferreira Sde A, Almeida GG, Silva Sde O, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade AS, et al. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2150.
27. Ruiz RM, Ramírez NN, Alegre AE, Bastiani CE, De Biasio MB. Detección de *Leishmania (Viannia) braziliensis* en gato doméstico de Corrientes, Argentina, por técnicas de biología molecular. *Revista veterinaria.* 2015;26:147-50.
28. Paşa S, Tetik Vardarlı A, Erol N, Karakuş M, Töz S, Atasoy A, et al. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. *Veterinary Parasitology.* 2015;212(3):389-92.
29. Santos HD, Galvão SR, Dias FEF, Ribeiro TMP, Negreiros Filho O, Sousa SAP, et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. *Ciência Rural.* 2017;47.
30. SEPLAN. Aspectos Geográficos do município de Araguaina-TO Tocantins; 2008.
31. Daniel Curvello de Mendonça M, Ney Luis P, Paula Cristina B, Debora Cristina O, Eduardo de Bastos Santos J, Antônio Cesar Oliveira G. Técnicas e sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos. *Ciência Rural.* 2009;39(7).
32. Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(1):12-7.
33. Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Experimental Parasitology.* 2017;177:93-7.
34. Solcà MdS, Guedes CES, Nascimento EG, Oliveira GGdS, Santos WLCd, Fraga DBM, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of Leishmania in spleen samples from naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology.* 2012;184(2-4):133-40.
35. Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009;179(1):142-4.
36. De Assis J, de Queiroz NM, da Silveira ReC, Nunes CM, Oliveira TM, Junior AC, et al. [Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira, SP]. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(1):17-25.
37. Nemati T, Khanmohammadi M, Bazmani A, Mirsamadi N, Koshki MHK, Mohebali M, et al. Study on Leishmania infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and North West Iran by parasitological, serological and molecular methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2015;5(1):40-3.

38. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol.* 2010;174(3-4):336-40.
39. Maia C, Ferreira A, Nunes M, Vieira ML, Campino L, Cardoso L. Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2014;5(4):409-14.
40. Ramos RAN, Ramos CAdN, Jusi MMG, Araújo FRd, Machado RZ, Faustino MAdG, et al. Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of *Leishmania infantum chagasi* in dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2012;21:192-5.
41. Jusi MM, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM, Tenorio Mda S, Sousa Lde O, Machado RZ. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(3):219-22.
42. Mohebali M, Malmasi A, Khodabakhsh M, Zarei Z, Akhouni B, Hajjarian H, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Northwest Iran: The role of cats in endemic areas of visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.* 2017;9:13-6.
43. Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, et al. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2016;45:53-8.
44. Dincer E, Gargari S, Ozkul A, Ergunay K. Potential animal reservoirs of Toscana virus and coinfections with *Leishmania infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(4):690-7.
45. Pennisi MG, Lupo T, Malara D, Masucci M, Migliazzo A, Lombardo G. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *J Feline Med Surg.* 2012;14.
46. Coelho WM, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani KD. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;176(2-3):281-2.
47. Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10.
48. Sherry K, Miro G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C, et al. A Serological and Molecular Study of *Leishmania infantum* Infection in Cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2011;11(3):239-45.
49. De Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2005;128(1-2):41-5.
50. Costa T, Rossi C, Laurenti M, Gomes A, Vides J, Sobrinho L, et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. São Paulo: Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science; 2010. p. 213-7.

51. Bresciani KD, Serrano AC, Matos LV, Savani ES, D'Auria SR, Perri SH, et al. [Occurrence de *Leishmania* spp. in domestic cats from Araçatuba, SP]. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19(2):127-9.
52. Vita S, Santori D, Aguzzi I, Petrotta E, Luciani A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. Vet Res Commun. 2005;29 Suppl 2:319-21.
53. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. Veterinary Parasitology. 2010;174(1-2):37-42.
54. De Queiroz NM, da Silveira RC, de Noronha AC, Jr., Oliveira TM, Machado RZ, Starke-Buzetti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet Parasitol. 2011;178(1-2):1-8.

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos evidenciaram a presença do DNA de *L. (L.) infantum chagasi*, de anticorpos anti- *Leishmania* spp. e de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em felinos de Araguaína, Tocantins. Considerando a estreita relação dos gatos domésticos com o ser humano, isso representa considerável impacto do ponto de vista de saúde pública.

Tendo em vista que o controle da leishmaniose visceral é direcionado principalmente aos cães, principais reservatórios, recomendam-se o desenvolvimento e a intensificação de medidas de controle e monitoramento direcionadas à espécie felina. Essas podem incluir a conscientização dos órgãos e profissionais de saúde sobre o papel dos felinos na epidemiologia da zoonose, orientação da população quanto à importância da guarda responsável, assistência veterinária e cuidados ambientais e a capacitação dos profissionais veterinários de forma a atuarem no diagnóstico preciso da infecção.

Estudos futuros visando o conhecimento de possíveis espécies além da *L. (L.) infantum chagasi* na região estudada se revestem de importância, uma vez que contribuem para o fornecimento de dados epidemiológicos sobre as leishmanioses felinas e auxiliam na manutenção de medidas profiláticas. Além disso, ressalta-se que há necessidade de ampliar pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de tecnologias que auxiliem no controle da enfermidade em gatos, tais como vacinas e a síntese de princípios farmacológicos visando o tratamento desses animais.

Do ponto de vista ambiental, impactos como a urbanização de áreas verdes visando a expansão geográfica de determinadas regiões são um ponto importante, visto que podem contribuir para o aumento do contato de humanos e animais domésticos com o vetor e reservatórios silvestres da leishmaniose. Portanto, os riscos de tais mudanças devem ser considerados de maneira efetiva por parte dos governos e empresas privadas, visando minimizar os impactos ambientais e possíveis danos à saúde da população por eles desencadeados.

**ANEXO A – Ficha de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
Universidade Federal do Tocantins**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA-UFT

O projeto intitulado “**Estudo epidemiológico da leishmaniose visceral em cães e gatos no município de Araguaína-TO e suas implicações para a saúde humana**”, sob a responsabilidade da professora Dra Helcília Dias Santos, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pelo parecerista da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Araguaína, 23 de junho de 2014.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "alberto yim júnior". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Alberto Yim Júnior

Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFT