

JOILSON FERREIRA BATISTA

**Leishmaniose visceral em gatos domésticos (*Felis catus*) em área endêmica no Brasil**

TERESINA/PI

2019

JOILSON FERREIRA BATISTA

**Leishmaniose visceral em gatos domésticos (*Felis catus*) em área endêmica no Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,  
como requisito para obtenção do título de Doutorado  
em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivete Lopes de Mendonça

TERESINA/PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**B333I** Batista, Joilson Ferreira  
Leishmaniose visceral em gatos domésticos (*Felis catus*) em  
área endêmica no Brasil. / Joilson Ferreira Batista. - 2019.  
107 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivete Lopes de Mendonça

1. *Leishmania infantum* 2. Epidemiologia 3. Calazar 4. Sequem-  
ciamento 5. Anemia 6. Lesão cutânea I. Título.

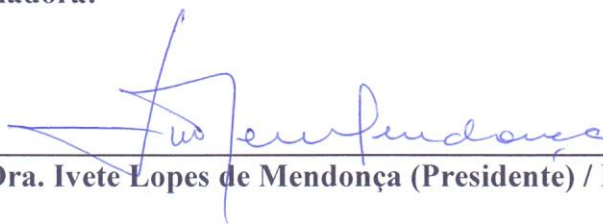
CDD 636.089 69364

LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS DOMÉSTICOS (*FELIS CATUS*) EM  
ÁREA ENDÊMICA NO BRASIL

JOILSON FERREIRA BATISTA

Tese aprovada em: 27/02/2019

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Ivete Lopes de Mendonça (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI




Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho (Interno) / DBF/CCS/UFPI



Prof. Dr. Kelsen Dantas Eulálio (Interno) / UFPI



Prof. Dra. Hiro Goto (Externa) / IMT/USP



Prof. Dr. Vladimir Costa Silva (Externo) / IDTNP

A toda minha família, especialmente, meus pais **João Ferreira de Carvalho e Ildete Batista de Oliveira**, minha esposa **Patrícia Mariana de Sousa Pereira**, minha irmã **Joilma Ferreira Batista** e meu padrinho **Themistocles Batista de Oliveira**, por estarem ao meu lado me apoiando e incentivando nos momentos difíceis e festejando quando consigo vencer mais uma etapa e pela enorme confiança que sempre depositam em mim. E a minha pequenina filha **Joilly Mariane de Sousa Ferreira** que sempre corre para a porta gritando: papai chegou, papai chegou.... renovando minhas energias para recomeçar todos os dias.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida, por sua presença constante e pelas oportunidades oferecidas.

Agradeço à minha esposa Patrícia Mariana, pela compreensão, incentivos e apoio em todos os momentos.

A minha orientadora Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça, pela amizade, pelos ensinamentos e por estar sempre chamando atenção para o correto, sendo para mim um exemplo de dedicação, companheirismo, uma pessoa de grande admiração.

Aos colaboradores do estudo Prof. Dr. Marcello Otake Sato, da Dokkyo Medical University (Japão) e Dr. Vladimir Costa Silva, do Laboratório de Leishmaniose, do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, pela valiosa contribuição nas análises de biologia molecular.

À Profa. Dra. Sílvia de Araújo França Baêta pela enorme colaboração no estudo histopatológico.

Aos colaboradores: Mestrandos Francisco Magalhães Neto e Diana Alcântara e alunos de Iniciação Científica Kayo Sandro e Carla Sousa, pela intensa contribuição no desenvolvimento do estudo.

Aos meus amigos do LASAN Thiago, Valdirene, Francisca, Francisco e José, que sempre estavam prontos para ajudarem quando necessário e pelos momentos de descontração durante todos esses anos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí em parceria com o Ministério da Saúde, por meio do Programa de Pesquisa para o SUS pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do estudo.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade da realização do curso.

A todos os proprietários que consentiram a participação de seus animais no estudo, muito deles com o coração apertado, mas certo de estarem dando sua contribuição para a evolução da ciência.

Enfim, sou eternamente grato a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS E QUADROS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiv
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 JUSTIFICATIVA .....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3. 1 Etiologia e taxonomia .....	19
3. 2 Transmissão e ciclo biológico .....	22
3. 3 Epidemiologia .....	23
3. 4 Patogenia e patologia .....	25
3. 5 Sintomatologia clínica .....	26
3. 6 Diagnóstico .....	27
4 OBJETIVOS .....	28
4.1 Geral .....	28
4.2 Específicos .....	28
5 HIPÓTESES .....	28
6 ESTRUTURA DA TESE .....	29



7 CAPÍTULO I – Aspectos epidemiológicos e identificação molecular de <i>Leishmania</i> em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil .....	30
8 CAPÍTULO II – Avaliação clínica, hematológica, bioquímica e histopatológica em gatos domésticos ( <i>Felis catus</i> ) com leishmaniose visceral .....	50
9 CAPÍTULO III – Infecção de <i>Lutzomyia longipalpis</i> em gatos infectado por <i>Leishmania infantum</i> .....	66
10 CAPÍTULO IV – Transmission of <i>Leishmania infantum</i> from a cat to a dog .....	80
11 CONCLUSÕES GERAIS .....	93
12 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94
13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	95
14 ANEXOS .....	104
14.1 Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal .....	104
15 APÊNDICES .....	105
15.1 Apêndice I – Termo de consentimento .....	105
15.2 Apêndice II – Questionário socioambiental .....	106
15.3 Apêndice III – Termo de doação .....	107

## LISTA DE FIGURAS

### *REVISÃO DE LITERATURA*

**Figura 1:** Ciclo de vida da *Leishmania* em mamíferos e no vetor. .... 23

### *CAPÍTULO I*

Figura 1: Georreferenciamento com a distribuição espacial dos casos de leishmaniose visceral em gatos, confirmados pelo método de exame parasitológico, em Teresina, estado do Piauí, Brasil, 2014 a 2018. .... 38

Figura 2: Gel de eletroforese da PCR-RFLP, região ITS1 do DNA de *Leishmania infantum* isoladas de cinco dos 20 gatos (linhas 1, 2, 3, 4, 5), A: produto da PCR (300-350pb) da região ITS1 do DNA do gênero *Leishmania*, com marcador molecular (M) de 100pb. B: fragmentos de restrição da região ITS1 do DNA do gênero *Leishmania* cortado com a enzima *Hae* III. Legenda: CP - controles positivos de *L. infantum*, indicando os fragmentos de 187 pb, 72 pb e 55 pb; CN – reação de controle negativo; M1 - marcador molecular de 100pb e M2 – marcador molecular de 25pb. .... 41

Figura 3: Árvore filogenética desenhada com base nas sequências dos minicírculos (681 pb) do DNA de *Leishmania* sp. isoladas de gatos doméstico de Teresina, Piauí, Brasil. .... 42

## CAPÍTULO II

Figura 1: Alterações clínicas observadas nos gatos infectados por *L. infantum*. A e B – Nódulos de consistência amolecida nas bordas das orelhas (bilateral). C – Blefarite e lesão periocular. D – Nódulo que evoluiu para lesão ulcerativa no lábio superior. .... 56

Figura 2: Nódulos e lesões na pele de gatos infectados por *L. infantum*. A e B – Nódulos e lesões nas patas. C – Lesão na região da articulação coxofemoral. D – Lesão envolvendo o focinho, plano nasal e lábio superior. .... 57

Figura 3: *Leishmania* sp. na forma amastigota (setas) em esfregaço corado com GIENSA, realizado utilizando o exsudato sanguinolento de nódulo localizado na orelha de gato infectado por *L. infantum*. .... 58

## CAPÍTULO III

Figura 1: Xenodiagnóstico realizado na parte posterior da orelha de um gato infectado por *L. infantum*. .... 71

Figura 2: Segmentos anatômicos de inseto vetor submetido ao xenodiagnóstico em gato infectado por *L. infantum*. Legenda: A – Sistema digestivo. A1 – Intestino anterior. A2 – Estômago e A3 – Intestino posterior. B – Espermateca apresentando características morfológicas compatíveis com a espécie *L. longipalpis* (seta). .... 72

Figura 3: Porcentagem de sinais clínicos observados nos 12 gatos com leishmaniose visceral. .... 73

Figura 4: *Leishmania* na forma promastigota no sistema digestivo do inseto *L. longipalpis*, seis dias após a realização de xenodiagnóstico em gato infectado por *L. infantum*. A – *Leishmania* sendo liberadas devido ao rompimento do intestino anterior do inseto vetor. B – *Leishmania* extravasando do estômago do vetor após rompimento do estômago. .... 75

## ***CAPÍTULO IV***

- Figure 1: Domestic cat with visceral leishmaniasis. A: Nodules of softened consistency at the edge of the ear. B: Lesion on right anterior limb. C: Uveitis. D: *Leishmania* Amastigotes in smear of ear nodules scraping stained by Giemsa. .... 83
- Figure 2: Thousands of *Leishmania* in promastigote form coming out of the vector *L. longipalpis* stomach, which had fed on the cat infected by *L. infantum*. .... 87
- Figure 3: Clinical characteristics of the dog submitted to experimental infection by *L. infantum*, through the insect vector infected by the feline with VL. A: three months after infection. B: 12 months after infection. .... 88

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### **REVISÃO DE LITERATURA**

Quadro 1: Localização geográfica e métodos de identificação das espécies de <i>Leishmania</i> spp. encontradas em gatos. ....	20
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### **CAPÍTULO I**

Tabela 1: Resultado dos exames parasitológico e ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de leishmaniose visceral em gatos de Teresina-PI. ....	37
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2: Características dos gatos domésticos incluídos no estudo e comparação entre os infectados e não infectados. ....	39
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3: Análise de probabilidade e fatores de risco associados à infecção por <i>L. infantum</i> , em gatos domésticos, na cidade de Teresina - PI, Brasil. ....	40
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### **CAPÍTULO II**

Tabela 1: Número e percentual de sinais clínicos em gatos com leishmaniose visceral. .	55
----------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2: Média e desvio padrão de parâmetros hematológicos e bioquímicos em gatos com ausência de sinais clínicos e exames para leishmaniose visceral (LV) negativos (grupo controle), com alteração clínica ou sorologia positiva para LV e negativos na pesquisa de <i>Leishmania</i> sp. (grupo suspeito) e com LV (grupo infectado). ....	59
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3: Ocorrência de <i>Leishmania</i> sp. em baço e fígado e alterações macroscópicas observadas durante a necropsia e microscópicas observadas na histopatologia de baço, fígado e rim, em gatos infectados por <i>L. infantum</i> . ....	60
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

***CAPÍTULO III***

Tabela 1: Resultado do xenodiagnóstico realizado em gatos infectados por <i>Leishmania infantum</i> . .....	73
Tabela 2: Características clínicas e infecciosas relacionadas ao resultado do xenodiagnóstico em gatos infectados por <i>Leishmania infantum</i> . .....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

A/G	Relação albumina / globulina
ALT	Alaninoaminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ESP	Especificidade
FAPEPI	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
IC	Intervalo de confiança
LASAN	Laboratório de Sanidade Animal
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
NNN	Novy, MacNeal, Nicolle
PI	Piauí PCR – reação em cadeia da polimerase
PPSUS	Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
RFLP	Polimorfismo de fragmento de restrição
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SEM	Sensibilidade
TR DPP <sup>®</sup>	Teste rápido plataforma de dupla corrida
UFPI	Universidade Federal do Piauí
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária causada pela espécie *Leishmania infantum* nas Américas. O cão doméstico é considerado o principal reservatório e, no ambiente urbano, a LV em gatos vem ganhando destaque. Entretanto, a participação destes animais no ciclo biológico da *L. infantum* era desconhecida. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a participação do gato doméstico (*Felis catus*) no ciclo epidemiológico da LV. Foram examinados 307 gatos, os quais foram submetidos à anamnese para verificar a ocorrência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose, coleta de sangue para exame hematológico, quantificações bioquímicas, sorologia para retrovírus e sorologia para leishmaniose, aspirado de linfonodo poplíteo e medula óssea e raspado de pele com lesão para confirmar a infecção pelo método de pesquisa direta de *Leishmania*. As *Leishmania* isoladas dos gatos foram submetidas a estudos moleculares (PCR-RFLP e sequenciamento) para identificação das espécies, 12 dos animais infectados foram submetidos a xenodiagnóstico para verificar a capacidade de infectar o vetor e cinco foram necropsiados para estudo histopatológico de baço, fígado e rim. Um dos gatos com LV e um cão saudável foram utilizados para testar a possibilidade de transmissão da doença do gato para o cão. Os resultados deste estudo revelaram que os gatos se infectam por *L. infantum* e foi observada uma prevalência de 6,5% no exame parasitológico, 12,1% no ELISA e 9,1% no TR DPP®. Os gatos infectados estavam presentes em todas as zonas demográficas da cidade. As principais alterações clínicas e laboratoriais observadas nos animais com LV foram: linfadenopatia, alopecia, emagrecimento, lesão ulcerativa na pele, nódulos na pele, redução significativa nos valores de hemácias e hematócrito, presença de *Leishmania* em baço, hepatite, degeneração hepática e infiltrados inflamatórios em rim. Os 20 gatos positivos para LV estavam infectados pela espécie *L. infantum* e o sequenciamento apontou não haver diferença entre os parasitos isolados de gatos com os de cães publicados no GenBank. 67% dos animais submetidos ao xenodiagnóstico infectaram o vetor e a transmissão da LV do gato para o cão foi confirmada. Conclui-se que a LV em gatos de Teresina-PI apresenta elevada prevalência e foi demonstrado que gatos infectados por *L. infantum* são capazes de infectar o vetor biológico *Lutzomyia longipalpis* e transmitir a infecção para outro indivíduo não infectado, confirmando a participação ativa destes animais no ciclo epidemiológico da LV.

**Palavras-chave:** Epidemiologia; *Leishmania infantum*; calazar; sequenciamento; anemia; lesão cutânea.



## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (LV) is a parasitic zoonosis caused by the *Leishmania infantum* species in the Americas. The domestic dog is considered the main reservoir and, in the urban environment, LV in cats has been gaining prominence. However, the participation of these animals in the biological cycle of *L. infantum* was unknown. Therefore, the general objective of this study was to evaluate the participation of the domestic cat (*Felis catus*) in the epidemiological cycle of VL. A total of 307 cats were examined, which were submitted to anamnesis to verify the occurrence of clinical signs related to leishmaniasis, blood collection for hematological examination, biochemical quantifications, serology for retroviruses and serology for leishmaniasis, aspiration of popliteal lymph node and bone marrow and scaling of skin scraping with lesion to confirm the infection by the direct search method of *Leishmania*. The isolated *Leishmania* of the cats were submitted to molecular studies (PCR-RFLP e sequencing) to identify the species, 12 of the infected animals were submitted to xenodiagnosis to verify the infection of the vector and five were necropsied for histopathological study of spleen, liver and kidney. One of the cats with LV and a healthy dog were used to test the possibility of transmission of cat disease to the dog. The results of this study show that the cats are infected by *L. infantum* and a prevalence of 6.5% was observed in parasitological examination, 12,1% in ELISA and 9.1% in TR DPP<sup>®</sup>. Infected cats were present in all demographic areas of the city. The main clinical and laboratory abnormalities observed in animals with VL were: lymphadenopathy, alopecia, weight loss, ulcerative lesions on the skin, nodules on the skin, significant reduction in red blood cell and hematocrit values, presence of *Leishmania* in spleen, hepatitis, liver degeneration and inflammatory infiltrates in kidney. The 20 LV-positive cats were infected by the *L. infantum* species and the sequencing showed no difference between the parasites isolated from cats and those from dogs published in GenBank. 67% of the animals submitted to xenodiagnosis infected the vector and the LV transmission from the cat to the dog was confirmed. It is concluded that LV in Teresina-PI cats presents high prevalence and it has been demonstrated that cats infected by *L. infantum* are able to infect the biological vector *Lutzomyia longipalpis* and transmit the infection to another uninfected individual, confirming the active participation of these animals in the epidemiological cycle of LV.

**Keywords:** Epidemiology, *Leishmania infantum*; calazar; sequencing; anemia; cutaneous injury.

## 1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são infecções parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete tanto os humanos quanto várias espécies animais domésticos e silvestres (Harhay et al., 2011), incluindo os gatos domésticos (*Felis catus*) (Mendonça et al., 2017). É uma doença sistêmica causada por espécies de *Leishmania* que fazem parte do complexo Donovanii, sendo a *L. infantum* responsável por causar leishmaniose visceral (LV) nas Américas e tem o cão como principal reservatório (Harhay et al., 2011; Marcondes et al., 2013).

A LV apresenta ampla distribuição no Brasil, sendo relatados casos em todas as regiões do País (Sousa et al., 2009). No Estado do Piauí, no ano de 2017, foram registrados 230 casos humanos da doença (Brasil, 2017). Quanto aos cães, de 1995 a 2013, a soro-prevalência da LV nesses animais, em Teresina, variou de 1,6% em 1996 a 41% em 2013, com média de 9% (Oliveira, 2014).

Nos gatos, estudos anteriores relatam que esses animais são acometidos por LV, mas sua participação no ciclo da doença não se encontra completamente esclarecida. Entretanto, a possível infecção de flebotomíneos relatada ao realizar xenodiagnóstico em gato infectado (Maroli et al., 2007; Silva et al., 2010), reforça a hipótese de esses animais fazerem parte do ciclo epidemiológico da LV.

O primeiro caso de infecção natural em gato por *Leishmania* sp. no Brasil foi registrado em 1939, em um gato com úlceras nas orelhas e no nariz, localizado no estado do Pará, porém, a espécie causadora não foi identificada (Mello, 1940). Outros estudos realizados no Brasil relataram a infecção em gatos domésticos por *Leishmania* spp. em Aurá-PA (Mello, 1940), *Leishmania* do subgênero *Viannia* em Belo Horizonte-MG (Passos et al., 1996), *L. infantum* em Cotia-SP (Savani et al., 2004), Araçatuba-SP (Vides et al., 2011), Andradina-SP (Coelho et al., 2011) e Teresina-PI (Mendonça et al., 2017), *L. amazonensis* em Campo Grande-MS (Souza et al., 2005) e em Ribas do Rio Pardo-MS (Souza et al., 2009). Também foi observada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos em outras partes do Brasil, em Barra Mansa-RJ (Figueiredo et al., 2009) e Recife e Petrolina-PE (Silva et al., 2014).

Em Teresina, Piauí, Brasil, onde a LV é endêmica, tanto em cães quanto em humanos, também há relato da infecção em gatos, sendo registrados três gatos domésticos infectados por *L. infantum* de 83 animais examinados (Alves, 2011; Harhay et al., 2011; Mendonça et al., 2017).

Vários estudos relataram a infecção em gatos, entretanto há poucas informações sobre as possíveis alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas da leishmaniose nesses

animais. Alguns pesquisadores relataram a presença do parasito em órgãos linfóides (baço, fígado, linfonodo e medula), mas não se sabe com precisão sobre os danos provocados pela visceralização da *Leishmania* em gatos.

Alguns sinais clínicos já foram observados em gatos parasitados. Os frequentemente relatados são: alterações dermatológicas (úlceras, nódulos, alopecia) e enfartamento ganglionar (Navarro et al., 2010). Entretanto, o diagnóstico clínico é complexo e difícil de ser realizado, devido aos sinais clínicos observados em gatos com leishmaniose serem compatíveis aos observados em outras enfermidades que ocorrem nesses animais.

Além disso, os gatos, possivelmente, apresentam resposta imunológica mais eficiente que os cães à infecção por *L. infantum*, tornando-os resistentes e, geralmente só desenvolvem sinais clínicos quando ocorre imunodepressão (Grevot et al., 2005; Duarte et al., 2010). Na literatura, há estudos mostrando associação positiva entre a co-infecção *L. infantum* e retrovírus (Vírus da Imnuodeficiência Felina-FIV e Vírus da Leucemia Felina-FeLV) e os gatos que apresentam co-infecção com FIV e FeLV geralmente desenvolvem sinais clínicos (Vicente Sobrinho et al., 2012).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Em revisão de literatura realizada por Pennise et al. (2015) a respeito da LV em gatos fica evidente a carência de informações acerca: da distribuição geográfica da infecção nesses animais, da participação dos gatos no ciclo de transmissão da doença, das alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas dos animais infectados e da identidade genética das espécies que parasitam os gatos.

A identificação de gatos infectados por *Leishmania*, sobretudo por *L. infantum*, e a possibilidade de infecção de flebotomos por este parasito ao realizar xenodiagnóstico em gatos naturalmente infectados em Teresina-PI, área de elevada transmissão de LV, alerta as autoridades a buscarem novas medidas de controle da doença, visto que apenas a eutanásia de cães sororreagentes (principal medida adotada pelo Ministério da Saúde no controle da LV canina e humana no Brasil) não tem sido suficiente para o controle da doença em áreas endêmicas, devendo, portanto levar em consideração a possibilidade da ocorrência de outros reservatórios.

Outros trabalhos já demonstraram a possibilidade de infecção de flebotomínios por *L. infantum* em Messina na Itália (Maroli et al., 2007) e em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

(Silva et al., 2010). Porém, não haviam estudos demonstrando que os gatos com LV em Teresina eram capazes de infectar o vetor. Este estudo se fez necessário devido à possibilidade de a *L. infantum* em Teresina, apresentar característica genética distinta da espécie isolada em outras regiões demográficas (Ribolla et al., 2016). Diferença que pode interferir na capacidade de infecção, tanto para os gatos quanto para o vetor, sendo esta, uma importância de investigar a evolução da doença em gatos de Teresina, identificar o padrão genético dos parasitos e a possibilidade de infecção do vetor neste cenário distinto, onde a LV necessita de muita atenção, tanto na saúde humana quanto animal. Além disso, não havia estudos investigando a possibilidade de transmissão da LV do gato para o cão.

Os índices de transmissão da LV em Teresina são muito elevados, tornando esta cidade um cenário ideal para investigar a real prevalência de infecção em gatos. Devido à ampla disseminação da doença na cidade é possível que esses animais estejam sendo alvo, com elevada frequência, de insetos infectados por *L. infantum*. A elevada transmissão e distribuição da doença na Cidade, sugere que as condições ambientais nessa região sejam ideais para o aumento da população de flebotomíneos, sobretudo, *Lutzomyia longipalpis*, possibilitando encontrar gatos infectados em todas as áreas demográficas da Cidade, tornando evidente a necessidade de investigar a doença nos animais dessa região.

Devido ao aumento dos casos relatados de *Leishmania* sp. e, especialmente, de *L. infantum* em gatos domésticos e a ocorrência de infecção em gatos em Teresina-PI (Mendonça et al., 2017), surgiu a necessidade de estudar a prevalência da infecção desses animais nessa cidade, área endêmica para LV canina e humana. Além disso, estudar a possível participação desses animais no ciclo epidemiológico da LV nesse cenário de transmissão, as alterações clinicopatológicas da infecção em gatos e caracterizar a cepa de *Leishmania* presente nesses animais.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Etiologia e taxonomia**

O gênero *Leishmania* pertence ao Subreino Protozoa, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae e apresenta o Subgênero *Leishmania* onde estão presentes as espécies *L. (L) archibaldi*, *L. (L) donovani*, *L. (L) chagasi* e *L. (L) infantum* que fazem parte do complexo donovani e são responsáveis por causar LV, das quais a última é o agente etiológico da LV no Continente Americano (Bañuls et al., 2007; Harhay et al., 2011). Para Mendes et al. (2014) a LV

nas Américas é causada pela *L. (infantum) chagasi*, considerando se tratar de uma única espécie. A *L. infantum* e *L. chagasi* devem ser consideradas como sinônimos e o nome primeiramente determinado prevalece, sendo *L. infantum* o nome válido para o agente causal da LV no Continente Americano (Dantas-Torres, 2006).

A classificação taxonômica da *Leishmania* foi inicialmente baseada em critérios ecobiológico, como: vetores, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestação clínica. No entanto, a análise bioquímica e molecular mostrou que os critérios patológicos e geográficos foram muitas vezes inadequados e, portanto, outros critérios, tais como os padrões de polimorfismo exibidos por marcadores moleculares da região kinetoplastica do DNA (kDNA), proteínas ou fatores antigênicos, bem como avaliação da sequência de nucleotídeos, passou a ser utilizados para identificação de parasitos do gênero *Leishmania* (Bañuls et al., 2007; Benassi et al., 2017).

Cinco espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* já foram identificadas em gatos: *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, sendo a espécie *L. infantum* a mais frequentemente encontrados parasitando o gato doméstico (Tabela 1).

Quadro 1: Localização geográfica e métodos de identificação das espécies de *Leishmania* spp. encontradas em gatos.

<b>Espécie</b>	<b>Localização geográfica</b>	<b>Método de identificação</b>	<b>Referência</b>
<i>L. mexicana</i>	USA (Texas)	Eletroforese isoenzimática	Barnes et al., 1993
	USA (Texas)	PCR e Sequenciamento	Trainor et al., 2010
	Venezuela (Barquisimeto)	PCR-RFLP e Sequenciamento	Rivas et al., 2018
<i>L. venezuelensis</i>	Venezuela (Barquisimeto)	Imunomarcção com anticorpo monoclonal e Eletroforese isoenzimática	Bonfante-Garrido et al., 1991
<i>L. braziliensis</i>	Brasil (Belo Horizonte, Minas Gerais)	PCR e Hibridização	Passos et al., 1996
	Brazil (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro)	Eletroforese isoenzimática	Schubach et al., 2004
	França (French Guiana)	PCR e Sequenciamento	Rougeron et al., 2011
<i>L. amazonensis</i>	Brasil (Campo Grande, Mato Grosso do Sul)	Imunomarcção com anticorpo monoclonal	Souza et al., 2005

Quadro 1: Continuação ...

<b>Espécie</b>	<b>Localização geográfica</b>	<b>Método de identificação</b>	<b>Referência</b>
<i>L. infantum</i> (Sin. <i>L. chagasi</i> )	Brasil (Teresina, Piauí)	PCR-RFLP	Mendonça et al., 2017
	Brasil (Cidade de Araçatuba, São Paulo)	PCR e Sequenciamento	Vides et al., 2011
		PCR e Sequenciamento	Vicente Sobrinho et al., 2012
	Brasil (Cidade de Andradina, São Paulo)	PCR e Sequenciamento	Coelho et al., 2011
	Brasil (Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais)	Sorologia e PCR	Silva et al., 2010
	Brasil (Cidade de Cotia, São Paulo)	PCR e Sequenciamento	Savani et al., 2004
	Brasil (Campo Grande, Mato Grosso do Sul)	PCR-RFLP	Noé et al., 2015
	Brasil (Cidade de Pirassununga, São Paulo)	PCR e Sequenciamento	Benassi et al., 2017
	Irã (Províncias de Fars e Azerbaijão Oriental)	PCR e Eletroforese isoenzimática	Hatam et al., 2010
	Itália (Imperia, Liguria)	PCR-RFLP	Poli et al., 2002
	Itália (Messina, Sicília)	Eletroforese isoenzimática	Gramiccia et al., 2005
	Itália (ilha de Lipari, Sicília)	Eletroforese isoenzimática e PCR-RFLP	Maroli et al., 2007
	Suíça	PCR e Sequenciamento	Richter et al., 2014
	França (Alpes Marítimos)	Eletroforese isoenzimática	Ozon et al., 1998
	Espanha (Barcelona)	PCR e Sequenciamento	Tabar et al., 2008
	Espanha (comunidade de Madrid)	PCR e Sequenciamento	Ayllon et al., 2012 Perillo et al., 2013
	Espanha	Imunomarcacão com anticorpo monoclonal	Navarro et al., 2010
	Espanha (Maiorca)	PCR-RFLP	Millán et al., 2011
	Portugal (região de Lisboa)	PCR e Sequenciamento	Maia et al., 2008 Maia et al., 2010
	Portugal (regiões de Lisboa e Algarve)	PCR e Sequenciamento	Maia et al., 2014
Grécia (Tessália e Macedônia)	PCR e Sequenciamento	Chatzis et al., 2014a	

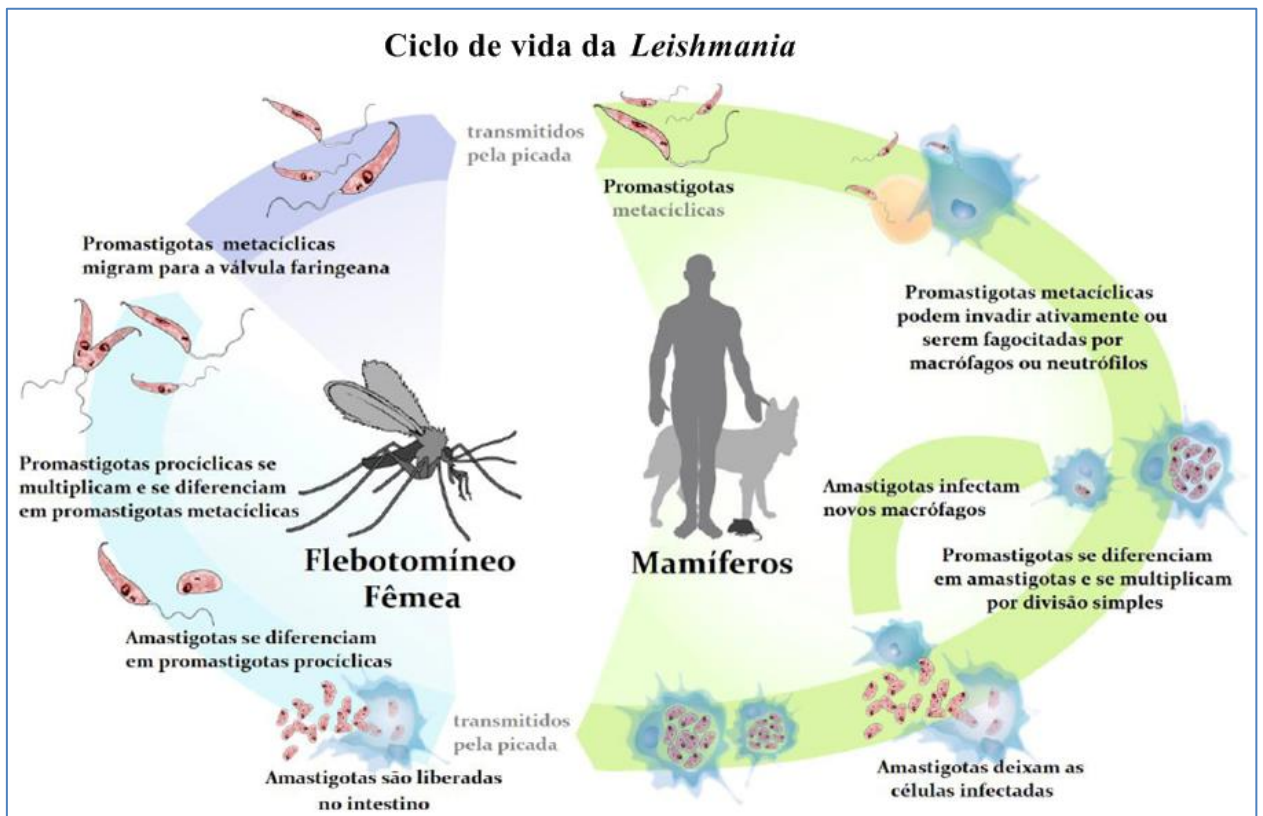
### 3.2 Transmissão e ciclo biológico

A transmissão da *L. infantum*, agente etiológico da LV no Brasil, ocorre quando as fêmeas do inseto vetor, comumente denominado de flebotomíneo, da espécie *L. longipalpis* e *L. cruzi*, realizam o repasto sanguíneo. A fêmea, que é hematófaga, ingere a *Leishmania* ou células contendo *Leishmania* na forma amastigota, posteriormente evoluindo-se para promastigota no tubo digestivo do inseto, que será regurgitada no hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (Ikeda-Garcia et al., 2007).

Em relação à LV, a infecção do vetor ocorre quando existe parasitismo na pele ou em sangue periférico do hospedeiro (Brasil, 2010). O potencial de transmissão de cães, avaliado por xenodiagnóstico utilizando *L. longipalpis*, apontou os cães sintomáticos como os responsáveis pela infecção do inseto, não encontrando infecção do inseto utilizando cães assintomáticos (Verçosa et al., 2008).

Em gatos, há evidência que esses animais podem fazer parte do ciclo epidemiológico da LV, devido à possibilidade de infectar *L. longipalpis* ao realizar xenodiagnóstico em gatos infectados por *L. infantum*, conforme já relatado em estudo realizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (Silva et al., 2010) e pela infecção de *Phlebotomus perniciosus* ao realizar xenodiagnóstico também em gato infectado por *L. infantum* em Messina na Itália (Maroli et al., 2007).

Uma vez regurgitadas as *Leishmania* na pele do hospedeiro vertebrado, estas invadem os macrófagos, se diferenciam para amastigotas e se multiplicam por divisão binária (Santos-Gomes et al., 2000). Posteriormente ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação dos parasitos, sendo então fagocitados por novos macrófagos, favorecendo a sua disseminação por via hematológica e linfática podendo ser encontradas células infectadas em tecidos como baço, medula óssea e linfonodo (Figura 1) (Santos-Gomes et al., 2000; Harhay et al., 2011).



**Figura 1:** Ciclo de vida da *Leishmania* em mamíferos e no vetor.

Fonte: (Harvey et al., 2011)

### 3.3 Epidemiologia

Com base em dados coletados no período de 2007 a 2011, observou-se que aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos humanos de LV surge a cada ano, dos quais 90% ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (Alvar et al., 2012). É uma doença potencialmente fatal com distribuição mundial, sendo relatada em 76 países. Em 12 países das Américas a doença apresenta de forma endêmica e cerca de 96% dos casos das Américas ocorrem no Brasil, país em que são diagnosticados aproximadamente 3299 novos casos de LV humana a cada ano (OPAS-OMS, 2018).

O processo de expansão e urbanização da LV no Brasil foi bastante intenso, encontrando-se grande número de casos da doença em várias cidades de grande e médio porte. O aumento considerável do número de casos de LV está relacionado à existência de novas práticas agrárias, modelos de exploração do solo, processo de urbanização e as condições de moradias inadequadas nos centros urbanos que contribuíram para a adaptação do vetor a novos nichos ecológicos (Rodrigues, 2008).



O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, atualmente também se desenvolve em centros urbanos. Após o registro da primeira epidemia urbana em Teresina-PI, o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades da região Nordeste (São Luís, Natal e Aracaju), Norte (Boa Vista e Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros) e Centro Oeste (Cuiabá e Campo Grande) (Gontijo e Melo, 2004). No Estado do Piauí, foram registrados 157 casos humanos de LV em 2009 sendo que a capital correspondeu a 39,5% do total de casos do estado (Brasil, 2011). Informações mais recentes mostram que em 2017 o número de casos da doença em humanos no Piauí foram 230 (Brasil, 2017).

Amplamente difundida no Brasil e considerada uma zoonose, a LV acomete principalmente o homem, porém o cão é considerado o principal reservatório dessa enfermidade (Souza et al., 2008; Sousa et al., 2009). O primeiro trabalho documentando a infecção canina nas Américas foi publicado no Brasil na década de 1930 por Evandro Chagas que encontrou 4,1% dos cães infectados nas localidades de Moju e Abaetetuba no estado do Pará. Desde então vem aumentando significativamente o número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil se tornando um aspecto epidemiológico preocupante (Cimerman e Cimerman, 2003). Em Teresina, em 2009, foram registrados 3.332 casos de LVC, sendo considerada área endêmica para a doença (Alves, 2011). De 1995 a 2013, a soro-prevalência da LVC em Teresina variou de 1,6%, em 1996 a 41% em 2013, com média de 9% (Oliveira, 2014).

Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina no Brasil é considerada de grande importância, pois além de os cães apresentarem elevada susceptibilidade, quando infectados apresentam intenso parasitismo cutâneo sendo, portanto, a principal fonte de infecção para o vetor, caracterizando esse animal como o principal elo doméstico na cadeia de transmissão da LV (Neves et al., 2011). Entretanto, é possível que o gato doméstico também tenha importância no ciclo de transmissão, devido à capacidade destes animais também infectarem o vetor biológico (*L. longipalpis*), conforme já relatado em estudos realizado por Silva et al. (2010), representando, portanto, potenciais reservatórios dessa zoonose.

Após o primeiro relato de leishmaniose em gato doméstico por Sergent et al. 1912, vários casos de leishmaniose em gatos têm sido registrados (Simões-Mattos et al., 2004; Schubach et al., 2004; Da Silva et al., 2008; Vides et al., 2011), ocorrendo com maior frequência em áreas endêmicas para LV (Saló et al., 2007; Maia et al., 2008; Costa et al., 2010). Além disso, pesquisadores da Itália e do Brasil demonstraram a presença de promastigotas de *L. infantum* no intestino de flebotomíneos, comprovando a transmissibilidade para o vetor, ao

realizar repasto sanguíneo em gatos infectados (Maroli et al., 2007; Silva et al., 2010). Esta evidência de transmissibilidade comprovada dos parasitas de gatos a um vetor sugere que estes animais podem exercer o papel de reservatórios domésticos da doença ao invés de simplesmente um hospedeiro acidental.

Quanto à ocorrência de *L. infantum* em gatos, tem sido relatada no Irã, Israel, Egito, Grécia, Albânia, Itália, França, Espanha, Portugal e Brasil, com prevalência variando de 0,7% a 85,4% na pesquisa direta do parasito, 0,6% a 68,5%, utilizando métodos sorológicos e 0% a 60% utilizando métodos moleculares (Pennisi et al., 2015). No Brasil, a *L. infantum* em gatos já foi relatada nas cidades de Cotia-SP (Savani et al., 2004), Araçatuba-SP (Bresciani et al., 2010; Vides et al., 2011; Vicente Sobrinho et al., 2012), Belo Horizonte-MG (Silva et al., 2010), Andradina (Coelho et al., 2011), Campo Grande-MS (Noé et al., 2015), Pirassununga-SP (Benassi et al., 2017) e Teresina-PI (Mendonça et al., 2017), com prevalência variando de 0,7% a 18,2% na pesquisa direta do parasito e de 1,9% a 2,7 na PCR.

### 3.4 Patogenia e patologia

A LV é uma doença infecciosa grave e pode ser fatal se não tratada, devido a falha na resposta imunológica desenvolvida pelos hospedeiros. Nos cães, o período de incubação é bastante variado, podendo chegar a 25 meses e mínimo de dois meses (Silva, 2007). Essa variação no período de incubação provavelmente está relacionada à sensibilidade dos cães ao agente etiológico da LV. Nos cães sensíveis, com perfil de citocina Th2, o agente etiológico ou os imunocomplexos provocam lesões nas víceras, evoluindo para a morte, caso não haja intervenção terapêutica (Silva, 2007). Porém, alguns cães são resistentes, os quais desenvolvem resposta imunológica do tipo Th1 (Silva, 2007). Nestes se observa baixa carga parasitária e resposta inflamatória reduzida, com baixa produção de imunocomplexos (Costa, 2012). A infecção em cães resistentes pode evoluir para a cura espontânea, persistir no animal sem manifestação clínica ou, pelo menos, a evolução da doença neste grupo de animais é muito mais lenta que nos animais sensíveis.

Após a regurgitação pelo vetor, as *Leishmania* são disseminadas pelo corpo atingindo vários órgãos como pele, nódulos linfáticos, medula, baço, fígado e vários outros órgãos (Costa, 2012). Além disso, a resposta imunológica, com intensa produção de anticorpos, causa várias complicações clínicas em decorrência do acúmulo de imunocomplexos, atingindo vários órgãos

inclusive os rins, sendo as alterações renais uma das maiores causas de morte em cães com LV (Koutinas e Koutinas, 2014).

Em relação aos gatos, pouco se sabe sobre a patogênese da leishmaniose nesses animais. Entretanto, os gatos parecem desenvolver resposta imunológica eficiente contra a *Leishmania*, apresentando, portanto, resistência natural, decorrente de fatores genéticos, que inibe o desenvolvimento dos parasitos (Costa et al., 2010). Esta possível resistência foi observada numa infecção experimental realizada por Kirkpatrick et al. (1984), que detectou a presença de *L. infantum* na inspeção post-mortem de todos os animais na quarta semana de infecção, mas não detectou parasitas na vigésima quarta semana.

Em contrapartida, estudo realizado por Navarro et al. (2010), demonstra tanto alterações cutâneas (úlceras e nódulos) quanto envolvimento visceral (alterações hepáticas, esplênicas e renais), além de alterações oculares (conjuntivite, blefarite e/ou ceratite). Além disso, as alterações observadas estavam relacionadas com a presença de antígenos de *Leishmania* detectados por imunohistoquímica. Entretanto, não foi realizada a pesquisa de retrovírus, nem qualquer outra análise do comprometimento imunológico dos animais.

### **3.5 Sintomatologia clínica**

O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo apresentar sinais clínicos ou não (Longoni et al., 2012). Todavia, alguns autores relatam que o aparecimento de sinais clínicos está relacionado a alguma imunossupressão (Grevot et al., 2005; Duarte et al., 2010). Geralmente a doença em gatos está associada a outras enfermidades como a FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) e FeLV (Vírus da Leucemia Felina), responsáveis por causar imunossupressão (Vicente Sobrinho et al., 2012).

O quadro clínico na leishmaniose em gatos é inespecífico e assemelha-se aos sinais clínicos apresentados pela espécie canina. Já foram observados em gatos parasitados: úlceras nas orelhas e no nariz (Mello, 1940), úlcera na região entre os dígitos (Passos et al., 1996), nódulo no nariz, emagrecimento, desidratação, aumento dos nódulos linfáticos (Savani et al., 2004), alterações dermatológicas (Bresciani et al., 2010), dermatite com crostas e úlceras na face e regiões palmares e plantares (Coelho et al., 2010) e conjuntivite, blefarite e ceratite (Navarro et al., 2010).

### 3.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da leishmaniose felina é complexo e difícil de ser realizado, porque outras doenças de ordem dermatogênica são frequentes entre estes animais. A investigação do histórico e a relação dos aspectos epidemiológicos constituem pontos importantes a serem considerados para a obtenção do diagnóstico clínico correto, porque na prática, as dermatopatias representam a maior parte dos atendimentos na rotina clínica desses animais, que podem ser confundidas com alguns sinais vistos na leishmaniose.

A maioria dos exames utilizados para diagnosticar a leishmaniose canina também podem ser utilizados para diagnosticar a doença em gatos (Pennisi et al., 2015). A leishmaniose pode ser diagnosticada pelo método de exames parasitológicos (identificação do parasita em esfregaço sanguíneo e/ou cultivo do parasita), imunológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e moleculares (Reação de Cadeia em Polimerase – PCR) (Brasil, 2007; Silveira-Neto et al., 2011; Chatzis et al., 2014b).

O diagnóstico definitivo pode ser feito utilizando o método de exames parasitológicos, baseados na demonstração de formas amastigotas do parasita, tanto dentro do macrófago como na forma livre, também pela pesquisa de formas promastigotas ao semear amostras em meio de cultura, além de diagnóstico molecular, ambos utilizando amostras de pele, mucosas, sangue periférico, medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (Brasil, 2011; Vides et al., 2011; Chatzis et al., 2014b).

Em estudo realizado por Vides et al. (2011), ao pesquisar infecção por *Leishmania* em gatos utilizando diferentes métodos de diagnósticos, incluindo testes sorológicos, pesquisa direta e de antígenos do parasito, mostraram que a concordância entre os testes foi muito baixa e, ao avaliar os resultados dos animais positivos, verificou-se que a maioria dos gatos eram positivos em apenas um dos métodos empregados. Sabendo disso, fica evidente a necessidade de utilizar mais de um método de diagnosticar a leishmaniose nesses animais.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

Avaliar os aspectos epidemiológicos e as alterações clinicopatológicas da leishmaniose visceral em gatos domésticos (*Felis catus*), bem como a possível participação desses animais no ciclo de transmissão da doença.

### **4.2 Específicos**

- Avaliar a prevalência da leishmaniose em gato doméstico no município de Teresina-PI, área endêmica para LVC;
- Avaliar os aspectos clínicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de gatos domésticos infectados por *Leishmania* sp.;
- Identificar as espécies de *Leishmania* isolada de gatos naturalmente infectados;
- Estudar a variabilidade genética das *Leishmania* isoladas de gatos domésticos e comparar com as cepas isoladas de cães;
- Avaliar a influência da coinfeção por FIV e FeLV na apresentação clínica da leishmaniose visceral em gatos;
- Avaliar a infecção de flebotomíneos ao realizar repasto sanguíneo em gatos domésticos infectados por *Leishmania* sp.;
- Verificar a ocorrência de parasitismo na pele e órgãos linfáticos e relacionar com a infectividade do vetor;
- Verificar a possibilidade de transmissão da infecção por *L. infantum* de gato para cão.

## **5 HIPÓTESES**

H0: Os gatos não fazem parte do ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral.

H1: Os gatos fazem parte do ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral.

## **6 ESTRUTURA DA TESE**

Este estudo de Tese apresenta a seguinte estrutura formal: resumo, abstract, introdução, justificativa, revisão de literatura, objetivos, estrutura da tese, cinco capítulos contendo artigos completos elaborados seguindo as normas da revista para as quais serão submetidos, conclusões gerais, considerações finais, referências bibliográficas gerais, anexos e apêndices. Os títulos dos capítulos produzidos com os resultados deste estudo de Tese e a identificação das respectivas revistas (título, classificação e fator de impacto) encontram-se descritos abaixo.

### **Capítulo I**

TÍTULO: Aspectos epidemiológicos e identificação molecular de *Leishmania* em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil

REVISTA: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, B1 e 1,489

### **Capítulo II**

TÍTULO: Avaliação clínica, hematológica, bioquímica e histopatológica em gatos domésticos (*Felis catus*) com leishmaniose visceral

REVISTA: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, A2 e 0,259

### **Capítulo III**

TÍTULO: Infecção de *Lutzomyia longipalpis* em gatos infectado por *Leishmania infantum*

REVISTA: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, A2 e 2,833

### **Capítulo IV**

TÍTULO: Transmission of *Leishmania infantum* from a cat to a dog

REVISTA: Parasitology Research, A2 e 2,558

## 7 CAPÍTULO I

### Aspectos epidemiológicos e identificação molecular de *Leishmania* em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral no Brasil

#### RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) em gatos tem sido relatada com frequência em todo o mundo. No Brasil os relatos são mais frequentes em áreas endêmicas da doença. O número crescente de relato da doença nessa espécie estimulou-nos a desenvolver este estudo, cujo objetivo foi avaliar os aspectos epidemiológicos de gatos com LV em Teresina-Piauí, área de elevada transmissão da doença, bem como identificar a *Leishmania* isolada destes animais. O estudo transversal e randomizado foi realizado entre setembro de 2014 a dezembro de 2018. 307 animais, entre 4 meses a 14 anos de idade, machos e fêmeas e de raças variadas, foram submetidos a coleta de sangue para diagnóstico sorológico de LV e aspirado de linfonodo poplíteo, medula óssea e raspado de pele com lesão para confirmar a infecção utilizando o método de pesquisa direta de *Leishmania* em cultivo e esfregaço em lâmina. Uma vez isoladas em meio de cultura foram submetidas a estudos moleculares para identificação da espécie. Os resultados mostraram prevalência de 6,5% no exame parasitológico, 12,1% no ELISA e 9,1% no TR DPP®. Os gatos infectados estavam amplamente disseminados na cidade de Teresina, sendo encontrados animais positivos em todas as zonas da cidade: norte, sul, leste, sudeste e centro. Foi observada prevalência mais elevada nos animais adultos e a doença nos gatos esteve associada com algum problema de saúde nos animais da mesma residência. O estudo molecular revelou que os 20 animais positivos estavam infectados pela espécie *L. infantum* e indicou não haver diferença entre isolados de gatos e cães. Este é o primeiro estudo randomizado sobre a LV em gatos e através deste foi possível verificar elevada prevalência da infecção por *L. infantum* nesses animais, os quais estão amplamente disseminados na cidade de Teresina, Piauí, área endêmica para LV, podendo está participando de forma significativa na transmissão da doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** Epidemiologia. Prevalência. *Leishmania infantum*. Gatos domésticos.

## INTRODUÇÃO

Leishmanioses são infecções parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete tanto os humanos quanto várias espécies animais domésticos e silvestres<sup>1,2</sup>, incluindo os gatos domésticos (*Felis catus*). É uma doença sistêmica causada por espécies de *Leishmania* que fazem parte do complexo Donovanii, sendo a *L. infantum* (Sin. *L. chagasi*) responsável por causar leishmaniose visceral (LV) nas Américas e tem o cão como principal reservatório<sup>1,3</sup>.

A LV apresenta ampla distribuição no Brasil, sendo relatados em todas as regiões do País<sup>4</sup>. No Estado do Piauí, no ano de 2009, foram registrados 157 casos humanos sendo que a capital correspondeu a 39,5% do total de casos do estado<sup>5</sup>. De 1995 a 2013, a soro-prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) em Teresina variou de 1,6% em 1996 a 41% em 2013, com média de 9%<sup>6</sup>.

Estudos anteriores relatam que os gatos são acometidos por LV. O primeiro caso de infecção natural por *Leishmania* sp. nesses animais, aqui no Brasil foi registrado em 1939, em um animal com úlceras nas orelhas e no nariz, no estado do Pará, porém, a espécie do parasito não foi identificada<sup>7</sup>. Quanto à infecção por *L. infantum* em gatos no Brasil, estudos já relataram a ocorrência em Cotia<sup>8</sup>, Araçatuba<sup>9</sup> e Andradina<sup>10</sup>, no estado de São Paulo e em Teresina, no Piauí<sup>11</sup>. Também foi observada a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro<sup>12</sup> e de Recife e Petrolina, estado de Pernambuco<sup>13</sup>.

Teresina apresenta índices bastante elevados de transmissão da LV, tornando esta cidade um cenário ideal para estudar a epidemiologia da infecção em gatos, devido à possibilidade desses animais estarem sendo alvo, com elevada frequência, do vetor infectado. Devido à elevada transmissão e distribuição da doença na Cidade, suspeita-se que as condições ambientais nessa região contribuem para o aumento da população de flebotomíneos, sobretudo, *Lutzomyia longipalpis*, possibilitando encontrar gatos infectados em todas as áreas demográficas da Cidade.

Devido ao aumento dos relatos de *L. infantum* em gatos domésticos, surgiu a necessidade de pesquisar o comportamento da LV nesses animais em Teresina, Piauí, uma área de elevada prevalência da doença em cães e no homem. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os aspectos epidemiológicos da LV em gatos de Teresina, estado do Piauí, Brasil, bem como identificar a *Leishmania* isolada dos animais infectados.



## METODOLOGIA

### Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI), sob parecer nº 102/15 e realizado seguindo diretrizes da Lei Nº 11794, 8-10-2009, que estabelece procedimentos para a utilização de animais em atividade de pesquisa científica.

### Desenho experimental

Este estudo transversal da infecção por *Leishmania* em gatos foi realizado entre setembro de 2014 a dezembro de 2018. Os animais incluídos no estudo foram selecionados por randomização das residências a serem visitadas. Para tanto, utilizou-se a relação de residências cadastradas no sistema da Central elétrica de Teresina - Eletrobrás/Piauí. Foram randomizadas 200 residências e as que não tinham gatos eram substituídas pela localizada imediatamente a sua direita. Este critério foi adotado até chegar a uma residência que tinha gato. Os endereços incluídos no estudo tinham número de gatos variando de um a sete e todos eram examinados, totalizando 307 animais. A randomização foi realizada utilizando o programa estatístico BioEstat 5.3.

Os 307 animais, tinham idade variando entre 4 meses a 14 anos, machos e fêmeas e com raças variadas. Os proprietários assinaram o termo de consentimento permitindo a realização dos procedimentos com os animais e responderam ao questionário socioambiental, o qual foi realizado com o propósito de detectar características ambientais relacionadas à ocorrência da *Leishmania* nos gatos.

Os animais foram anestesiados com associação de 15 mg/kg de cloridrato de cetamina, 0,3 mg/kg de diazepam e 0,03 mg/kg de acepromazina, ambos na mesma seringa e administrados por via intramuscular. Em seguida, submetidos à coleta de sangue para diagnóstico sorológico para LV, aspirado de linfonodo poplíteo, medula óssea e raspado de pele com lesão para confirmar a infecção utilizando métodos de pesquisa direta de *Leishmania*.

## Diagnóstico parasitológico para leishmaniose visceral

O exame parasitológico foi realizado utilizando amostra de medula óssea e linfonodo poplíteo e distribuídos em meio de cultura NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) com 1mL de Schneider's suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), soro fetal bovino 10% e urina humana 2%. Uma alíquota da medula óssea, linfonodo poplíteo, além de raspado da pele de animais que tinham alopecia, lesão de pele ou nódulo subcutâneo, foi submetida à realização de esfregaço em lâmina para pesquisa direta do parasito<sup>11</sup>.

## Detecção de anticorpo anti-*Leishmania* sp. por imunoadsorção enzimática (ELISA)

O teste ELISA foi realizado utilizando o kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Brasil), seguindo metodologia descrita pelo fabricante, com modificações para utilização nos gatos. O conjugado específico para cães, fornecido no kit, foi substituído pelo conjugado de rato anti-IgG de gato A20-120P. As placas utilizadas foram as do kit, as quais já foram fornecidas sensibilizadas com antígeno solúvel de *Leishmania major-like*.

Antes da realização dos testes, realizou-se a padronização do ELISA para determinar a diluição ideal para o conjugado e para o soro sanguíneo. No processo de padronização foram utilizadas duas amostras de soro, uma controle positivo, obtido de um gato infectado por *L. infantum* com elevado valor de densidade óptica (DO) no ELISA e uma controle negativo, obtidas de um animal sem alteração clínica e negativo nos exames parasitológicos, sorológico e molecular para LV. As duas amostras de soro foram adquiridas de animais do estudo desenvolvido por Mendonça et al.<sup>11</sup>. Realizou-se diluição seriada do conjugado 1:10.000 a 1:80.000 e do soro 1:100 a 1:800. As diluições do soro e do conjugado foram testadas em triplicatas. A DO foi medida a 450 nm num leitor de microplacas URIT-660 (URIT Medical Electronic Co., Ltd, Guangxi, China). A maior razão controle positivo/controlado negativo foi obtida na diluição do soro 1:400 e conjugado 1:20.000, as quais foram utilizadas para realizar o teste ELISA nos 307 animais deste estudo.

Todas as mostras foram testadas utilizando o mesmo kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Brasil), seguindo metodologia descrita pelo fabricante, com as seguintes alterações no protocolo: as amostras de soro foram diluídas 1:400 e substituiu-se o conjugado específico para cães pelo conjugado de rato anti-IgG de gato A20-120P, o qual foi diluído 1:20.000. Para determinação do ponto de corte, utilizou-se amostra de soros de 10

gatos controle, os quais foram adicionados em todas as placas. Os soros dos 10 animais também foram obtidos do estudo de Mendonça et al.<sup>11</sup>, os quais foram adquiridos de animais que residiam em bairros de Teresina onde o LV canina apresentava baixa prevalência e todos eram negativos na PCR de medula óssea. O ponto de corte foi calculado pela média da densidade ótica dos controles negativos mais três vezes o valor do desvio padrão da DO dos controles negativos. Os animais que apresentaram DO maior que o ponto de corte foram considerados reativos.

Detecção de anticorpo anti-*Leishmania* sp. por Teste Rápido Plataforma de Dupla Corrida (TR DPP®)

Para realização deste teste utilizou-se amostra de soro sanguíneo dos gatos, a qual foi testada utilizando o kit “TR DPP® – Leishmaniose Visceral Canina” (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil). Na realização do teste, seguiu-se rigorosamente os procedimentos descritos pelo fabricante do kit, substituindo apenas amostra de soro canino pela amostra de soro dos gatos a ser testada.

Identificação de *Leishmania* sp. por reação em cadeia da polimerase e polimorfismo de fragmento de restrição (PCR-RFLP) da região ITS1

O DNA das formas promastigotas isoladas do linfonodo poplíteo de todos os gatos infectados foi extraído utilizando o kit “QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)”, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. A região (ITS1) do DNA de *Leishmania* foi amplificado utilizando iniciadores LITSR (5-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3) e L5.8S (5-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3). A mistura para a reação de PCR foi composta por 2.0 µl do DNA, 0.2 mM de cada dNTP, 0.1 nmol de cada primer, 2.5 U da AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 2.5µl do 10X buffer (Tris-HCl 50 mM, [pH 8.3], KCl 50 mM), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub> para um volume final de 15 µl. Como controle de referência, utilizou-se três cêpas de *Leishmania infantum* previamente identificadas no estudo de Mendonça et al.<sup>11</sup>. Um controle negativo sem DNA foi incluído em todos os testes. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 95°C por 2 min, 32 ciclos incluindo 95°C por 20s, 53°C por 1min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 6 min, a qual foi realizada utilizando o termociclador HID Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®). Os amplicons com 300-350 pares de base (pb) foram submetidos ao sistema de eletroforese vertical “Bolt Welcome

Pack (Invitrogen™)”, a 100V em tampão 1X tris/ácido bórico/EDTA em gel com 5% de acrylamida/bis-acrylamida 39:1 e corados com nitrato de prata.

O produto da PCR foi digerido com enzima endonuclease BsuRI (*HaeIII*) (Thermo Fisher Scientific Inc.), seguindo instruções descritas pelo fabricante. Os fragmentos de restrição foram submetidos ao sistema de eletroforese vertical “bolt welcome pack (Invitrogen™)” a 100V em tampão 1X tris/ácido bórico/EDTA em gel com 5% de acrylamida/bis-acrylamida 39:1, corados com nitrato de prata e comparados com os fragmentos de DNA das *Leishmania* utilizadas como controle de referência.

#### Identificação de *Leishmania* sp. por sequenciamento total dos minicírculos

As formas promastigotas de *Leishmania*, adquiridas de culturas positivas da medula óssea, linfonodo poplíteo e nódulos na pele foram submetidas à extração de DNA, utilizando o kit “QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)”, seguindo protocolo descrito pelo fabricante.

A sequência alvo para a realização do sequenciamento foi o minicírculo total do cinetoplasto do DNA da *Leishmania* o qual foi amplificado utilizando as seguintes sequências de nucleotídeos: Lchag1 144F (TAAACGGGGCTAGGGCTTTG), Lchag1 314R (CATTACCCCGCCACCGAATA), Lchag6 7F (TGTAATAATAGGGCCGGGTGG), Lchag6 202R (CCCACGCATACCCTAAAGCA), Lchag11 270F (GAGGCCGATGGGAATTGGAT), Lchag11 628R (CCATCCAACACGTCCCAACA), desenhados especialmente para este estudo, nas seguintes combinações: Lchag1 144F x Lchag1 314R, Lchag6 7F x Lchag6 202R, Lchag11 270F x Lchag11 628R e Lchag11 270F x Lchag6 202R, para o sequenciamento total do minicírculo.

A PCR foi realizada usando o kit KOD Plus NEO ® Master Mix (Toyobo, Japan), conforme especificações do fabricante. O volume total da reação foi de 50 microlitros e as condições da PCR foram: 98 °C por 2 min, 30 ciclos de (94 °C por 30 seg e 68 °C por 30 seg) e 72 °C por 7 min.

Os fragmentos amplificados foram purificados usando o Fast Gene Gel/PCR extraction kit (Nippon Genetics) para purificação do DNA amplificado, conforme especificações do fabricante. O produto purificado foi sequenciado no ABI3730XL sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) no Departamento de Medicina Tropical e Parasitologia de Dokkyo Medical University, conforme descrito por Sanguankiat et al.<sup>14</sup> e Otake Sato et al.<sup>15</sup>.

Os contigs gerados do sequenciador foram montados utilizando o pacote de programas STADEN, em seguida realizou-se um BLASTn para recuperar todas as sequências que tiveram pelo menos 50% de cobertura. Um Popset foi montado e utilizou-se o GUIDANCE web server para alinhar as sequências, utilizando o algoritmo PRANK. Para tratar o alinhamento foram utilizados o GBLOCK e as duas saídas do GUIDANCE. O “melhor” alinhamento (GBLOCKS) foi convertido em arquivos nexus e phylip para rodar Inferência Bayesiana (IB) e Máxima verossimilhança (ML). Os valores dos ramos foram expostos de modo que para IB  $\geq 95\%$  e ML  $\geq 70$ .

### Análise dos dados

Para verificação da eficiência do teste ELISA e TR DPP<sup>®</sup> em diagnosticar a LV em gatos foi mensurada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, levando em consideração o exame parasitológico como padrão ouro. Ainda na avaliação dos exames para LV foi realizada a análise de concordância *Kappa* entre os testes.

A possível relação entre as características dos gatos (idade, sexo e raça) e a infecção foi analisada utilizando o Teste Exato de Fisher e Odds Ratio. Estes dois testes também foram utilizados para verificar se alguns fatores de risco, obtidos com a realização de questionário socioambiental, estavam interferindo na ocorrência de LV nos gatos. As análises foram executadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e admitindo probabilidade de erro de 5%.

## RESULTADOS

Os resultados deste estudo mostram que os gatos se infectam por *Leishmania* sp. e foi observada uma prevalência de 6,5% no exame parasitológico, 12,1% no ELISA e 9,1% no TR DPP<sup>®</sup>. Considerando-se o exame parasitológico como padrão ouro, observou-se que o teste ELISA apresentou elevada especificidade e elevado valor preditivo negativo em diagnosticar a LV nessa espécie animal (Tabela 1). Na identificação das espécies de *Leishmania* sp. isoladas dos gatos ao analisar a região ITS1 do DNA do parasito pelo método de PCR-RFLP, observou-se que a característica molecular do parasito foi compatível com a espécie *L. infantum*, mesma espécie responsável por causar LV em cães e humanos no Brasil.

Tabela 1: Resultado dos exames parasitológico e ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de leishmaniose visceral em gatos de Teresina-PI.

Exame sorológico	Parasitológico		Total	Sen %	Esp %	VPP %	VPN %
	Pos	Neg		(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
ELISA Pos	17	20	37	85,0	93,6	46,0	99,0
ELISA Neg	3	267	270	62,1 – 96,8	89,4 – 95,7	29,5 – 63,1	96,8 – 99,8
TR DPP® Pos	16	12	28	80,0	95,8	57,1	98,6
TR DPP® Neg	4	275	279	56,3 – 94,3	92,8 – 97,8	37,2 – 75,5	96,4 – 99,6

Legenda: Pos – Positivo; Neg – Negativo; Sen – sensibilidade; Esp – especificidade; VPP – valor preditivo positivo e VPN – valor preditivo negativo.

Quanto a concordância entre os exames para diagnóstico de LV, obteve-se como índice de concordância *Kappa* e os respectivos intervalos de confiança os seguintes resultados: Parasitológico x ELISA 55,9% (45,3% - 66,5%) concordância moderada, Parasitológico x TR DPP® 63,9% (52,9% - 74,9%) concordância substancial e ELISA x TR DPP® 46,8 (35,7% - 57,8%) concordância moderada. A atribuição de moderada e substancial seguiu-se classificação determinada por Landis e Koch<sup>16</sup>.

Também foi observado que os gatos infectados estavam amplamente disseminados na cidade de Teresina (Figura 1). Dos 20 animais infectados três eram da zona sudeste, cinco da zona leste, seis da zona centro, quatro da zona norte e um da zona sul da cidade. Os bairros onde se encontrou gato com LV foram: Primavera (4 animais), Planalto Uruguaí (3), Centro (3), Matinha (3), Dirceu (2), Planalto Ininga (2), Bela Vista (1 animal), Cabral (1) e São João (1).

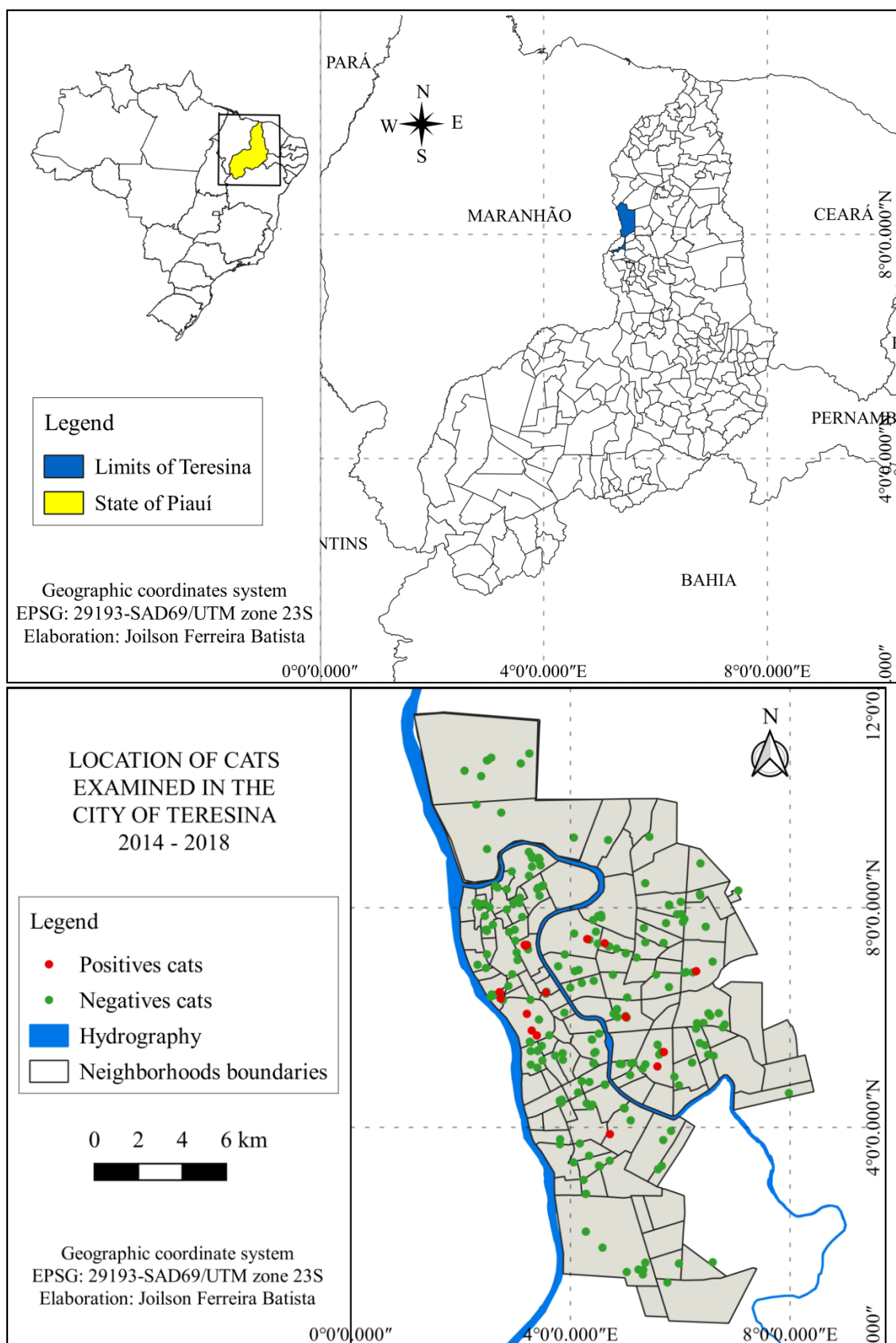


Figura 1: Georreferenciamento com a distribuição espacial dos casos de leishmaniose visceral em gatos, confirmados pelo método de exame parasitológico, em Teresina, estado do Piauí, Brasil, 2014 a 2018.

Ao analisar as características dos gatos, observou-se que nos animais adultos (3 a 8 anos) a prevalência da LV foi significativamente superior à observada nos animais jovens (Teste Exato de Fisher,  $p=0,04$ ). Não foi observada relação significativa ao avaliar as características: sexo e raça (Teste Exato de Fisher,  $p>0,05$ ). Entretanto, numericamente, o percentual de animais infectados da raça Siamês (20%) foi bem superior aos sem padrão racial definido (SRD) (6,1%), merecendo destaque (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos gatos domésticos incluídos no estudo e comparação entre os infectados e não infectados.

Características	Examinados	Positivos	Frequência (%)	p-valor (0,05)	Relação de Odds (IC 95%)
<b>Idade</b>					
Jovem (< 3 anos)	139	5	3,6		
Adulto (3 a 8 anos)	79	9	11,1	0,04*	3,5 (1,1 – 10,7)*
Senil (> 8 anos)	13	4	30,8	0,08	3,5 (0,9 – 13,6)
<b>Sexo</b>					
Fêmea	155	8	5,2		
Macho	152	12	7,9	0,36	1,6 (0,6 – 4,0)
<b>Raça</b>					
SRD	297	18	6,1		
Siamês	10	2	20,0	0,13	3,9 (0,8 – 19,6)

\* Estatisticamente significativo: jovem x adulto (teste Exato de Fisher's,  $p<0,05$  e Relação de Odds, Intervalo de Confiança-IC 95%). Legenda: SRD – Sem padrão racial definido.

Ao avaliar o questionário socioeconômico observou-se que 25% dos gatos infectados viviam em residência com acúmulo de lixo no quintal, 40% viviam em ambientes próximos a acúmulo de lixo e próximos a áreas com vegetação. Em 80% tinham cães infectados e em outras 70% relataram-se a presença de cães com LV no vizinho. 30% dos gatos infectados ficavam sempre no interior da casa, 45% circulavam dentro e fora e 25% ficavam sempre fora da casa. Em nenhuma das residências dos animais infectados foi relatada a presença de pessoas infectadas nas proximidades e nenhuma delas era desinsetizada.

Ao realizar a análise estatística dos dados, obtidos com a realização de questionamentos aos proprietários e observação do local pela equipe, observou-se que as residências nas quais os



gatos já haviam apresentado algum problema de saúde apresentaram maior probabilidade do animal está infectado (Tabela 3).

Tabela 3: Análise de probabilidade e fatores de risco associados à infecção por *L. infantum*, em gatos domésticos, na cidade de Teresina - PI, Brasil.

		Infectado	Não infectado	p-valor (0,05)	Odds ratio (IC 95%)
Tipo de residência	Casa	20	270	0,61	2,65 (0,15 – 45,7)
	Apartamento	0	17		
Acúmulo de lixo no quintal	Sim	5	128	0,11	0,41 (0,15 – 1,17)
	Não	15	159		
Acúmulo de lixo nas proximidades	Sim	12	195	0,47	0,71 (0,28 – 1,79)
	Não	8	92		
Áreas de vegetação nas proximidades	Sim	13	182	1,00	1,07 (0,41 – 2,77)
	Não	7	105		
Já teve cão com LV na residência	Sim	4	29	0,25	2,22 (0,70 – 7,10)
	Não	16	258		
Cão com LV na residência de vizinhos	Sim	6	65	0,42	1,46 (0,54 – 3,96)
	Não	14	222		
Pessoa com LV nas proximidades	Sim	0	15	0,61	0,43 (0,03 – 7,43)
	Não	20	272		
Criação de outros animais	Sim	13	160	0,49	1,47 (0,57 – 3,81)
	Não	7	127		
Desinsetização na residência	Sim	0	73	0,01*	0,07 (0,00 – 1,19)
	Não	20	214		
O gato já teve alguma doença	Sim	14	115	0,01*	3,49 (1,30 – 9,35)*
	Não	6	172		
Já levou o gato ao veterinário	Sim	11	98	0,09	2,36 (0,95 – 5,88)
	Não	9	189		
O gato já teve algum problema de pele	Sim	9	84	0,21	1,98 (0,79 – 4,94)
	Não	11	203		
Local da residência onde vive o gato	Dentro	6	85	0,52	0,63 (0,18 – 2,20)
	Fora	5	45		
	Dentro/fora	9	157		

Na identificação das espécies de *Leishmânia* sp. dos gatos pelo método de PCR-RFLP, observou-se que a característica molecular dos parasitos, isolados dos 20 gatos com leishmaniose, foi compatível com a espécie *L. infantum* (Figura 2).

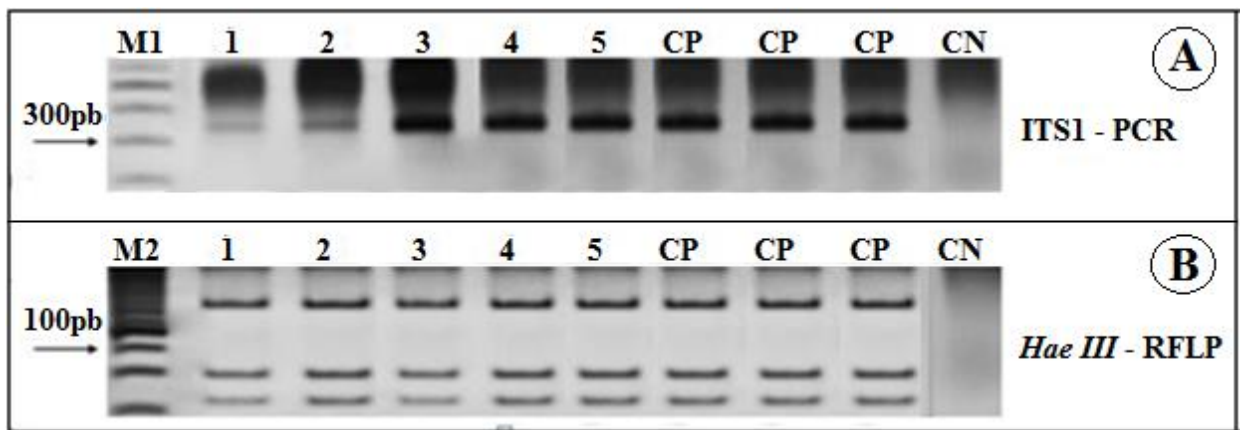


Figura 2: Gel de eletroforese da PCR-RFLP, região ITS1 do DNA de *Leishmania infantum* isoladas de cinco dos 20 gatos (linhas 1, 2, 3, 4, 5), A: produto da PCR (300-350pb) da região ITS1 do DNA do gênero *Leishmania*, com marcador molecular (M) de 100pb. B: fragmentos de restrição da região ITS1 do DNA do gênero *Leishmania* cortado com a enzima *Hae III*. Legenda: CP - controles positivos de *L. infantum*, indicando os fragmentos de 187 pb, 72 pb e 55 pb; CN – reação de controle negativo; M1 - marcador molecular de 100pb e M2 – marcador molecular de 25pb.

Para confirmar os resultados de identificação por PCR-RFLP, também realizou-se sequenciamento do DNA de 14 cêpas isoladas de sete gatos. Ao avaliar toda a sequência do minicírculo do kDNA da *Leishmania* isolada do mesmo animal, porém de região diferente (medula óssea, linfonodo poplíteo e nódulo na pele), observou-se que duplicatas ou triplicatas de cada animal eram 100% similar, não apresentavam divergência em nenhum dos 681 nucleotídeos.

Após geração do contig a partir das 14 amostras, a sequência do contig foi submetida à análise NCBI-BLAST para homologia (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) e todas as sequências detectadas eram geradas de *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*, espécies responsáveis por causar LV, apresentando similaridade variando de 81% a 97%. Este resultado confirma que os gatos estavam mesmo infectados pela *L. infantum*, agente etiológico da LV nas Américas.

As sequências registradas no GenBank que apresentaram acima de 50% foram utilizadas para elaboração da árvore filogenética, junto com as sequências dos isolados dos gatos. A análise filogenética revelou a formação de dois grandes grupos. Um formado pelas *L. infantum* e outro composto pelos isolados dos gatos (1 a 14), *L. chagasi* (Sin. *L. infantum*) e *L. donovani* (Figura 3).

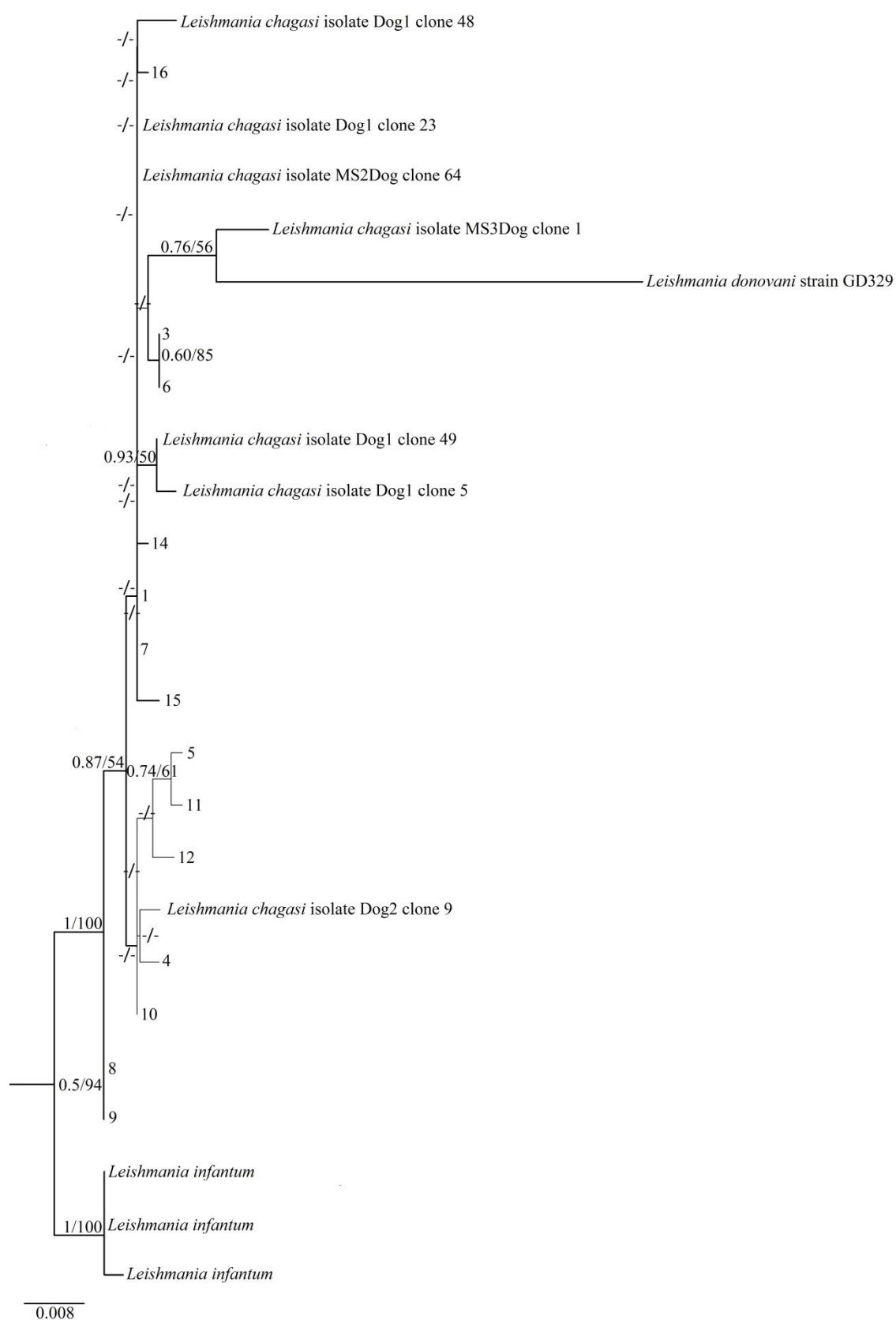


Figura 3: Árvore filogenética desenhada com base nas sequências dos minicírculos (681 pb) do DNA de *Leishmania* sp. isoladas de gatos doméstico de Teresina, Piauí, Brasil.

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que apresenta resultados importantes da real prevalência e distribuição de gatos infectados por *L. infantum* na cidade de Teresina, Piauí, Brasil, área endêmica para LV. Através deste estudo foi possível verificar que, além da cidade apresentar índices elevados da doença em cães e humanos, também apresenta alta prevalência da LV nos gatos (6,5%), utilizando como método de diagnóstico a pesquisa direta do parasito em amostra de medula óssea, linfonodo poplíteo e pele. O elevado número de gatos infectados por *L. infantum* na cidade, aliado ao comportamento destes animais de sair das residências para caçar ou ir à busca de parceiro sexual, bem como a grande quantidade de animais errantes na cidade, indicam que estes animais podem apresentar elevada importância para saúde pública no município.

Em outros estados brasileiros, a LV em gatos também já foi relatada. Estudos no estado de São Paulo relatou a ocorrência de 9,9% utilizando esfregaço de punção aspirativa de medula óssea e nódulos linfáticos, na cidade de Araçatuba-SP<sup>17</sup>, 0,7% utilizando *imprints* de linfonodo, também em Araçatuba-SP<sup>18</sup>, prevalência de 5,8% na pesquisa de formas amastigotas em nódulos linfáticos em Andradina-SP<sup>10</sup> e 1,9% utilizando PCR de swab conjuntival, em Pirassununga-SP<sup>19</sup>. Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, foi relatada prevalência de 2,7% na PCR de nódulos linfáticos, em gatos previamente triados por exame sorológico<sup>20</sup>. Os estudos apontam que a LV nesses animais apresenta ampla ocorrência no Brasil, sobretudo em áreas endêmicas para LV.

A soroprevalência, utilizando o teste ELISA e TR DPP<sup>®</sup>, neste estudo revelou percentuais elevados, 12,1% e 9,1, respectivamente. Porém, ao avaliar o desempenho dos testes sorológicos em diagnosticar à LV observou-se que ambos apresentaram baixa sensibilidade em detectar gatos verdadeiramente infectados e a concordância entre os testes ficou abaixo de 80%. Estudo realizado por Vides et. al.<sup>9</sup>, mostrou que os testes sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e ELISA) apresentaram baixa concordância com a pesquisa de amastigota em esfregaços de medula óssea, linfonodos, baço e fígado e com a imunohistoquímica de pele lesionada. Apontando a necessidade da combinação de diferentes métodos de diagnóstico para minimizar a ocorrência de resultados falso negativos.

Quanto à localização dos gatos infectados, os resultados mostraram que estão amplamente distribuídos na cidade de Teresina. Por muitos anos a LV foi considerada doença de ambiente rural, evoluindo, ao longo dos anos, para a periferia de áreas urbanas, devido a diversos fatores

ambientais e interferência humana<sup>21</sup>. Hoje sabemos que em áreas endêmicas a doença no cão já está disseminada em toda cidade. O resultado da distribuição espacial de gatos com *L. infantum* não foi diferente, 35% foram de residências localizadas na zona central da cidade. Entretanto, ainda não se sabe se os gatos são vítimas da alta ocorrência da doença na cidade ou se os mesmos apresentam papel significativo na transmissão da doença para cães e para o homem, visto que, as medidas de controle da doença, por ações voltadas para os cães, não apresentaram resultados satisfatório<sup>22,23,24</sup>, indicando a possível existência de outros hospedeiros com importância epidemiológica no ambiente urbano.

Ainda sobre a localização geográfica dos gatos com LV, uma possível causa da alta ocorrência de animais infectados na zona central da cidade é a hidrografia do município. Dois grandes rios, Parnaíba e Poty, atravessam a cidade e limitam a zona central em sua extremidade Oeste e Leste, respectivamente. É possível que nas margens desses rios, o acúmulo de matéria orgânica e a umidade, forneçam condições ambientais ideais para o aumento na população de flebotômíneos, contribuindo para maior transmissão da doença nesses locais e, conseqüentemente, maior prevalência da doença nos gatos da zona central, visto que, a maioria dos bairros situados nesta área da cidade se localiza na margem de um dos rios.

Quanto aos fatores de risco da doença nos gatos, observou-se que os mais jovens (até 3 anos) parecem ser mais resistentes ou a doença nos gatos apresentam evolução lenta e a infecção é detectada, com maior frequência, quando os animais já estão adultos ou senil ( $\geq 3$  anos). Estudos anteriores têm relatado que os gatos são resistentes à LV e a doença se manifesta nesses animais quando os mesmos apresentam alguma imunodeficiência, apresentando alta relação com os Vírus da Imunodeficiência Felina e o Vírus da Leucemia Felina<sup>25,26,27</sup>, sendo a resistência natural dos gatos à infecção por *L. infantum* uma possível causa da baixa prevalência em animais com idade inferior a três anos.

Não se sabe ao certo a real participação dos gatos no ciclo epidemiológico da LV. Mas dois estudos anteriores já relataram a infecção de flebotômíneos ao se alimentarem em gatos infectados por *L. infantum*<sup>28,29</sup>. Neste contexto, é possível que estes animais estejam participando não somente como fonte alimentar para flebotômíneos, mas também como responsáveis pela infecção do vetor, sendo necessários mais estudos para verificar se os gatos com LV em Teresina são capazes de infectar o *L. longipalpis* e transmitir a infecção para outros animais e para o homem.

Quanto as técnicas moleculares utilizadas neste estudo para identificação da espécie de *Leishmania*, a análise da região ITS1, utilizando como metodologia a Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR), seguida de Polimorfismo de Fragmento de restrição (RFLP) com a enzima *Hae III*, foi considerada uma valiosa ferramenta na determinação das espécies infectantes de *Leishmania* sp. do Novo Mundo em um tempo relativamente curto, sendo, portanto, recomendado a sua utilização, até mesmo em áreas endêmicas com a presença de múltiplas espécies<sup>30</sup>. Portanto, sendo possível afirmar que todos os gatos estavam infectados pela espécie *L. infantum*.

A análise de toda a sequência de nucleotídeos dos minicírculos do kDNA do parasito por sequenciamento reforçou o resultado da PCR-RFLP e foi possível verificar que a *L. infantum* presente no gato apresentou característica molecular semelhante aos isolados de cães. Os minicírculos de kDNA são os alvos preferidos para identificação de *Leishmania* sp., pois estão presentes em alto número de cópias e contêm blocos de sequências conservados, apresentando elevada sensibilidade na detecção de diferenças genéticas presentes em protozoários do gênero *Leishmania*<sup>31</sup>.

Este é o primeiro estudo a fazer sequenciamento dos minicírculos do DNA de *Leishmania* sp. isolada de gatos e o primeiro a comparar as sequencias de nucleotídeos dos parasitos isolados de gatos com os isolados de cães. Outros estudos já relataram a realização de sequenciamento de DNA de *Leishmania* sp., porém utilizando outras regiões da sequência de nucleotídeos do parasito. Os genes RNA ribossomal 5.8S<sup>32,33</sup> e RNA ribossomal 18S<sup>34</sup>, já foram alvo de sequenciamento, porém realizado apenas com o objetivo de confirmar a infecção por *L. infantum* nos gatos.

Em conclusão, este é o primeiro estudo sobre os aspectos epidemiológicos da infecção por *L. infantum* em gatos no Nordeste brasileiro, onde encontramos elevada prevalência em Teresina, Piauí e ampla distribuição de animais infectados na cidade, indicando que a doença nos gatos pode apresentar elevada importância para saúde pública no município. Os achados da análise molecular confirmaram que os gatos domésticos de Teresina, Piauí, Brasil, portador de leishmaniose, são infectados pela espécie *L. infantum*, agente etiológico da LV nas Américas e não foi observada diferença ao comparar os isolados de cães e gatos. Os resultados deste estudo indicam ainda, a necessidade de mais atenção à LV nos gatos, no que diz respeito à realização de mais estudos para esclarecer a importância epidemiológica desses animais no ciclo de transmissão da LV e implantação de medidas de controle da doença voltada para os gatos, visto que, os mesmo podem estar participando de forma significativa na manutenção dos elevados índices da doença em Teresina, Piauí.

## APOIO FINANCEIRO

O estudo teve auxílio financeiro do Ministério da Saúde em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), através do Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS).

## REFERÊNCIAS

1. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH.. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011;27(9):403-9.
2. Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(1):105-7.
3. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2013;50(5):341-52.
4. Sousa GD, Santos E, Filho AJ. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(8):1181-2.
5. Brasil. Ministério da saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação do Piauí. Brasília, DF, 2011.
6. Gezoon, Gerência de Zoonoses. Dados de leishmaniose visceral em Teresina/PI. 2014.
7. Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoario do genero *Leishmania*. *Brasil Médico.* 1940;54:180.
8. Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;120(3):229-33.
9. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, 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. *Vet Parasitol.* 2011;178(1-2):22-8.

10. 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.
11. Mendonça IL, Batista JF, Ribeiro IM, Rocha FS, Silva SO, Melo MN. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. *Parasitol Open.* 2017;3:E1.
12. Figueiredo FB, Bonna IC, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TM, et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42:141-5.
13. Silva RC, Ramos RA, Pimentel DS, Oliveira GM, Carvalho GA, Santana MA, et al. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the state of Pernambuco. Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(1):108-9.
14. Sanguankiat S, Sato MO, Sato M, Maipanich W, Yoonuan T, Pongvongsa T, et al. First Record of Paramphistomes *Fischoederius cobboldi* and *Paramphistomum epiclitum* Detected in Bovine Rumen from a Local Market of Savannakhet Province, Lao PDR. *Korean. J. Parasitol.* 2016;54(4):543-7.
15. Otake Sato M, Sato M, Yoonuan T, Pongvongsa T, Sanguankiat S, Kounnavong S, et al. The role of domestic dogs in the transmission of zoonotic helminthes in a rural area of Mekong river basin. *Acta Parasitol.* 2017;62(2):393-400.
16. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics,* 1977;33(1):159-74.
17. Vicente Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, de Lima VM, 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. *Vet Parasitol.* 2012;187(1-2):302-6.
18. 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.
19. 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. *Exp Parasitol.* 2017;177:93-7.



20. Noé P, Domingos SL, Oshiro ET, Lima RB, Pirmez C, Pedroso TC, et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. *Ciênc Anim*. 2015;25(4):03-14.
21. Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(12):2959-63.
22. Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1240-2.
23. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:53-7.
24. Costa CH, Tapety CM, Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(4).
25. Simões-Mattos L, Mattos MR, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CM, Prata-Júnior RC, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2005;127:199–208.
26. Costa T, Rossi C, Laurenti M, Gomes AA, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, et al. Ocorrência de Leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Animal Sci*. 2010;3:213–17.
27. 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 Zoonotic Dis*. 2011;11:239–45.
28. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2007;145(3-4):357-60.
29. Silva SM, Rabelo PF, Gontijo NF, 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. *Vet Parasitol*. 2010;174(1-2):150-4.
30. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014;2014:607287.

31. Kocher A, Valière S, Bañuls AL, Murienne J. High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitol.* 2018;145(5): 585-94.
32. Dedola C, Zobba R, Alberti A. *Leishmania infantum* in cats. Unpublished. Direct submission. NCBI. GenBank. 2014;KM925006.1.
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. *Exp Parasitol.* 2017;177:93-7.
34. Maia C, Ramos C, Coimbra M, Bastos F, Martins Ã, Pinto P, et al. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasit Vectors.* 2014;7:115.

## 8 CAPÍTULO II

### **Avaliação clínica, hematológica, bioquímica e histopatológica em gatos domésticos (*Felis catus*) com leishmaniose visceral**

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas em gatos com leishmaniose visceral (LV). Sessenta animais, provenientes de Teresina, Piauí, Brasil, foram submetidos à avaliação clínica, diagnóstico sorológico e parasitológico para LV, hemograma e quantificações séricas de ureia, creatinina, proteína total, albumina, globulina, alaninoaminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST). Os 60 animais foram divididos em três grupos. Grupo infectado: 20 animais com *L. infantum*, diagnosticados por exame parasitológico. Grupo suspeito: 20 animais com alteração clínica sugestiva de LV ou com sorologia positiva para LV, porém negativos no exame parasitológico. Grupo controle: 20 animais negativos no exame sorológico e parasitológico para LV e sem nenhuma alteração na avaliação clínica. Amostra de soro dos 20 animais com LV também foi utilizada para diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina e o vírus da leucemia felina e cinco dos animais infectados foram necropsiados para realização de estudo histopatológico de baço, fígado e rim. Os principais achados clínicos e laboratoriais nos gatos com LV foram: linfadenomegalia, emagrecimento, alopecia, lesão e nódulos na pele, localizados principalmente na região da cabeça, redução significativa nas hemácias e no hematócrito, hiperplasia e presença de *Leishmania* em baço, hepatite, degeneração hepática e nefropatia inflamatórias. Conclui-se que gatos com LV apresentam alterações clínicas, hematológicas e histopatológicas significativas, compatíveis com a infecção por *L. infantum*.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, felino, hemograma, leucograma, histopatologia.

## Introdução

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela espécie *Leishmania infantum*, responsável por causar LV nas Américas e tem o cão como principal reservatório (Harhay et al., 2011; Marcondes et al., 2013). A LV acomete tanto os humanos quanto várias espécies de animais domésticos e silvestres (Harhay et al., 2011; Zanette et al., 2014). Tem sido relatada em gatos em vários países, ocorrendo principalmente em áreas endêmicas para LV canina e humana. Em Teresina, Piauí, Brasil, onde a LV é endêmica, também há relato da infecção em gatos, sendo registrados três gatos domésticos infectados por *L. infantum* de 83 animais examinados (Mendonça et al., 2017).

A LV é conhecida por ser uma doença infecciosa grave, sistêmica e pode ser fatal se não tratada (Silva, 2007). Entretanto, a infecção em gatos ainda é pouco estudada, havendo, portanto, uma carência de informação sobre a patogênese da leishmaniose nos gatos. Estes animais parecem desenvolver resposta imunológica eficiente contra a *L. infantum* e apresentam resistência natural, decorrente de fatores genéticos, que inibe o desenvolvimento dos parasitos (Costa et al., 2010). Muitos estudos têm relatado a infecção em gatos, muito deles apresentando sinais clínicos graves, porém as alterações clínicas se manifestam principalmente em animais imunodeficientes (Pennisi, 2015; Pennisi et al., 2015).

Em estudo realizado por Navarro et al. (2010), demonstram tanto alterações cutâneas (úlceras e nódulos) quanto envolvimento visceral (alterações hepáticas, esplênicas e renais), além de alterações oculares (conjuntivite, blefarite e/ou ceratite). Entretanto, quantificações hematológicas e bioquímicas em gatos com LV ainda são pouco conhecidas e ainda não há publicações analisando possível diferença entre o grupo de animais infectados e um grupo de animais sadios utilizando estes parâmetros clínicos.

Devido ao número crescente de relatos de LV em felinos e a carência de informação sobre o perfil clínico da doença nesses animais (Pennisi et al., 2015), objetivou-se avaliar os sinais clínicos e as alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas, que eventualmente podem estar presentes em gatos domésticos portadores de LV.

## Material e métodos

### *Local e declaração de ética*

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Animal (LASAN) e Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFPI, sob parecer nº 102/15 e desenvolvido seguindo diretrizes da Lei Nº 11794, 8-10-2009, que estabelece procedimentos para a utilização de animais em atividade de pesquisa científica.

### *Desenho experimental*

Foram incluídos no estudo 60 gatos domésticos (*Felis catus*) provenientes da cidade de Teresina, Piauí, Brasil. Os quais foram submetidos a avaliação clínica, exames sorológico e parasitológico para LV e quantificações hematológicas e bioquímicas. Após resultado dos exames sorológicos e parasitológicos para leishmaniose, dividiu-se os animais em três grupos. Grupo infectado: 20 animais com LV, diagnosticados pela visualização do parasito em exame parasitológico de medula óssea, linfonodo poplíteo ou pele. Grupo suspeito: 20 animais com alteração clínica sugestiva de LV ou com sorologia positiva para LV, porém negativos no exame parasitológico para LV. Grupo controle: 20 animais negativos no exame sorológico e parasitológico para LV e sem nenhuma alteração na avaliação clínica. Cinco dos animais infectados por *L. infantum* foram submetidos à necropsia para verificar possíveis alterações em órgãos, fazer aspirado de baço e fígado para pesquisa do parasito e coletar fragmentos de baço, fígado e rim para avaliação histopatológica.

### *Exame parasitológico e sorológico para diagnóstica de leishmaniose visceral*

Amostras de linfonodo poplíteo, medula óssea, baço e fígado foram submetidas à pesquisa de *Leishmania* sp. utilizando meio de cultura semeadas em tubos contendo meio de cultura bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicolle) com 1 mL de Schneider's suplementado. Esfregaço em lâmina, utilizando amostras de linfonodo poplíteo, medula óssea e raspado de pele com lesão, bem como "imprint" de baço e fígado, foram corados pelo Giemsa para pesquisar formas amastigotas do parasito. A cultura de *Leishmania* sp. e metodologia de coloração pelo Giemsa

foram realizadas seguindo descrição de Mendonça et al. (2017).

Na realização do teste ELISA utilizou-se o kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Brasil) com as seguintes alterações no protocolo descrito pelo fabricante: o soro sanguíneo foi diluído 1:400 e o conjugado específico para cães foi substituído pelo conjugado de rato anti-IgG de gato A20-120P na diluição 1:20000. Para determinação do ponto de corte, foram utilizadas amostras de soros de 10 gatos controle, obtidas do estudo de Mendonça et al. (2017), as quais foram adicionadas em todas as placas. Os 10 animais residiam em bairros de Teresina, onde a LV canina apresentava baixa prevalência e todos eram negativos na PCR de medula óssea. O ponto de corte foi calculado pela média da densidade ótica dos controles negativos mais três vezes o valor do desvio padrão da DO dos controles negativos.

#### *Quantificação hematológica e bioquímica*

Todos os animais incluídos no estudo foram submetidos a hemograma e leucograma. Para tanto realizou-se a coleta de 2 mL de sangue em tubos a vácuo com EDTA, ambos com agulhas 25 x 0,8 mm. O hemograma foi realizado em contador automático (BC-2800 Vet Mindray) com kit ABX Vetpack e contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo corado com panótico rápido.

O soro obtido através da coleta de sangue em tubo a vácuo sem anticoagulante e centrifugação do mesmo a 1600 rpm, foi utilizado para quantificação de ureia, creatinina, alaninoaminotransferase (ALT/TGP), aspartatoaminotransferase (AST/TGO), albumina e proteína total, utilizando aparelho semiautomático (Analisador Bioquímico BA 88 BIOCLIN) e kits da Labtest seguindo as recomendações descritas pelo fabricante. A concentração de globulina foi obtida pela subtração da proteína total menos a albumina.

#### *Diagnóstico histopatológico*

Para avaliação histopatológica, cinco gatos com LV, os quais os proprietários optaram pela eutanásia por estarem infectado por *Leishmania* sp. foram submetidos ao procedimento de eutanásia utilizando o seguinte procedimento: sedação com tiopental sódico 2,5% (80 mg/kg) e, após confirmação da ausência de sensibilidade e dos reflexos, os animais foram sacrificados com solução de cloreto de potássio a 20%. Ambos administrados por via endovenosa.

Durante a necropsia, realizou-se a avaliação macroscópica completa, aspirado de baço e fígado, os quais também foram semeados em meio de cultura NNN enriquecido com Schneider para pesquisa de *Leishmania* sp. e coleta de fragmentos de ambos os rins, baço e fígado, os quais foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada por, no mínimo, 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram submetidos a técnica rotineira de processamento histológico que consiste na desidratação, diafanização, embebição e inclusão do tecido em parafina, microtomia (4 µm), com posterior desparafinização, hidratação, coloração com hematoxilina e eosina, desidratação dos cortes histológicos e montagem das lâminas. As alterações histopatológicas foram classificadas segundo a intensidade (discreto, moderado e severo) e distribuição (ausente, focal, multifocal e difuso).

#### *Diagnóstico de retrovírus*

Para avaliar o impacto de retrovírus imunossupressores, os animais com leishmaniose foram submetidos à pesquisa de antígeno (p27) do vírus da leucemia felina (FeLV) e anticorpo IgG contra o vírus da imunodeficiência felina (FIV). A detecção do antígeno de FeLV e do anticorpo anti-FIV foi realizada utilizando um kit de ensaio comercial (Alere FIV Ac/FeLV Ag Test Kit, Bionote Inc. 2-9 Seogu-dong, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea 440440), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### *Análise estatística*

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados utilizando o teste de Kruskal Wallis, pós-teste de Dunns, para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os três grupos (infectado, suspeito e controle). Também realizou-se o teste de Mann Whitney para analisar possível diferença significativa no número de sinais clínicos entre animais positivos e negativos para FIV. Os testes estatísticos foram executados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e admitindo probabilidade de erro de 5%.

## Resultados

Neste estudo clínico da LV em gatos foi observado que dos 20 animais infectados por *L. infantum*, apenas dois (10%) não apresentaram nenhuma alteração clínica. As alterações mais frequentes nos animais com LV foram: linfadenomegalia (65%), alopecia (55%), lesão de pele e emagrecimento (40%) e nódulos na pele (25%) (Tabela 1). 14 animais (70%) apresentavam mais de uma alteração clínica e as lesões na pele estavam localizadas com maior frequência na região da cabeça, estando presente nas orelhas, região periocular, focinho e lábios (Tabela 1) (Figura 1).

Tabela 1: Número e percentual de sinais clínicos em gatos com leishmaniose visceral.

Características n=20	Número de sinais clínicos	Porcentagem (%)
Linfadenomegalia	13	65
Emagrecimento	8	40
Lesões de pele	13	65
Alopecia	11	55
Lesão ulcerative	8	40
Nódulos	5	25
Lesões oculares	4	20
Uveíte	3	15
Blefarite	2	10
Secreção ocular	1	5
Cegueira	1	5
Desidratação	1	5
Assintomático	2	10





Figura 1: Alterações clínicas observadas nos gatos infectados por *L. infantum*. A e B – Nódulos de consistência amolecida nas bordas das orelhas (bilateral). C – Blefarite e lesão periocular. D – Nódulo que evoluiu para lesão ulcerativa no lábio superior.

Quanto as lesões na pele, foi observado a presença de nódulos de dimensões variadas, desde milimétricos até 5 cm de diâmetro, aproximadamente (Figura 1A, 1B, 2A e 2B). Com a evolução da doença os nódulos ulceravam (Figura 2), e ao realizar esfregaço utilizando o exsudato dos nódulos foi possível observar grande quantidade de formas amastigotas *Leishmania* sp. (Figura 3).



Figura 2: Nódulos e lesões na pele de gatos infectados por *L. infantum*. A e B – Nódulos e lesões nas patas. C – Lesão na região da articulação coxofemoral. D – Lesão envolvendo o focinho, plano nasal e lábio superior.



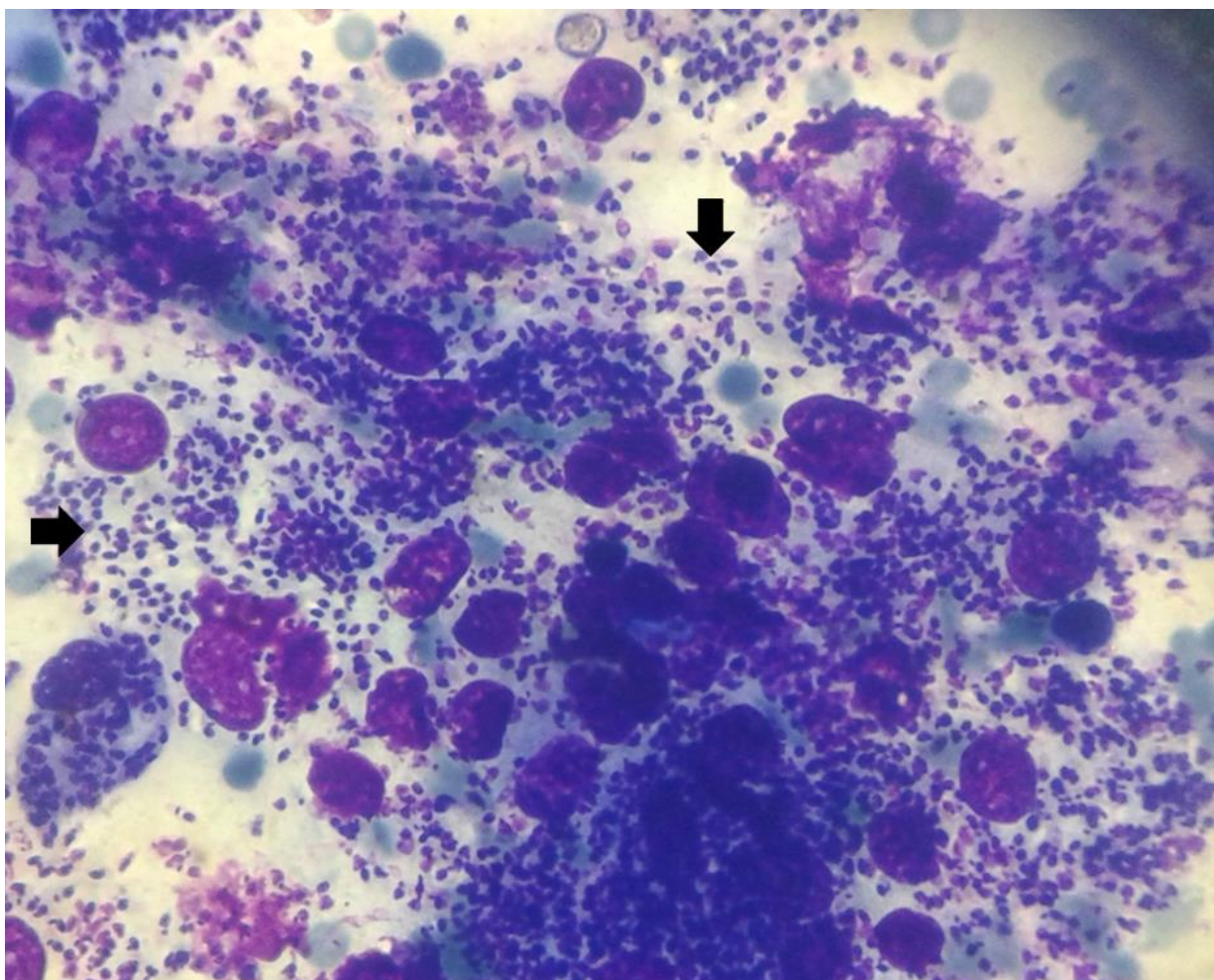


Figura 3: *Leishmania* sp. na forma amastigota (setas) em esfregaço corado com GIENSA, realizado utilizando o exsudato sanguinolento de nódulo localizado na orelha de gato infectado por *L. infantum*.

Os 20 animais com *L. infantum* também foram submetidos ao diagnóstico de retrovírus. Nenhum foi positivo para FeLV e sete (35%) foram positivos para FIV. Ao avaliar a interferência da infecção por FIV na ocorrência de sinais clínicos nos animais infectados por *L. infantum*, observou-se que não houve diferença significativa no número de sinais clínicos em animais positivos e negativos para FIV (teste de Mann Whitney,  $p=0,23$ ).

Ao analisar o resultado do hemograma e bioquímicos observou-se que os animais com LV apresentaram concentrações de hemácias e hematócrito significativamente inferior quando comparados aos valores observados nos animais pertencentes aos grupos controle e suspeito e as concentrações de creatinina do grupo infectado foram inferiores às do grupo controle (teste de Kruskal Wallis, pós-teste de Dunns,  $p<0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2: Média e desvio padrão de parâmetros hematológicos e bioquímicos em gatos com ausência de sinais clínicos e exames para leishmaniose visceral (LV) negativos (grupo controle), com alteração clínica ou sorologia positiva para LV e negativos na pesquisa de *Leishmania* sp. (grupo suspeito) e com LV (grupo infectado).

Parâmetros	Controle n=20	Suspeito n=20	Infectado n=20	Valores de Referência
Hemácia ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	5 – 10 $\alpha$
Hemoglobina (g/dL)	10,3 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	10,8 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	9,4 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	8 – 15*
Hematócrito (%)	31,5 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	32,4 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	26,6 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>	24 – 45*
MCV (fl)	45,5 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	46,0 $\pm$ 2,7 <sup>ab</sup>	48,9 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	39 – 55*
MCHC (%)	32,6 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	33,3 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	35,8 $\pm$ 6,8 <sup>a</sup>	30 – 36*
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	282,3 $\pm$ 114,9 <sup>a</sup>	386,3 $\pm$ 141,2 <sup>a</sup>	300,1 $\pm$ 198,5 <sup>a</sup>	200 – 800*
Leucócitos totais	15500 $\pm$ 8101 <sup>a</sup>	18610 $\pm$ 8052 <sup>a</sup>	15980 $\pm$ 6696 <sup>a</sup>	5.500 – 19.000*
Segmentados	8758 $\pm$ 6187 <sup>a</sup>	13080 $\pm$ 8173 <sup>a</sup>	10390 $\pm$ 5494 <sup>a</sup>	2.500 – 12.500*
Linfócitos	5297 $\pm$ 3572 <sup>a</sup>	2402 $\pm$ 1698 <sup>b</sup>	4212 $\pm$ 4037 <sup>ab</sup>	1.500 – 7.000*
Ureia (mg/dL)	54,6 $\pm$ 14,0 <sup>a</sup>	50,1 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>	50,3 $\pm$ 28,5 <sup>a</sup>	20 – 30**
Creatinina (mg/dL)	1,4 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	1,2 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	1,0 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	0,8 – 1,8**
Proteína total (g/dL)	8,3 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	8,6 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	5,4 – 7,8**
Albumina (g/dL)	2,1 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,1 – 3,3**
Globulina (g/dL)	6,0 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	6,6 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	2,6 – 5,1**
Relação A/G (g/dL)	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,45 – 1,19**
ALT (U/L)	59,2 $\pm$ 46,1 <sup>a</sup>	52,9 $\pm$ 31,0 <sup>a</sup>	50,7 $\pm$ 49,8 <sup>a</sup>	8 – 88**
AST (U/L)	33,3 $\pm$ 13,1 <sup>a</sup>	41,1 $\pm$ 28,1 <sup>a</sup>	53,0 $\pm$ 92,2 <sup>a</sup>	26 – 43**

\* (Jain, 1993); \*\* (Kaneko et al., 1997). Legenda: MCV - volume corpuscular médio; MCHC - concentração de hemoglobina corpuscular média; ALT – alanina aminotransferase e AST – aspartato aminotransferase. Letras a e b sobrepostas e distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos (teste de Kruskal Wallis, pós-teste de Dunns,  $p < 0,05$ ).

Em seis (30%) dos animais com LV os valores de eritrócitos estavam abaixo dos valores de referências descritos por Jain (1993). Em cinco 25% a anemia era do tipo normocítica normocrômica e, em um (5%), a anemia era do tipo normocítica hipocrômica.

Além da avaliação clínica, hematológica e bioquímica, também foi realizada necropsia em cinco animais infectados por *L. infantum*. A alteração macroscópica observada com maior frequência foi linfadenomegalia generalizada, estando presente nos cinco animais necropsiados. Quanto às lesões microscópicas observou-se que hiperemia estava presente com elevada frequência em baço (100%), fígado (60%) e rim (80%). No baço e no fígado, também foi

observada a presença de *Leishmania* sp., confirmando a visceralização do parasito em quatro dos cinco animais submetidos à necropsia (Tabela 3).

Tabela 3: Ocorrência de *Leishmania* sp. em baço e fígado e alterações macroscópicas observadas durante a necropsia e microscópicas observadas na histopatologia de baço, fígado e rim, em gatos infectados por *L. infantum*.

Parâmetros avaliados	Animal					Total (%)
	I	II	III	IV	V	
<b>Pesquisa de <i>Leishmania</i> sp.</b>						
Baço	-	+	+	-	+	
Fígado	-	-	-	+	+	
<b>Alterações macroscópicas</b>						
Linfadenomegalia generalizada	+	+	+	+	+	5 (100)
Mucosas hipocoradas	+	+				2 (40)
Esplenomegalia	+				+	2 (40)
Hiperplasia de polpa branca					+	1 (20)
Petéquias difusamente distribuídas em pulmão	+					1 (20)
Cianose	+					1 (20)
Pneumonia multifocal discreta					+	1 (20)
<b>Alterações microscópicas</b>						
<b>Baço</b>						
Hiperemia	+	+	+	+	+	5 (100)
Hiperplasia de polpa branca	+	+		+	+	4 (80)
Hiperplasia de polpa vermelha		+				1 (20)
<i>Leishmania</i> em macrófagos		+			+	2 (40)
<b>Fígado</b>						
Hiperemia	+			+	+	3 (60)
Hepatite linfoplasmocitária	+			+		2 (40)
Hepatite linfocítica		+				1 (20)
Degeneração hepática	+		+	+	+	4 (80)
<b>Rim</b>						
Hiperemia	+		+	+	+	4 (80)
Nefrite intersticial			+			1 (20)
Glomerulonefrite proliferativa	+				+	2 (40)
Glomerulonefrite membranoproliferativa			+			1 (20)

Legenda: + indica a ocorrência de alteração patológica no animal ou a presença de *Leishmania* sp. e - indica resultado negativo na pesquisa de *Leishmania* sp.

Ainda em relação às alterações histopatológicas, foi observado no fígado que a hepatite era de intensidade discreta e apresentava distribuição variando de focal a difusa e a degeneração hepática variou de discreta a moderada e de multifocal a difusa. Nos rins, a nefrite intersticial e glomerulonefrite proliferativa eram discreta e multifocal e a glomerulonefrite membranoproliferativa era moderada e multifocal.

## Discussão

Estudo anterior relatou a ocorrência da LV em gatos em Teresina, Piauí, Brasil (Mendonça et al., 2017). Porém pouco foi revelado sobre as alterações clínicas que ocorrem em gatos acometidos pela doença, devido principalmente ao número pequeno de animais positivo encontrado no estudo, o qual limitou as informações, subnotificando as lesões que ocorrem na LV em gatos. Quanto as manifestações clínicas observadas nos animais incluídos neste estudo, as alterações na pele apresentaram-se com frequência elevada. Alopecia, lesão na pele e nódulos na pele, apareceram com frequência de 52,6%, 36,8% e 26,3%, respectivamente. Outros estudos em diferentes regiões do Brasil, também tem relatado a elevada frequência de lesões na pele de gatos com LV (Navarro et al., 2010; Vides et al., 2011). Estes resultados indicam possível carga parasitária elevada na pele e possível fonte de infecção para o vetor.

Um fato curioso observado em dois dos 20 animais infectados é que os nódulos que apareceram na borda das orelhas apresentavam consistência flácida, continha a presença de exsudato sanguinolento e macrófagos repletos de formas amastigotas de *Leishmania* sp.. Em outros três animais os nódulos apresentavam consistência endurecida, porém, também eram hemorrágicos e a quantidade de *Leishmania* sp. era muito elevada. Com a evolução da doença os nódulos ulceravam e alguns proprietários relataram que faziam tratamento tópico nas lesões, utilizando pomada antimicrobiana e não apresentavam resultado satisfatório.

Estudos relacionados à LV em gatos tem relatado que os gatos apresentam resistência natural à infecção por *L. infantum* (Kirkpatrick et al., 1984; Costa et al., 2010). Além disso, relatam ser comum a co-infecção *Leishmania* com os retrovírus FIV e FeLV, por serem vírus que interferem na resposta imunológica dos gatos tornando-os mais susceptíveis a outras infecções (Pennisi, 2002; Simões-Mattos et al., 2005; Costa et al., 2010). Neste estudo, a análise para verificar a interferência da infecção por retrovírus no número de sinais clínicos mostrou que a infecção por FIV não favoreceu de forma significativa o aumento no número de sinais clínicos e nenhum animal era positivo para FeLV.

Este é o primeiro estudo a fazer uma ampla avaliação das possíveis alterações hematológicas e bioquímicas, comparando grupo de animais infectados com grupo composto por animais clinicamente saudáveis e, foi possível observar que é frequente a ocorrência de anemia em gatos com LV. Além disso, outros nove animais não foram considerados anêmicos segundo valores de referência descrito por Jain (1993), porém apresentaram valores bem abaixo da média observada no grupo de animais saudáveis. Assim como o observado nos gatos deste estudo, vários outros trabalhos descreveram a ocorrência de anemia em cães com LV, sendo em ambos a do tipo normocítica normocrômica a mais comum (Aguilar et al., 2007; Ikeda-Garcia et al., 2008; Medeiros et al., 2008; Mendonça et al., 2015).

Estudo realizado por Nicolato et al. (2013), documentou que em cães com LV grave a anemia está associada a um distúrbio no compartimento da medula óssea eritróide, com contagem de hemácias significativamente reduzida. Também, é possível que a anemia esteja relacionada ao aumento da hemólise no baço e fígado, associado a uma resposta inflamatória à infecção por *L. infantum* (Saeed et al., 1998). Além disso, o ferro plasmático reduzido na presença de estoques de ferro bastante aumentados sugeriu que a hiperplasia reticuloendotelial era acompanhada por retenção anormal de ferro por macrófagos, típicos da anemia de distúrbios crônicos, podendo limitar a resposta eritropoiética à anemia na LV crônica (Pippard et al., 1986).

Quanto às quantificações bioquímicas, apesar dos resultados não apontar diferença significativa ao comparar animais infectados com os não infectados, indicando não haver lesões em órgãos viscerais, os resultados da análise histopatológica revelou não somente a presença de lesões em baço, fígado e rim como também a ocorrência do parasito em baço e fígado, confirmando a visceralização da *L. infantum* nos gatos. A não detecção do parasito nos rins sugere que as lesões renais da LV em gatos podem ser desenvolvidas de forma semelhante ao que ocorre nos cães, causadas, não pela presença do parasito e sim pela deposição de imunocomplexos, que induzem a formação de infiltrados inflamatórios, como glomerulonefrites proliferativa e membranoproliferativa, que foram observadas nos gatos deste estudo e são observadas em cães portadores de LV (Nieto et al., 1992; Alves et al., 2013).

## **Conclusões**

As alterações clínicas são muito comuns na LV em gatos, sobretudo linfadenomegalia, emagrecimento e lesões na pele localizada principalmente na região da cabeça. A observação destas manifestações clínicas, juntamente com as alterações observada no hemograma, contribui

de forma significativa no diagnóstico da doença nesses animais e é perfeitamente viável para o esclarecimento da evolução da doença.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, a semelhança estatística entre animais com LV e animais clinicamente sadios e negativos em exame sorológico e parasitológico para LV, pode-se concluir que a avaliação da bioquímica sérica, de forma isolada, não fornece informações suficientes para os clínicos suspeitarem de LV em gatos.

Na avaliação de órgãos como baço, fígado e rim, confirmou-se a visceralização da *L. infantum* nos gatos e a análise histopatológica desses órgãos revelou a elevada frequência de lesões sugestivas de LV.

### **Apoio financeiro**

O estudo teve auxílio financeiro do Ministério da Saúde em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), através do Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS).

### **Referências**

1. Aguiar PHP, Santos SO, Pinheiro AA, Bittencourt DVV, Costa RLG, Julião FS, et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Rev Bras Saúde Prod Anim* 2007; 8(4): 283-294.
2. Alves GB, Silva Ldos S, Batista JF, Campos AP, Prianti Md, Costa FA. The seroconversion and evaluation of renal alterations in dogs infected by *Leishmania (infantum) chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013; 55(2): 105-112.
3. Costa T, Rossi C, Laurenti M, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, et al. Ocorrência de Leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Animal Sci* 2010; 3: 213–217.
4. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitol* 2011; 27: 403-409.
5. Ikeda-Garcia FA, Ciarlini PC, Lopes RS, Marques FJ, Bomfim SRM, Lima VMF, et al. Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Braz J Vet Res An Sci* 2008; 45: 68-74.



6. Jain NC. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
7. Kaneko JJ; Harvey JW, Bruss ML. (Eds.) Clinical biochemistry of domestic animals. 5 th ed. New York: Academic Press, 1997.
8. Kirkpatrick CE, Farrell JP, Goldschmidt AH. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: Experimental Infections in domestic cats. *Exp Parasitol* 1984; 58(2): 125-131.
9. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Braz J Vet Res An Sci* 2013; 50(5): 341-352.
10. Medeiros CMO, Melo AGC, Lima AKF, Silva ING, Oliveira LC, Silva MC. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no Município de Fortaleza, Ceará. *Ci Anim* 2008; 18(1): 43-50.
11. Mendonça IL, Alves MMM, Batista JF, Rocha FSB, Silva EMC. Alterações bioquímicas e hematológicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (infantum) chagasi*. *Clín Vet* 2015; (116).
12. Mendonça IL, Batista JF, Ribeiro IMM, Rocha FSB, Silva SO, Melo MN. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. *Parasitol Open* 2017; 3: E1. doi:10.1017/pao.2017.1.
13. Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. *J Comp Pathol* 2010; 143(4): 297-302. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.03.003. Epub 2010 May 13.
14. Nicolato Rde C, de Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Carvalho Md, et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One* 2013; 8(12): e82947. doi: 10.1371/journal.pone.0082947. eCollection 2013.
15. Nieto CG1, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 1992; 45(1-2): 33-47.
16. Pennisi MG. A high prevalence of feline leishmaniosis in southern Italy. Intervet Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniosis Forum; 2002 Feb 6–9; Seville, Spain. Boxmeer: Intervet, 2002, pp 39–48.
17. Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2015; 8(302). doi: 10.1186/s13071-015-0909-z.
18. Pennisi MG. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Vet Parasitol* 2015; 208(1-2): 35-47. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.023. Epub 2014 Dec 23.

19. Pippard MJ, Moir D, Weatherall DJ, Lenicker HM. Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1986; 80(3): 317-323.
20. Saeed AM, Khalil EA, Elhassan AM, Hashim FA, Elhassan AM, Fandrey J, et al. Serum erythropoietin concentration in anaemia of visceral leishmaniasis (kala-azar) before and during antimonial therapy. *Br J Haematol* 1998; 100(4): 720-724.
21. Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev Trop – Cien Agrarias e Biologicas* 2007; 1(1): 20-31.
22. Simões-Mattos L, Mattos MR, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CM, Prata-Júnior RC, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol* 2005; 127(3-4): 199-208.
23. Vides JP, Schwaradt TF, Sobrinho LS, 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. *Vet Parasitol* 2011; 178(1-2): 22-28. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.042. Epub 2011 Jan 11.
24. Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47(1): 105-107. doi: 10.1590/0037-8682-1723-2013. Epub 2014 Feb 1.

## 9 CAPÍTULO III

### **Infecção de *L. longipalpis* em gatos com LV**

### **Infecção de *Lutzomyia longipalpis* em gatos infectado por *Leishmania infantum***

#### **Resumo**

**INTRODUÇÃO** A leishmaniose visceral (LV) em gatos tem sido relatada no Brasil e em vários outros países. As manifestações clínicas mais frequentemente observadas são alterações cutâneas, sugerindo elevada carga parasitária na pele e possibilidade de infecção do vetor.

**OBJETIVOS** Verificar a infectividade de flebotomíneos ao realizar xenodiagnóstico em gatos infectados por *L. infantum*.

**MÉTODOS** Neste estudo foram utilizados 12 gatos com LV provenientes da cidade de Teresina, Piauí, Brasil, os quais foram diagnosticados pela visualização direta do parasito, em meio de cultura ou esfregaço em lâmina, utilizando amostra de medula óssea, linfonodo poplíteo e pele. Os animais também foram submetidos à avaliação clínica, diagnóstico de FIV e FeLV e xenodiagnóstico. No xenodiagnóstico utilizou-se 14 a 83, média de 45 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* por animal. Os insetos criados em laboratório, portanto, livre de infecção por *Leishmania* sp. foram submetidos ao repasto sanguíneo durante 60 minutos nos gatos com LV. No quinto e sexto dia após realização do repasto sanguíneo realizou-se a dissecação dos flebotomíneos para pesquisa de formas promastigotas do parasito no sistema digestivo.

**RESULTADOS** No xenodiagnóstico oito gatos (67%) foram capazes de infectar o vetor. A frequência de insetos infectados por animal variou de 21,9% a 94,4%, média 31,0%. Outro destaque dos resultados deste estudo foi a frequência de insetos que se alimentaram nos gatos, 86,7% a 100%, média 95,2% insetos alimentados por animal. As *L. infantum* estavam localizadas no estômago, porção anterior do sistema digestivo e até na probóscide. Além disso, observou-se grandes quantidade do parasito por inseto, não sendo possível quantificar utilizando apenas microscópio.

**CONCLUSÕES** Com os resultados do xenodiagnóstico foi possível concluir que gatos, além de atuarem como fonte de alimentação para o vetor, são capazes de infectar *L. longipalpis* e provavelmente são responsáveis pela transmissão da infecção para outros animais e para o homem.

**Palavras-chave:** xenodiagnóstico – gato – leishmaniose – infecção – flebotomíneos.

### **APOIO FINANCEIRO**

Esta pesquisa teve auxílio financeiro do Ministério da Saúde em parceria com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), através do Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde – PPSUS-2016. A fonte de financiamento não esteve envolvida no desenho, coleta, análise e interpretação de dados do estudo, na redação do relatório ou na decisão de submeter o artigo para publicação.

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, sendo a espécie *L. infantum* a mais comum detectada infectando cães e gatos no Velho Mundo e na América Central e do Sul.<sup>(1)</sup> Nos gatos a doença é cada vez mais relatada, ocorrendo principalmente em áreas endêmicas para LV canina e humana. No Brasil, há relatos na cidade de Cotia-SP,<sup>(2)</sup> Araçatuba-SP,<sup>(3)</sup> Andradina-SP,<sup>(4)</sup> Belo Horizonte-MG,<sup>(5)</sup> e Teresina-PI.<sup>(6)</sup>

O conhecimento sobre a LV em gatos ainda não está bem consolidado e não se pode descartar que existem diferenças importantes no desenvolvimento da doença nesses animais em comparação ao que ocorre em cães. Além disso, o conhecimento sobre transmissão, imunopatogênese, desenvolvimento, manejo, prevenção e terapia da doença em gatos ainda está em estágio inicial.<sup>(1)</sup> Pennisi et al.<sup>(1)</sup> ainda relatam que os casos publicados de leishmaniose felina são provavelmente apenas uma parte mínima de todos os casos diagnosticados e os que são diagnosticados podem ser apenas parte de todos os casos existentes.

Não há informações específicas sobre a infecção dos gatos. No entanto, a grande quantidade de informações sobre a transmissão vetorial da *L. infantum*, não há dúvida que a infecção desses animais seja através da picada de flebotomíneos infectados. Isto significa que, em áreas onde ocorre a transmissão da LV para cães, gatos são susceptíveis de estarem em contato com o parasito, podendo ser infectado,<sup>(7)</sup> entretanto a transmissão da infecção dos gatos para outros animais e para o homem ainda precisa ser demonstrada.

Quanto a transmissão da infecção por *L. infantum* do gato para o vetor, existe apenas dois relatos no mundo, em regiões distintas a que realizamos este estudo. O primeiro relato ocorreu em Messina na Itália, onde relataram a infecção de *Phlebotomus perniciosus* ao realizar xenodiagnóstico em um gato infectado por *L. infantum*.<sup>(8)</sup> O segundo em Belo Horizonte, Minas

Gerais, Brasil os quais demonstraram a infecção de *Lutzomyia longipalpis* ao realizar xenodiagnóstico também em um único gato infectado por *L. infantum*.<sup>(5)</sup>

Apesar dos relatos mostrando a possibilidade de infecção do vetor, existe uma carência enorme de informações sobre a frequência de insetos que se alimentam quando estão em contato com os gatos e as características dos animais que determinam a infecção do vetor. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a infectividade de flebotomíneos ao alimentarem-se em gatos domésticos infectados por *L. infantum* e verificar quais alterações clínicas e características dos gatos interferem na infecção do vetor.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Local do estudo e ética* - O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Sanidade Animal - LASAN da Universidade Federal do Piauí - UFPI, Teresina, estado do Piauí, Brasil e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal do Piauí sob protocolo número 102/2015.

*Desenho experimental* - Neste estudo foram incluídos 12 gatos, proveniente de residências escolhidas aleatoriamente localizadas na cidade de Teresina, Piauí. Os animais apresentavam idade variando entre 1 ano e 2 meses a 14 anos, machos e fêmeas e com raças variadas e todos eram positivos para LV, diagnosticados pela visualização do parasito em medula óssea, linfonodo poplíteo ou pele.

Para a identificação da espécie do parasito e a confirmação da infecção por *L. infantum* nos 12 gatos infectados realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers específicos para amplificar 300 a 350pb do gene ITS1 do DNA do parasito, seguida de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) utilizando a enzima *HaeIII*.<sup>(6)</sup> Após confirmação

da infecção por *L. infantum*, todos os animais foram submetidos ao xenodiagnóstico para verificar possível infecção do vetor.

Amostras de soro sanguíneo dos 12 animais foram utilizadas para diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) utilizando o teste rápido Alere FIV Ac/FeLV Ag (Bionote Inc. 2-9 Seogu-dong, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea 440440) e realizado seguindo recomendações descrita pelo fabricante.

*Avaliação da infecção do vetor* - Para realização do xenodiagnóstico, os gatos foram sedados com associação de 15 mg/kg de cloridrato de cetamina, 0,3 mg/kg de diazepam e 0,03 mg/kg de acepromazina, ambos administrados via intramuscular. As fêmeas de *L. longipalpis* utilizadas no estudo foram geradas na colônia de flebotomíneos do LASAN. Utilizou-se no estudo 14 a 83, insetos em média de 45 fêmeas de primeira geração, com cinco dias de nascidas e desprovidas de qualquer fonte alimentar nas últimas oito horas que antecederam o teste, as quais foram colocadas em caixas de plástico escurecidas com aproximadamente cinco centímetros de diâmetro e seis centímetros de altura, com um lado aberto e coberto por tecido de organza e colocado sobre a pele externa da orelha do animal (Figura 1) por um período de 60 minutos, sendo esta a única fonte alimentar de sangue para esses insetos.

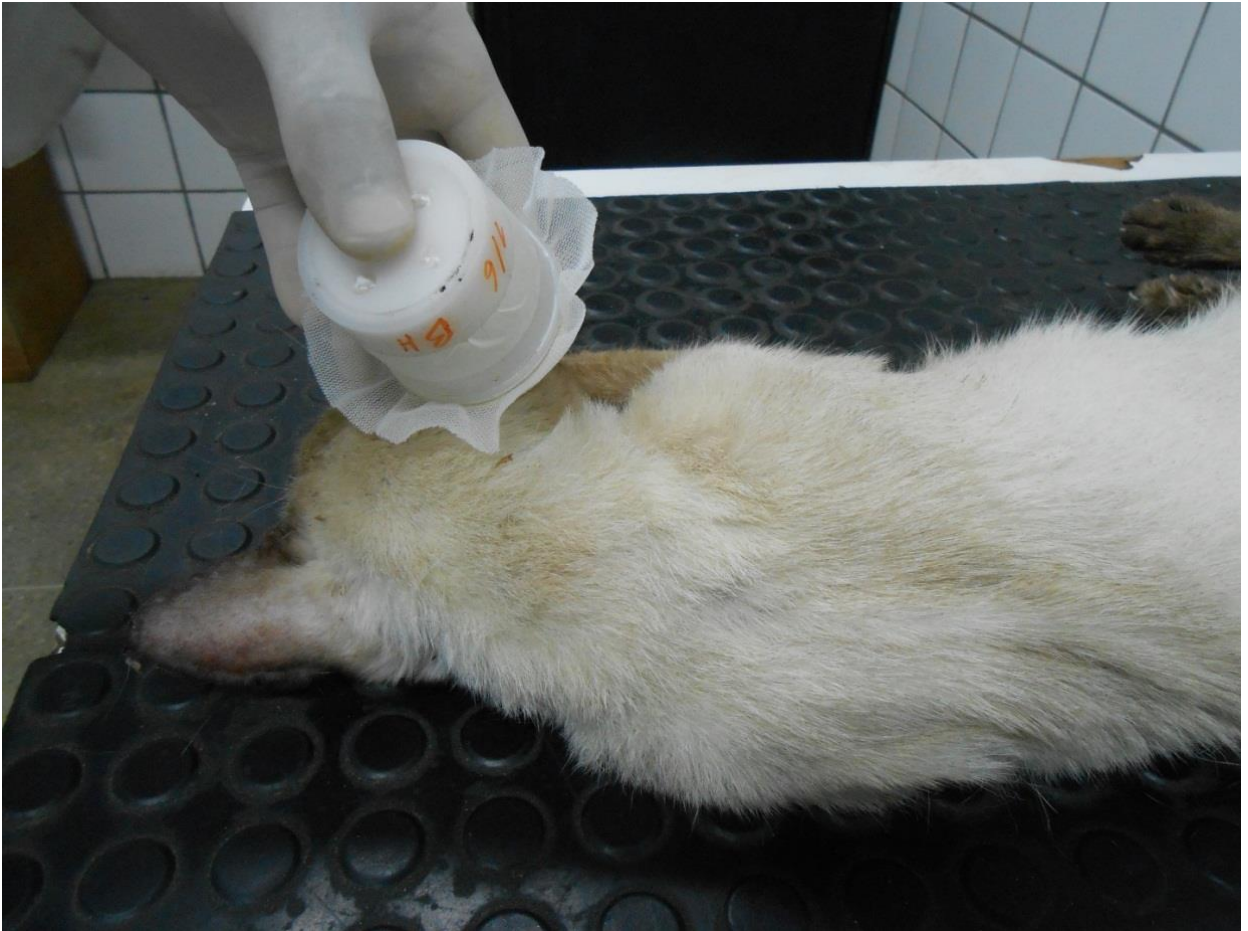


Figura 1: Xenodiagnóstico realizado na parte posterior da orelha de um gato infectado por *L. infantum*.

Posteriormente, os insetos foram acondicionados na incubadora B.O.D a 26°C com um algodão embebido em solução açucarada a 50%. No 5° e 6° dia após o repasto sanguíneo, os insetos foram dissecados em lâmina estéril para a pesquisa de promastigotas em objetiva de 40x.<sup>(9)</sup> A pesquisa do parasito foi realizada no sistema digestivo do vetor (Figura 2A) e na probóscide e a espécie *L. longipalpis* era confirmada através da observação das características morfológicas da espermateca (Figura 2B).



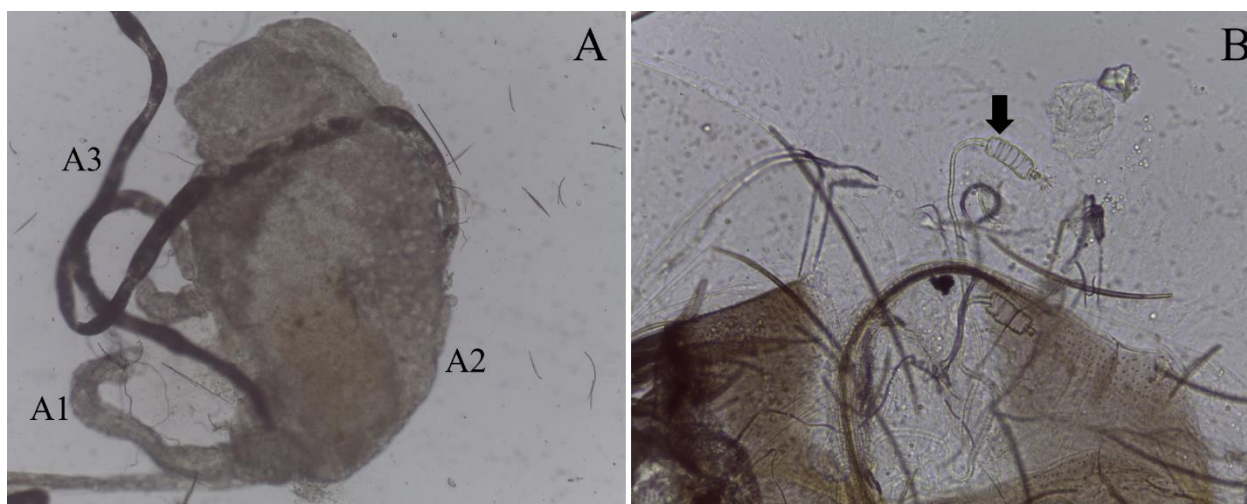


Figura 2: Segmentos anatômicos de inseto vetor submetido ao xenodiagnóstico em gato infectado por *L. infantum*. Legenda: A – Sistema digestivo. A1 – Intestino anterior. A2 – Estômago e A3 – Intestino posterior. B – Espermateca apresentando características morfológicas compatíveis com a espécie *L. longipalpis* (seta).

*Análise dos dados* - A possível relação entre o número de sinais clínicos e a frequência de insetos infectados no xenodiagnóstico foi avaliada utilizando teste Correlação de Pearson, o qual foi realizado através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e admitindo probabilidade de erro de 5%.

## RESULTADOS

Dos 12 gatos com LV oito (67%) foram reativos no teste ELISA. Os animais tinham idade variando de 1 ano e dois meses a 14 anos (média 5,8), oito eram do sexo masculino, 11 eram SRD e 1 da raça siamês. Todos apresentavam sinais clínicos sugestivos de LV. As alterações mais frequentes foram linfadenomegalia, alopecia e lesão de pele (Figura 3).

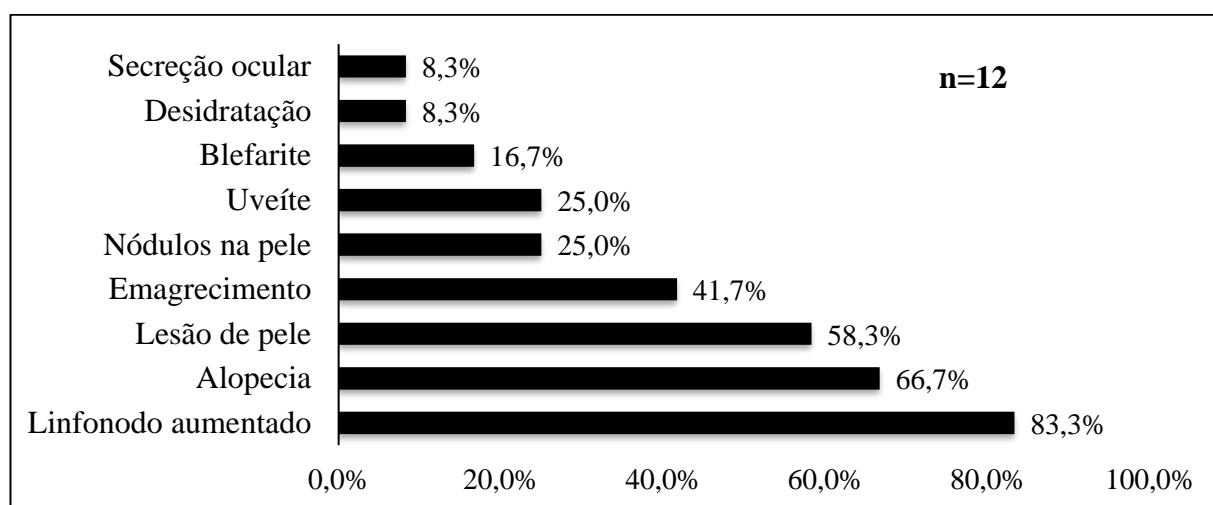


Figura 3: Porcentagem de sinais clínicos observados nos 12 gatos com leishmaniose visceral.

Os 12 animais foram submetidos ao xenodiagnóstico e oito (67%) infectaram o vetor. A frequência de insetos alimentados por animal variou de 87% a 100% (média 95,2%) e de insetos infectados variou de 0% a 94%, média 35,3% (Tabela 1). Nos 12 gatos foram utilizados, no total, 542 insetos, dos quais 118 se infectaram (21,7%). Na maioria dos insetos infectados as promastigotas encontravam-se no intestino anterior e em quatro dos insetos infectados os parasitos já estavam na probóscide (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado do xenodiagnóstico realizado em gatos infectados por *Leishmania infantum*.

	Média	Mínimo	Máximo
Insetos utilizados (n)	45,2	14	83
Insetos alimentados (n)	43	14	72
Insetos alimentados (%)	95,2	87	100
Insetos infectados (n)	9,8	0	31
Insetos infectados (%)	35,3	0	94
Insetos com <i>Leishmania</i> no estômago (n)	9,8	0	31
Insetos com <i>Leishmania</i> no intestino anterior (n)	4,3	0	20
Insetos com <i>Leishmania</i> na probócita (n)	1,1	1	6

Na investigação das características dos 12 gatos que foram submetidos ao xenodiagnóstico observou-se que todos os animais com *L. infantum* em medula óssea e pele infectaram o vetor (Tabela 2). Portanto, este grupo de gatos, constitui um risco de transmissão da doença para outros animais susceptíveis e para o homem.

Tabela 2: Características clínicas e infecciosas relacionadas ao resultado do xenodiagnóstico em gatos infectados por *Leishmania infantum*.

Características	Xenodiagnóstico			
	Examinados (n=12)	Positivos (n=8)	Frequência (%)	
Idade	Jovem (< 3 anos)	3	3	100
	Adulto (3 a 8 anos)	5	3	60,0
	Senil (> 8 anos)	3	1	33,3
Sexo	Macho	8	6	75,0
	Fêmea	4	2	50,0
Raça	SRD	11	7	63,6
	Siamês	1	1	100
Número de sinais clínicos	≤ 3	5	2	40,0
	> 3	7	6	85,7
<i>Leishmania</i> em medula	Sim	8	8	100
	Não	4	0	0
<i>Leishmania</i> em linfonodo	Sim	12	8	66,7
	Não	0	0	0
<i>Leishmania</i> em pele	Sim	8	8	100
	Não	4	0	0
FIV	Positivo	3	2	66,7
	Negativo	9	6	66,7

Legenda: FIV – vírus da imunodeficiência felina.

Quanto aos sinais clínicos relacionados ao xenodiagnóstico, 85,7% dos animais que apresentaram mais de três alterações clínicas infectaram o vetor (Tabela 2). Também foi observado que houve correlação significativa positiva entre o número de sinais clínicos e a frequência de insetos infectados (Correlação de Pearson,  $p=0,03$ ). Numericamente a infecção por FIV não apresentou nenhuma influência na infecção do vetor (Tabela 2). Todos os 12 gatos eram negativos para FeLV.

Também foi observado que nos insetos havia alta carga de *L. infantum*. O rompimento do sistema digestivo dos flebotomíneos provocava a liberação de grande quantidade do parasito, não sendo possível quantificar ao microscópio óptico comum (Figura 4).

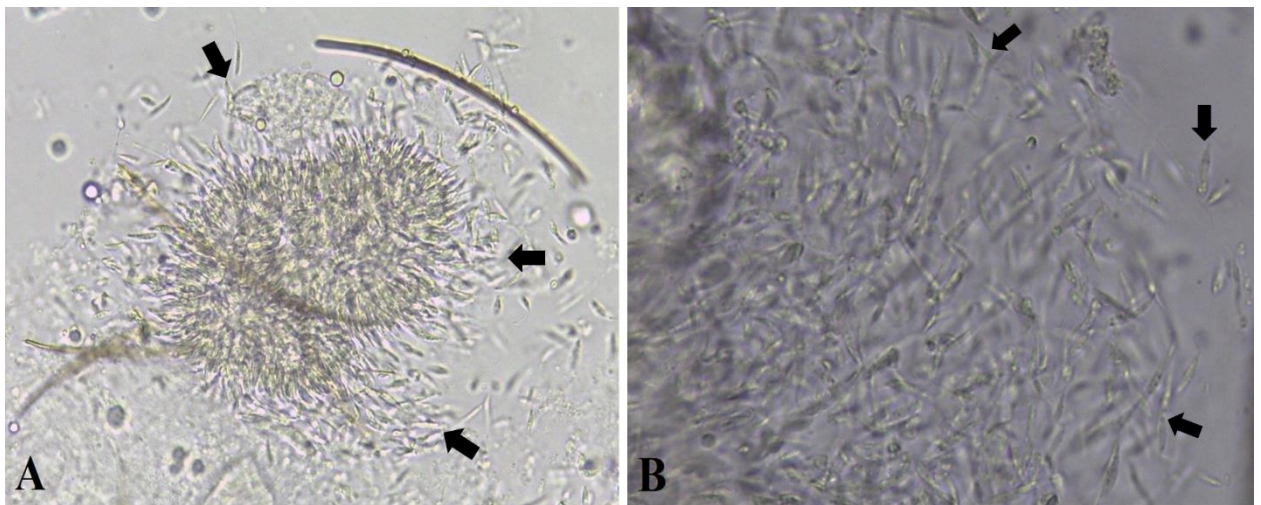


Figura 4: *Leishmania* na forma promastigota no sistema digestivo do inseto *L. longipalpis*, seis dias após a realização de xenodiagnóstico em gato infectado por *L. infantum*. A – *Leishmania* sendo liberadas devido ao rompimento do intestino anterior do inseto vetor. B – *Leishmania* extravasando do estômago do vetor após rompimento do estômago.

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar que 67% dos gatos infectados por *L. infantum* foram capazes de infectar o vetor. Até a realização deste estudo, apenas dois outros trabalhos haviam demonstrado a possibilidade de infecção de flebotomíneos por *L. infantum* em outras partes do mundo, em Messina na Itália,<sup>(8)</sup> e em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil,<sup>(5)</sup> porém em ambos foi utilizado apenas um animal.

Devido ao número de animais utilizado neste estudo, também foi possível analisar as características dos gatos que foram capazes de infectar o vetor. Um dos achados é que todos os animais em que se encontrou a *L. infantum* na pele infectaram o vetor e os negativos na pele também foram negativos no xenodiagnóstico. Além disso, foi observado que 85,7% dos animais que apresentavam mais de três sinais clínicos e 40% dos que tinham menos de três sinais clínicos, sugestivos de LV, foram capazes de infectar o vetor. Também foi observado elevado percentual de insetos infectados por animal (21,7%). Estes achados são muito relevantes, pois revela que os gatos apresentam elementos suficientes que os capacitam a participar ativamente na transmissão da LV em área endêmica.

A pesquisa de *L. infantum* na pele e a observação das alterações clínicas dos animais deste estudo demonstraram serem alternativas eficazes na detecção de gatos capazes de infectar o vetor. Porém, estudos utilizando cães e humanos, como reservatórios, têm apresentado alternativas para detectar hospedeiros infectantes para flebotomíneos,<sup>(9,10)</sup> que podem ser testadas nos gatos para verificar o desempenho nestes animais. Uma dessas alternativas é a detecção de parasitemia por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Este método, quando utilizado em humanos, demonstrou que os pacientes que foram detectados o parasito no sangue apresentaram alta probabilidade de infectar o vetor.<sup>(10)</sup> Os testes sorológicos também podem ser alvo deste estudo. Em cães de área de elevada transmissão a pesquisa de anticorpo anti-

*Leishmania* sp. não foi eficiente em detectar animais capazes de infectar o vetor.<sup>(9)</sup> Porém, nos gatos, o resultado pode ser diferente.

Dois estudos com xenodiagnóstico em cães, também realizados em Teresina, obtiveram como achados, percentuais de insetos infectados por animal de apenas 1,0%,<sup>(11)</sup> e 5,8%,<sup>(9)</sup> ambos utilizando metodologia semelhante à realizada neste estudo. Comparando os achados do xenodiagnóstico nos cães com os encontrados em gatos deste estudo (21,7%), fica evidente que os gatos têm uma capacidade bem superior aos cães para infectar o vetor. Nos estudos realizados em Teresina também foi relatado o percentual de cães que foram capazes de infectar o vetor, 29%,<sup>(11)</sup> e 46,5%,<sup>(9)</sup> também, inferior ao observado nos gatos deste estudo (67%). Resultados que confirmam que os gatos apresentam grande importância na manutenção dos elevados índices de LV na cidade de Teresina.

A identificação de gatos infectados por *Leishmania* sp., sobretudo por *L. infantum*, e a possibilidade de infecção de flebótomos por este parasito ao realizar xenodiagnóstico em gatos naturalmente infectados em Teresina-PI, área de elevada transmissão de LV, alerta as autoridades a buscar novas medidas de controle da doença, visto que apenas a eutanásia de cães sororreagentes (principal medida adotada pelo ministério da saúde no controle da LV canina e humana) pode não ser suficiente para o controle da doença em áreas endêmicas, devendo, portanto levar em consideração a importância dos gatos como reservatórios.

Em conclusão, com este estudo, demonstrou-se que os gatos domésticos infectados por *L. infantum* são capazes de infectar o vetor biológico *L. longipalpis* e provavelmente fazem parte do ciclo de transmissão da LV, tornando a doença um grave problema de saúde pública, visto que, essa doença é uma zoonose e a espécie do parasito encontrada nos gatos é a mesma responsável por causar LV cães e humanos.

## REFERÊNCIAS

1. Pennisi MG, Persichetti MF. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Vet Parasitol.* 2018; 251: 131-7.
2. Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, 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. *Vet Parasitol.* 2004; 120(3): 229-33.
3. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, 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. *Vet Parasitol.* 2011; 178(1-2): 22-8.
4. 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.
5. Silva SM, Rabelo PF, Gontijo NF, 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. *Vet Parasitol.* 2010; 174(1-2): 150-4.
6. Mendonça IL, Batista JF, Ribeiro IMM, Rocha FSB, Silva SO, Melo MN. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. *Parasitol Open.* 2017; 3: E1.
7. Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2015; 8(302): 1-18.

8. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007; 145(3-4): 357-60.
9. Mendonça IL, Batista JF, Werneck GL, Soares MRA, Costa DL, Costa CHN. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(4): 483-8.
10. Silva JC, Zacarias DA, Silva VC, Rolão N, Costa DL, Costa CH. Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(8): 517-22.
11. Soares MR, de Mendonça IL, do Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CH. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop.* 2011; 117(1): 6-9.



## 10 CAPÍTULO IV

### Transmission of *Leishmania infantum* from a cat to a dog

#### Abstract

Infections with *Leishmania infantum* in felines has been reported in several countries, including Brazil, where there are reports on the states of São Paulo, Mato Grosso do Sul and Piauí. However, the transmission of visceral leishmaniasis (VL) from cats to another host had not been proven yet. Therefore, the aim of this study was to verify the possibility of *L. infantum* transmission from cat to the dog through the vector *Lutzomyia longipalpis*. Two animals were used. One cat naturally infected by *L. infantum* and one dog not infected by *Leishmania*. In order to verify the possibility of VL transmission from the feline to the dog, xenodiagnosis was carried out in the VL-positive cat, using 55 females of *L. longipalpis*. Five days later, 40 insects were dissected in order to verify if they became infected. Still at the fifth and the sixth day after fed on the cat, the remaining 15 females were placed to feed on the healthy dog. The potential infection and disease progression in the dog were verified through clinical, serological, parasitological examinations and PCR, three, six and twelve months after infection. *Leishmania* genetic characteristics were analyzed through sequencing methods. All 55 *L. longipalpis* females fed on the cat's ear skin and became visibly engorged. In 11 out of the 40 insects dissected (27.5%) *Leishmania* promastigotes were detected in its stomach. *Leishmania* infection in the dog was confirmed immediately at the first evaluation, samples providing serological positive result and *Leishmania* parasitological detection at popliteal lymph node. After sequencing was observed that the parasite isolated from the cat was *L. infantum* and the nucleotide sequences showed 100% of similarity with other *L. infantum* DNA sequences isolated from dogs. By means of this study, it was possible to confirm *L. infantum* transmission from domestic feline to dog through its biological vector *L. longipalpis*.

Keywords: Transmission – leishmaniasis – cat – dog.

## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is an infection caused by a protozoa of the genus *Leishmania*, which affects both humans and several domestic and wild animal species (Harhay et al. 2011; Zanette et al. 2014), including domestic cats (*Felis catus*). It is a systemic disease caused by *Leishmania* species which are part of the Donovan complex, being *Leishmania infantum* responsible for causing VL in the Americas and has the dog as its main reservoir (Harhay et al. 2011; Marcondes et al. 2013).

VL presents wide distribution in Brazil and it is reported in all regions of the country (Sousa et al. 2009). In Teresina, capital of Piauí, Brazil, this disease is endemic both in dogs and humans and there is also a report of infection in felines, it is registered registered three domestic cats infected with *L. infantum* of 83 animals examined (Mendonça et al. 2017a).

The first case of natural infection in feline caused by *Leishmania* sp. in Brazil was registered in 1939, in a cat with ulcers in the nose and ear, in the state of Pará, however, the causative species was not identified (Mello 1940). Other studies carried out in Brazil reported infections in domestic cats by *L. infantum* in the cities of Cotia, Araçatuba, Andradina and Pirassununga, state of São Paulo, Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul and Teresina, capital of Piauí (Savani et al. 2004; Vides et al. 2011; Coelho et al. 2011; Benassi et al. 2017; Metzendorf et al. 2017; Mendonça et al. 2017a).

Regarding to felines participation at the VL biological cycle, previous studies reported potential infections of *Plebotomus perniciosus* and *L. longipalpis* by *L. infantum* while performing xenodiagnosis on infected feline (Maroli et al. 2007; Silva et al. 2010). However, any previous study has evaluated the possibility of VL transmission from felines to another susceptible host. Therefore, this study was carried out aiming to verify the possibility of VL transmission from a feline infected by *L. infantum* to a dog free of *L. infantum* infection, through *L. longipalpis* laboratory insects.

## **Material and methods**

### **Place of study**

The study was developed at the Animal Health Laboratory (LASAN) of the Federal University of Piauí (UFPI), Teresina, State of Piauí, Brazil and in partnership with the Natan Portella Institute of Tropical Diseases (Leishmaniasis Laboratory) in Teresina also with the Department of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan.

### **Experimental design**

Two animals were used in this study. One domestic cat (*Felis catus*) naturally infected by *L. infantum* and one domestic dog (*Canis familiaris*) not infected by *Leishmania*.

In order to verify VL transmission possibility from the feline to the dog, xenodiagnosis was performed on the VL-bearing cat. On the fifth and sixth day after xenodiagnosis on the feline, the same insects were placed to feed on the healthy dog. The possible infection and disease progress in the dog were verified through clinical, serological and parasitological examinations for VL diagnosis.

### **Feline characteristics**

The Siamese feline, eight years old and carrier of VL, was donated by the owner to participate in the study. The clinical examination revealed generalized lymphadenomegaly, skin lesion, nodules of softened consistency at the edges of the ears, alopecia in the ears and uveitis (Fig. 1).

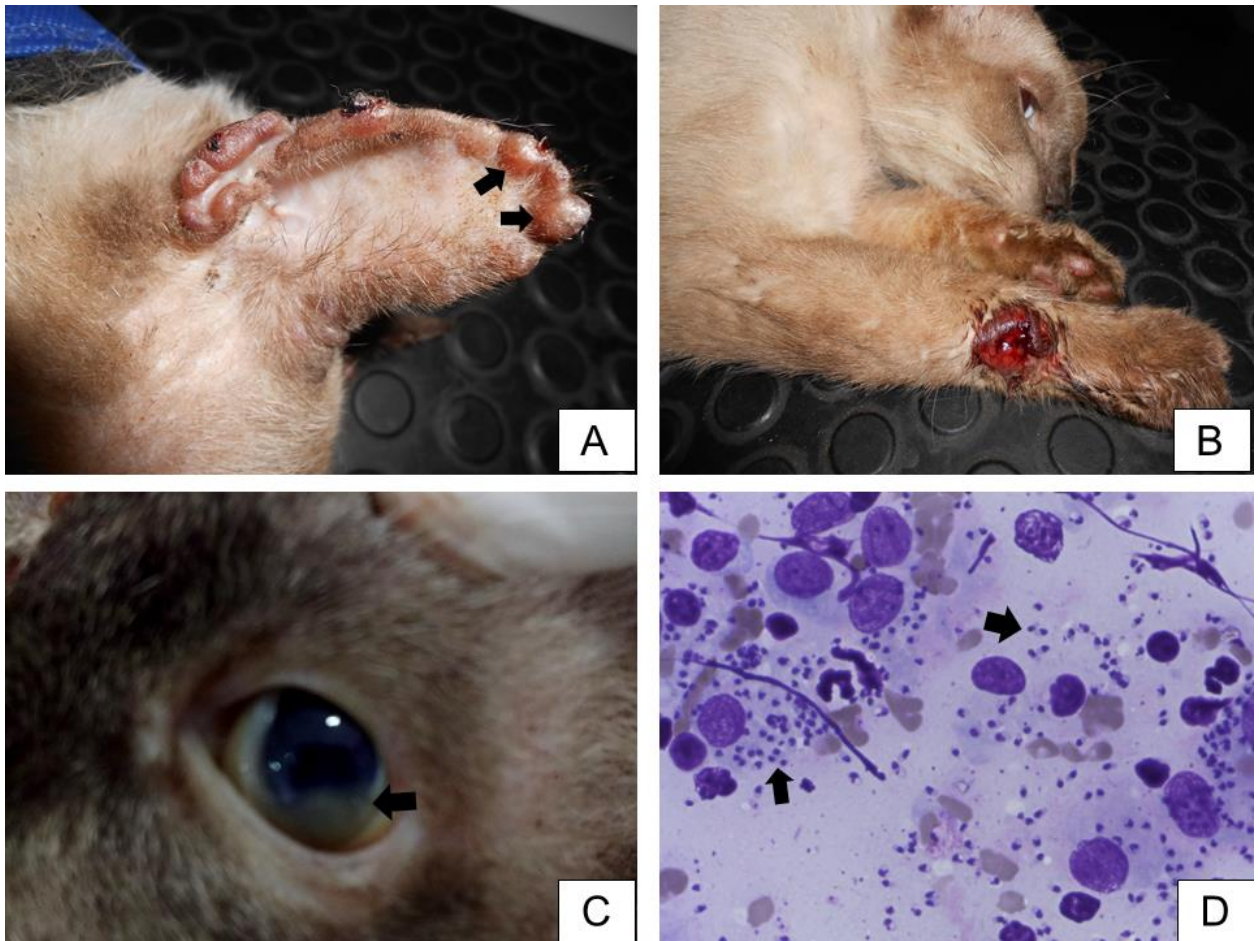


Figure 1: Domestic cat with visceral leishmaniasis. A: Nodules of softened consistency at the edge of the ear. B: Lesion on right anterior limb. C: Uveitis. D: *Leishmania* Amastigotes in smear of ear nodules scraping stained by Giemsa.

After parasitological examination for VL, *Leishmania* was detected in bone marrow, popliteal lymph node and skin samples (Fig. 1). The animal was also positive on the serological examination (ELISA) for anti-*Leishmania* antibodies and also positive for feline immunodeficiency virus (FIV), *Anaplasma* sp. and *Malassesia* sp.

In serum biochemical concentrations it was observed that the feline presented high total protein, increased globulin, low albumin concentration and low albumin / globulin ratio. On the hemogram only thrombocytopenia was observed.

## **Canine characteristics**

The female dog was born at the UFPI animal experimentation kennel, without any clinical alterations suggestive of VL. The mother of the bitch used in this study was also negative for serological tests (TR DPP<sup>®</sup> and ELISA), direct search for the parasite in bone marrow through the parasitological methods of *Leishmania* culture and smear also in the PCR for bone marrow sample.

The dog subjected to the experimental infection was located at a netting protected kennel from birth until the end of the experiment. In the kennel, the boxes where the animals stayed were fully protected against insects by the netting. There was a protection with a tiny net that allows the air flow, however, making impossible the access of any insect to the kennel. In addition, fumigations with pest control substances were done to prevent tick emergence and permanency of any other insects. The animal and the environment were monitored daily and no ectoparasite was detected during the experiment.

Six months after birth, the dog was submitted for blood collection for the TR DPP<sup>®</sup> and ELISA tests and for bone marrow aspiration for parasitological exams (smear and *Leishmania* culture) and PCR, for VL diagnosis, whom was negative in all exams and did not present any clinical alterations suggestive of VL.

Serological and parasitological examinations of the dog and the puppy were followed by a procedure described by Mendonça et al. (2017b) and PCR as described below.

## **Polymerase chain reaction (PCR)**

Bone marrow DNA from the dog was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the protocol described by the manufacturer.

Ribosomal gene Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) was amplified using primers LITSR (5-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3) and L5.8S (5-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3). The PCR was performed using 12,5µL of “GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix” (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2,5µL of each primer and 2,5µL of genomic DNA, for a final volume of 25µL. Veriti<sup>™</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>), was used with the following temperature and time conditions: initial denaturation of 95 ° C for 2 min, 32 cycles of 95 ° C for 20s, 53 ° C for 1min, 72 ° C for 1min, and final extension of 72 ° C for 6 min.

The PCR product of 314bp was analyzed in a vertical electrophoresis system, 100V in 1X tris / boric acid / EDTA buffer in 5% acrylamide / bis-acrylamide 39: 1 gels stained with silver nitrate.

### **Vector infection evaluation**

To verify infectivity of the vector, xenodiagnosis was performed on the *L. infantum* infected feline. Therefore, the animal was sedated using a combination of 15 mg / kg of ketamine hydrochloride, 0.3 mg/kg diazepam e 0.03 mg / kg acepromazine (0.2%) and 15 mg / kg ride, both administered intramuscularly and using a 10 ml syringe with 25 x 0.8 mm needle. The females of *L. longipalpis* obtained from the laboratory sandfly colony at LASAN.

Fifty-five first-generation females, five days old born and deprived of any food source in the last eight hours prior to xenodiagnosis, were placed at dark plastic boxes approximately five centimeters diameter and six centimeters high, with one side open and covered by organza tissue and placed on the animal's outer ear skin for a period of 60 minutes. This was the only blood meal of these insects.

Subsequently, those insects were placed at a BOD incubator with a cotton soaked with 50% sugar solution. On the 5th day after blood meal, 40 were dissected on a sterile slide for promastigote survey on 40x objective (Mendonça et al., 2017c).

### **Evaluation of transmission for the Dog**

The 15 *L. longipalpis* females that remained not dissected were subjected to blood meal sessions on the outside of the dog's ear for 60 minutes, on the fifth and the sixth day after feeding on the feline.

At the 3rd, 6th and 12th months after the experimental infection, the animal was submitted to clinical evaluation to verify possible development of lesions suggestive of VL. In the same periods, serological tests (TR DPP<sup>®</sup> and ELISA) and parasitological tests (smear and *Leishmania* culture) were also carried out to diagnose VL, according to the methodologies described by Mendonça et al. (2017b). During the last evaluation, bone marrow PCR was also performed, according to the methodology already described above.

After the tests results the animal underwent euthanasia, following guidelines of the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). 50mg / kg sodium thiopental

was administered followed by a dose 1mL / kg potassium chloride (20%), both intravenously. Subsequently, necropsy was performed to verify possible organ changes, also for spleen and liver aspiration, whose samples were placed in culture medium to search *Leishmania*, as described by Mendonça et al. (2017b).

### ***Leishmania* identification by sequencing**

In DNA amplification, for the complete mini-circle sequencing, the following primer pairs were used: Lchag1 144F (TAAACGGGGCTAGGGCTTTG), Lchag1 314R (CATTACCCCGCCACCGAATA), Lchag6 7F (TGTAATAATAGGGCCGGGTGG), Lchag6 202R (CCCACGCATACCCTAAAGCA), Lchag11370F (GAGGCCGATGGGAATTGGAT), Lchag11 628R (CCATCCAACACGTCCCAACA), in the following combinations: Lchag1 144F x Lchag1 314R, Lchag6 7F x Lchag6 202R, Lchag11 270F x Lchag11 628R and Lchag11 270F x Lchag6 202R.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed using KOD Plus NEO ® Master Mix kit (Toyobo, Japan), following manufacturer's specifications. The reaction final volume was 50 microliters and PCR conditions were: 98 ° C for 2 min, 30 cycles of (94 ° C for 30 sec, 68 ° C for 30 sec) and 72 ° C for 7 min. Amplified fragments were purified using the Fast Gene Gel / PCR extraction kit (Nippon Genetics) for amplified DNA purification, according to manufacturer's specifications. The purified product was sequenced in a ABI3730XL sequencer machine (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) at the Department of Tropical Medicine and Parasitology at Dokkyo Medical University, as described by Sanguankiat et al. (2016) and Otake Sato et al. (2017).

Automatically generated base sequences were analyzed using the ChromasPro program version 2.1.6 and submitted to similarity search with the nucleotide sequences available in GenBank using the BLASTn tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## Results

### Evaluation of the vector infection

The xenodiagnosis performed in the feline, it was observed that all 55 *L. longipalpis* females fed and were visibly engorged.

Of the 40 females dissected 11 (27.5%) became infected during the blood feeding in the feline. In all infected insects, *Leishmania* promastigotes were detected at the metacyclic form in its stomach (Fig. 2). In one out of 11, besides the presence of the parasite in the stomach, metacyclic promastigotes were also found at its anterior intestine.

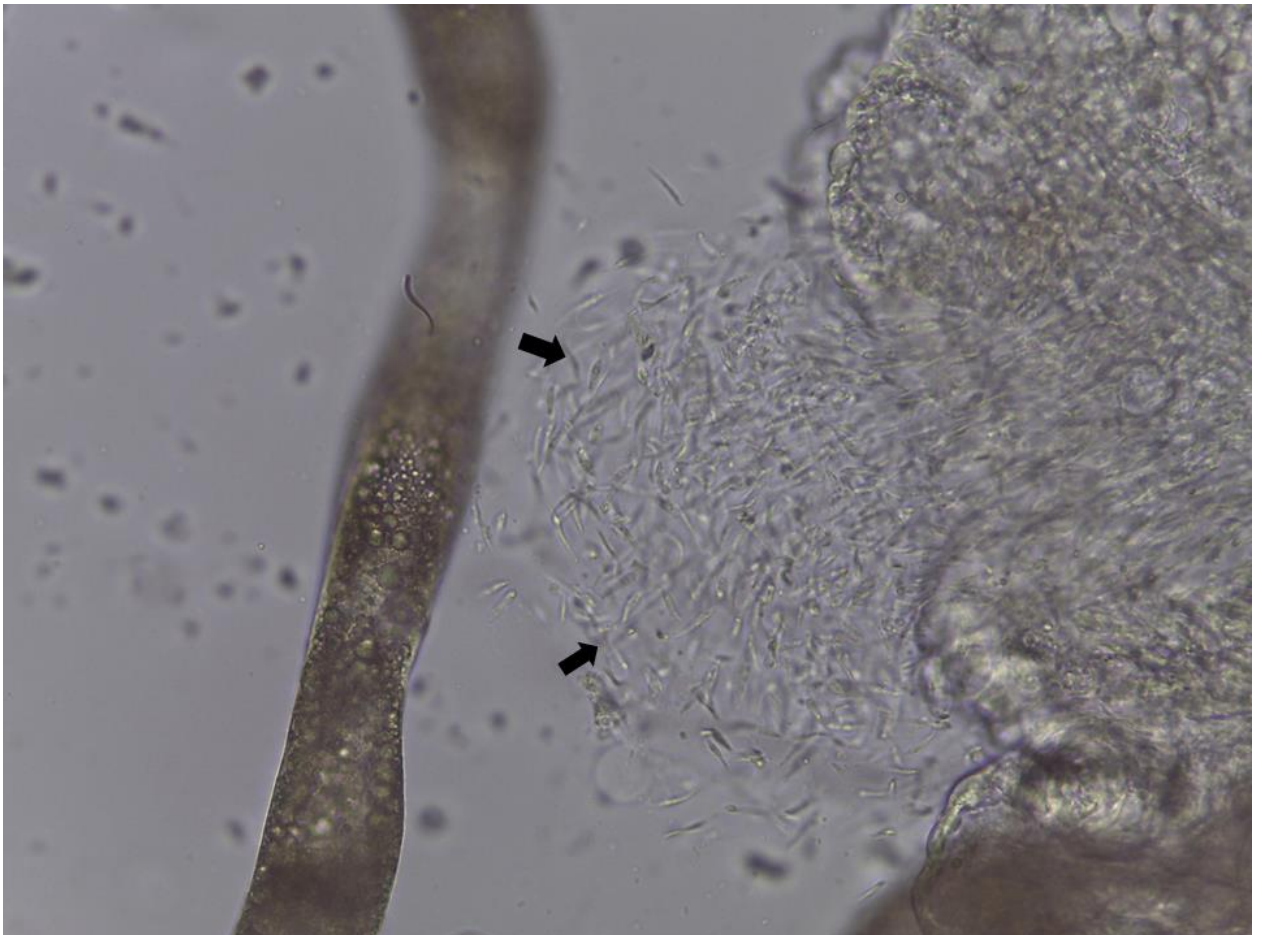


Figure 2: Thousands of *Leishmania* in promastigote form coming out of the vector *L. longipalpis* stomach, which had fed on the cat infected by *L. infantum*.



### Evaluation of *L. infantum* transmission to the dog.

During the dog's evaluation performed three months after the experimental infection, an increase in popliteal lymph nodes was observed, serological tests (TR DPP<sup>®</sup> and ELISA) were reactive and *Leishmania* culture using popliteal lymph node sample was positive. *Leishmania* sp. was not detected in bone marrow during the first post-infection evaluation.

Six months post-infection, besides enlarged popliteal lymph nodes, alopecia was also observed, with major intensity in periocular and abdominal regions (Fig. 3A). It remained positive serological tests (TR DPP<sup>®</sup> and ELISA) also in popliteal lymph node culture, but still negative in direct search of the parasite in bone marrow.

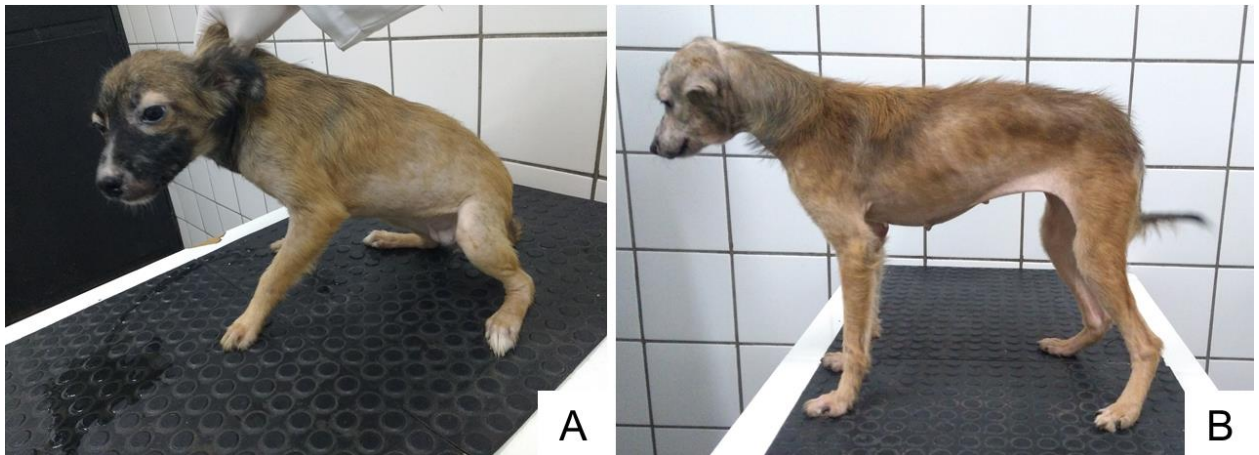


Figure 3: Clinical characteristics of the dog submitted to experimental infection by *L. infantum*, through the insect vector infected by the feline with VL. A: three months after infection. B: 12 months after infection.

Twelve months after experimental infection the animal was again evaluated. In this last evaluation the animal had enlarged lymph nodes, lesions on the face and ear, generalized alopecia and weight loss (Fig. 3B). Serological tests (TR DPP<sup>®</sup> and ELISA) and *Leishmania* culture using popliteal lymph node sample were positive. However, PCR and *Leishmania* culture using bone marrow sample were negative and the parasite was not detected in skin smear. At necropsy, only splenomegaly was detected, but *Leishmania* cultures using spleen and liver aspirates were negative.

### ***Leishmania* identification by sequencing**

All three nucleotides sequences generated through the complete *Leishmania* kinetoplast microcircles sequencing isolated from bone marrow, popliteal lymph nodes and feline ear nodules, showed 100% similarity to its sequences and also to JX156624.1 and JX156617.1 sequences isolated from *L. chagasi* of dogs and registered GenBank. In addition, when performing a search for nucleotide sequences compatible with feline *Leishmania* sequence through BLASTn, all of the sequences in the list were compatible with some *Leishmania* responsible for causing VL in dogs or humans.

### **Discussion**

VL control in Brazil is based on the use of insecticides and mainly on the detection and euthanasia of infected dogs (Brazil 2014). However, in a systematic review of these disease control strategies in Latin America, it was noticed that there was no significant reduction in the number of cases by eliminating dogs with positive diagnosis for VL (Romero and Boelaert, 2010). Other authors also suggest that the dog sacrifice as the primary measure of VL control is not effective in reducing the incidence of human or canine cases in urban areas over time (Dietze et al. 1997; Ashford et al. 1998; Costa 2008; Nunes et al. 2008; Oliveira et al. 2008). Therefore, indicating the participation of other reservoirs of this parasite in the urban environment.

Besides dogs and others possible reservoirs (rodents, opossums, foxes), infections in domestic cats has been demonstrated (Benassi et al. 2017, Akhtardanesh et al. 2017, Otranto et al. 2017). These animals need special attention due to its proximity to humans and the increase of their population in recent years (Dabritz and Conrad 2010). In addition, the results of this study demonstrate that felines appear to be an excellent source of food for sand flies, since all insects used in this study were visibly engorged after xenodiagnostic procedure in the feline.

Also noteworthy were the presence of *Leishmania* in the cat's ear skin, the high frequency of infected insects (27.5%) and the high promastigotes number already in the metacyclic form inside the insects stomach. In a study with dogs, it was demonstrated that the frequency of infected insects when fed on infected dogs was lower than that observed in insects fed on infected felines, even in dogs that showed clinical signs of the disease (Borja et al. 2016; Mendonça et al. 2017c). These findings are indicative of significant feline participation in *L. infantum* biological cycle.

In addition to aforementioned findings, the main finding of this study was the confirmation of infection transmission from the infected feline to the dog through the biological vector (*L. longipapis*). With this findings, it is not only evident the possibility of vector infection but also the transmission to another host (dog) and possibly to other species including humans. When evaluating the nucleotide sequence produced by *Leishmania* sequencing isolated from the feline in this study, 100% similarity was observed with the sequences JX156624.1 and JX156617.1 produced from *L. chagasi* from dogs and 99% with the sequences AJ275334.1 and AJ275328.1 from *L. infantum* from human infection. This similarity of parasites genetic characteristics is a further evidence of infection transmission possibility to humans.

Regarding to the parasites non-detection in bone marrow, skin, spleen and liver, it can be answered by a possible efficient immune response developed by the dog, which may have prevented parasite rapid multiplication and dissemination to these organs. In view of this fact, it is evident the need for new studies to better understanding the behavior of *L. infantum* in dogs, which present different profiles of immune response when infected with parasite from felines. In addition, new studies are also required to verify the infection prevalence in felines at local and national level, in order to analyze the genetic characteristics of feline *L. infantum*, as well as to prove the transmission of feline infection to other hosts in the natural environment.

To conclude, with this study it was possible to demonstrate that *L. longipalpes* feed on felines, become infected with *L. infantum* while feeding on infected domestic cat and transmit *L. infantum* from the feline to the dog. Thus, it was confirmed the participation of domestic cat at the VL epidemiology in Teresina, state of Piauí, having this study as the first to report the transmission of *L. infantum* from felines to another host, through the sandfly vector.

**Funding** This research was supported by the Ministry of Health in partnership with the Research Support Foundation of the State of Piauí (FAPEPI), through the Research Program for the Unified Health System (PPSUS). The funding source was not involved in the design, collection, analysis and interpretation of study data, in writing the report or in decision to submit the article for publication.

**Ethics statements** The study meets the precepts of the Law No 11.794, october 8th, 2008. Decree No. 6.899, of July 2009 and of the norms issued by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Piauí (UFPI), under accession number 102/2015.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Akhtardanesh B, Sharifi I, Mohammadi A, Mostafavi M, Hakimmipour M, Pourafshar NG, (2017) Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: Serological and molecular study. *J Vector Borne Dis* 54(1):96-102
- Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS (2017) Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol* 177:93-97
- Borja LS, Sousa OMF, Solcà MDS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, Laranjeira DF, Barrouin-Melo SM, Fraga DBM, Veras PST (2016) Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol* 229:110-117
- Brasil, Ministério da Saúde (ed) (2014) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1th ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, pp 120
- Mendonça IL, Batista JF, Ribeiro IMM, Rocha FSB, Silva SO, Melo MN (2017) *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. *Parasitol Open* 3:e1
- Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Cruz MDSPE, Alonso DP, Ribolla PEM, Costa DL, Costa CHN (2017) The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 59:e39
- Mendonça IL, Batista JF, Werneck GL, Soares MRA, Costa DL, Costa CHN (2017) Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(4):483-488
- Metzdorf IP, Lima Junior MSC, Matos MFC, Souza Filho AF, Tsujisaki RAS, Franco KG, Shapiro JT, Borges FA (2017) Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 166:121-125

- Otake Sato M, Sato M, Yoonuan T, Pongvongsa T, Sanguankiat S, Kounnavong S, Maipanich W, Chigusa Y, Moji K, Waikagul J (2017) The role of domestic dogs in the transmission of zoonotic helminthes in a rural area of Mekong river basin. *Acta Parasitol* 62(2):393-400
- Otranto D, Napoli E, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Greco G, Lorusso E, Gulotta L, Falsone L, Basano FS, Pennisi MG, Deuster K, Capelli G, Dantas-Torres F, Brianti E (2017) Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet Parasitol* 236:144–151
- Romero GA, Boelaert M (2010) Control of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 4(1):e584
- Sanguankiat S, Sato MO, Sato M, Maipanich W, Yoonuan T, Pongvongsa T, Boupha B, Chigusa Y, Moji K, Waikagul J (2016) First Record of Paramphistomes *Fischoederius cobboldi* and *Paramphistomum epiclitum* Detected in Bovine Rumen from a Local Market of Savannakhet Province, Lao PDR. *Korean. J Parasitol* 54(4):543-547

## 11 CONCLUSÕES GERAIS

Este é o primeiro estudo sobre os aspectos epidemiológicos e molecular da infecção por *L. infantum* em gatos no Nordeste brasileiro, onde encontramos elevada prevalência da infecção nesses animais de Teresina, Piauí. Além disso, foi demonstrado a ampla distribuição de gatos infectados na cidade.

O estudo molecular confirmou que os gatos domésticos de Teresina, Piauí, Brasil, portador de leishmaniose, estavam infectados pela espécie *L. infantum*, agente etiológico da LV nas Américas e apontaram não haver diferença ao comparar os isolados de cães.

Na avaliação clínica concluiu-se que as alterações clínicas nos gatos com LV ocorrem com elevada frequência, sobretudo linfadenomegalia, emagrecimento e alterações na pele localizada principalmente na região da cabeça. A observação destas manifestações clínicas, juntamente com as alterações observada no hemograma, contribui de forma significativa na detecção da doença nesses animais e é perfeitamente viável para o esclarecimento da evolução da doença e elaboração de um prognóstico.

Ao avaliar a interferência da infecção por FIV na ocorrência de sinais clínicos nos animais infectados por *L. infantum*, observou-se que não houve diferença significativa no número de sinais clínicos em animais positivos e negativos para FIV.

Quanto à localização das *Leishmania* nos gatos infectados observou-se que na pele dos animais tinham elevada quantidade do parasito e todos os gatos positivos na pesquisa de *Leishmania* na pele infectaram o vetor.

No estudo histopatológico, a visceralização da *L. infantum* nos gatos foi confirmada, bem como ocorrência de lesões viscerais, em fígado, baço e rim, sugestivas de LV.

Também demonstramos, com este estudo, que os gatos domésticos infectados por *L. infantum* são capazes de infectar o vetor biológico *L. longipalpis* e foi confirmada a transmissão da LV do gato para o cão, incluindo o gato doméstico como um dos reservatórios urbanos e provavelmente um dos principais responsáveis pelos elevados índices de transmissão da doença em Teresina-PI, tornando essa enfermidade um grave problema de saúde pública para o município.

## **12 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados deste estudo demonstram que os gatos participam do ciclo de transmissão da LV. A participação significativa desses animais na manutenção dos elevados índices da doença em Teresina é reforçada ao analisar os métodos de controle da LV adotados na cidade, sendo a detecção e eliminação de cães soropositivos a principal medida de controle utilizada. Porém, apesar dos esforços empregados na eliminação de grande quantidade de cães, a incidência da doença em Teresina permanece elevada, indicando a necessidade de desenvolvimento de medidas de controle da LV voltada para os gatos.

A LV nos gatos representa elevado impacto para saúde pública devido à estreita relação desses animais com o homem. Ao analisar a cidade de Teresina e o comportamento dos gatos, apontamos mais alguns detalhes que indicam a necessidade de atenção a esses animais, do ponto de vista de reduzir a transmissão de doenças para o homem. Em Teresina existe uma grande quantidade de gatos errantes, que não dispõem de um tutor para identificar possíveis doenças e tratá-los. Além disso, os gatos são independentes e é difícil mantê-los preso. Eles geralmente circulam um território bem amplo e, quando portando alguma zoonose, o número de pessoas expostas é muito elevado.

Recomenda-se, após analisar os resultados deste estudo, a implantação urgente de medidas voltadas para os gatos, que visam reduzir o poder de disseminação da LV por esses animais, como: conscientizar os profissionais e a população sobre a importância dos gatos na transmissão da LV, ampliar os estudos com o objetivo de desenvolver métodos de diagnóstico simples e eficientes para facilitar na detecção de animais infectados, incentivar a realização de pesquisas voltadas para desenvolvimento de vacinas para prevenir infecção dos gatos por *L. infantum* e orientar a população sobre a importância da guarda responsável, acompanhamento veterinário aos animais e cuidados ao meio ambiente. Ações que podem reduzir a prevalência da LV nos gatos e conseqüentemente reduzir a incidência da doença na população humana e canina.

### **13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS**

AYLLON, T. et al. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, p.143–50, 2012

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, n.5, e35671, 2012

ALVES, G.B.B. **Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães recém-infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, 2011.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v.64, p.1-109, 2007.

BARNES, J.C.; STANLEY, O.; CRAIG, T.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.3, p.416-418, 1993.

BENASSI, J.C. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v.177, p.93-97, 2017.

BONFANTE-GARRIDO, R. et al. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, n.1, p.53, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007.



BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação do Piauí**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2017**, SINAN/SVS/MS, 2017.

BRESCIANI, K.D.S. et al. Ocorrência de *Leishmania* spp. em gatos do município de Araçatuba, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.127-129, 2010.

CHATZISa, M.K. et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.217–225, 2014.

CHATZISb, M.K.b et al. 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. **Experimental Parasitology**, v.147, p.54–59, 2014.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

COELHO, W.M.D. et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, V.19, p.256-258, 2010.

COELHO, W.M.D. et al. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.281–282, 2011.

COSTA, F.A.L. The Dog as a Risk Factor in Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Review. **Advances in Infectious Diseases**, v. 2, p.37-47, 2012.

COSTA, T.A.C. et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.47, n.3, p.213–217, 2010.

DA SILVA, A.V. et al. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.105, p.92-94, 2008.

DUARTE, I.R.M. et al. Comportamento Biológico de *Leishmania (L.) Amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.39, p.33-40, 2010.

FIGUEIREDO, F.B. et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.141-145, 2009.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GRAMICCIA, M. et al. *Leishmania infantum* characterization from three cases of feline leishmaniasis in Sicily (Italy). **Abstract Book of Worldleish3**, p.146, 2005.

GREVOT, A. et al. Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v.12, p.271-275, 2005.

HARHAY, M.O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, p.403-409, 2011.

HATAM, G.R. et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, p.313-316, 2010.

IKEDA-GARCIA, F.A. e MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista de Clínica Veterinária**, n.71, p.34-42, 2007.

KIRKPATRICK, C.E., FARRELL, J.P., GOLDSCHMIDT, A.H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: Experimental Infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v.58, p.125-131, 1984.

KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v.51, n.2, p.527-538, 2014.

LONGONI, S.S. et al. Detection of different *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases**, v.35, n.5, p.469-476, 2012.

LUIS, R.R.; MAGNANINI, M.M.F. O tamanho da amostra em investigações epidemiológicas. In: MEDRONHA, R.A. et al. **Epidemiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006, p. 295-307.

MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.336–340, 2010.

MAIA, C., NUNES, M., CAMPINO, L. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v.4, p.555-559, 2008.

MAIA, C. et al. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v.7, n.115, p.1-8, 2014.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.50, n.5, p.341-352, 2013

MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.357–360, 2007.

MELLO, G.B. Verificação da infecção natural do gato (*Felix Domesticus*) por um protozoario do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v.54, p.180, 1940.

- MENDES, R.S. et al. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.79-84, 2014.
- MENDONÇA, I.L. et al. *Leishmania infantum* in domestic cats from the municipality of Teresina, state of Piauí, Brazil. **Parasitol Open**, v.3, E1, 2017.
- MILLÁN, J. et al. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, p.352–357, 2011.
- NAVARRO, J.A. et al. Histopathological Lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, p.297-302, 2010.
- NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 12.ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- NOÉ, P. et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. **Ciência Animal**, v.25, n.4, p.3-14, 2015.
- OLIVEIRA, F.M.L. **Ações de controle da leishmaniose visceral em Teresina/PI**. 2014. 57 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.
- OPAS-OMS. Organização Pan-Americana de Saúde e Organização Mundial de Saúde. **Leishmaniose: informe epidemiológico das Américas**. Informe de leishmanioses, n.6, 2018.
- OZON, C. et al. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.273–277, 1998.
- PASSOS, V.M.A. et al. Natural Infection of a Domestic Cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p.19-20, 1996.

PENNISI, M.G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.8, n.302, p.1-18, 2015.

PERILLO, L. et al. ***Leishmania infantum* PCR positive lymph node aspirates: cytologic patterns in cats**. In: Proceedings of the International SCIVAC Congress “Canine leishmaniasis and other vector-borne diseases: our current state of knowledge”. Pisa: Società Culturale Italiana Veterinari per Animali da Compagnia, p.144–145, 2013.

POLI, A. et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.181–191, 2002.

RIBOLLA, P.E. et al. *Leishmania infantum* Genetic Diversity and *Lutzomyia longipalpis* Mitochondrial Haplotypes in Brazil. **BioMed Research International**, v.2016, p.1-11, ID.9249217, 2016.

RICHTER, M.; SCHAARSCHMIDT-KIENER, D.; KRUDEWIG, C. Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.156, p.289–294, 2014.

RIVAS, A.K. et al. Clinical and diagnostic aspects of feline cutaneous leishmaniosis in Venezuela. **Parasites & Vectors**, v.11, n.141, p.1-14, 2018.

RODRIGUES, A.C.E. **Características epidemiológicas e distribuição espacial da enzootia canina de Leishmaniose Visceral na cidade de Teresina –Piauí, no período de 2003 a 2006**. Dissertação (Mestrado), Teresina: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 101f., 2008.

ROUGERON, V. et al. First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.325–328, 2011.

SALÓ, F. et al. Dermatitis granulomatosa de la membrana nictitante causada por *Leishmania* spp em un gato doméstico. **Clinica Veterinária e Pesquisa Animal**, v.27, p.173-177, 2007.

SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ARRANCHES, P. Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.2, p.193-198, 2000.

SAVANI, E.S.M.M. 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**, v.120, p.229–233, 2004.

SCHUBACH, T.M. 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 Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.165-167, 2004.

SERGENT, E.D. et al. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.5, p.93-98, 1912.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p.20-31, 2007.

SILVA, R.C.N. 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**, v.47, p.108-109, 2014.

SILVA, S.M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.150–154, 2010.

SILVEIRA-NETO, L. et al. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. **Veterinary Parasitology**, v.177, n.3-4, p. 374-377, 2011.

SIMÕES-MATTOS, L. et al. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p.79-87, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p.676-680, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.3-4, p.315-319, 2007.

SOUSA, G.D.; SANTOS, E.; FILHO, A.J.D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.8, p.1181-1182, 2009.

SOUZA, A.I. et al. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.41–45, 2005.

SOUZA, A.I. et al. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the Municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.15, p.359-365, 2009.

SOUZA, C.L.N., LUZ, Z.P., RABELLO, A. et al. Análise da informação sobre a leishmaniose visceral disponível em portais brasileiros da rede mundial de computadores – Internet. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.352-357, 2008.

TABAR, M.D. et al. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). **Veterinary Parasitology**, v.151, n.332–336, 2008.

TRAINOR, K.E. et al. Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. **Veterinary Pathology**, v.47, n.6, p.1076-1081, 2010.

VERÇOSA, B. L. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v.4, p.45, 2008.

VICENTE SOBRINHO, L.S. 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**, v.187, n.1-2, p.302-306, 2012.

VIDES, J.P. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.22–28, 2011.



## 14 ANEXOS

## 14.1 Anexo I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da prevalência da leishmaniose em felinos domésticos e a participação no ciclo de transmissão (Tese)", protocolo nº 102/15, sob a responsabilidade do **Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **11/12/2015**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Dezembro/2015 a Dezembro/2018
Espécie/Linhagem/raça	1. Felinos/ Variadas 2. Hamsters 3. Canino
Nº de Animais	1. 456 2. 20 3. 01
Peso/ Idade	1. Variada 2. Variados 3. SRD
Sexo	1. Machos ou fêmeas 2. Machos 3. Macho ou fêmea
Origem	1. Gatos de residências particulares da cidade de Teresina-PI, os quais são incluídos no estudo sob consentimento dos proprietários. 2. Biotério Central-CCA/UFPI 3. Animal Doado ao estudo

Teresina, 11 de Dezembro de 2015.

*Ivete Lopes de Mendonça*  
Prof.ª Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

## 15 APÊNDICES

### 15.1 Apêndice I



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - CCA**

**LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL – LASAN**

Campus da Socopo - 64.049-550 Teresina, Piauí - Fone: 3215-5756.

#### TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_ brasileiro(a), portador(a) da carteira de identidade N° \_\_\_\_\_ SSP/PI, CPF N° \_\_\_\_\_, com domicílio na (rua, avenida,) \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_, Teresina-PI; recebi explicações acerca dos procedimentos realizados no animal de minha propriedade. Nome: \_\_\_\_\_ da raça: \_\_\_\_\_, sexo M ( ) F ( ), idade \_\_\_\_\_, autorizo que participe do projeto **“ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS DOMÉSTICOS E A PARTICIPAÇÃO NO CICLO DE TRANSMISSÃO”** a ser desenvolvido pela Universidade Federal do Piauí – UFPI, sob coordenação da Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça. Trata-se de uma pesquisa cujo objetivo principal é analisar a possível participação dos gatos transmissão do “calazar”. O Termo de Consentimento estende-se à coleta de material biológico: sangue, medula óssea, linfonodo poplíteo e raspado de pele. Nos animais infectados: realização de xenodiagnóstico e coleta de fragmento de pele e outros procedimentos necessários ao bem estar do animal em foco. Aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob protocolo 102/15.

Teresina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Proprietário

## 15.2 Apêndice II

### QUESTIONÁRIO SÓCIOAMBIENTAL

1 – Tipo de residência

Casa                       Apartamento

2 – Lixo no quintal

Sim                       Não                       Ausência de quintal

2 – Lixo nas proximidades

Sim                       Não

3 – Vegetação próxima

Sim                       Não                      Observação: \_\_\_\_\_

4 – Já teve cão com calazar na residência?

Sim                       Não                      Observação: \_\_\_\_\_

5 – Tem conhecimento de cão com calazar na residência de vizinhos?

Sim                       Não

6 – Criação de outros animais

Não                       Sim                      Quais? \_\_\_\_\_

7 – já realizou desinsetização na sua residência?

Não                       Sim                      Frequência? \_\_\_\_\_

8- Tipo de residência

Alvenaria               Barro                       outros Qual \_\_\_\_\_

9- Teve conhecimento se alguma pessoa na sua rua teve calazar?

Sim                       Não

10- Os gatos vivem dentro ou fora de casa?

Dentro                       Fora

11- Os que ficam fora em que momento entra em casa?

\_\_\_\_\_

12- Os gatos já tiveram alguma doença?

Sim                       Não

13 - Você levou no Veterinário?

Sim                       Não

14 – Tiveram algum problema na pele

Sim                       Não                      Qual \_\_\_\_\_

### 15.3 Apêndice III



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - CCA**  
**LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL – LASAN**  
 Campus da Socopo - 64.049-550 Teresina, Piauí - Fone: 3215-5756.

#### TERMO DE DOAÇÃO

Proprietário:.....

Endereço:.....Fone:.....

Município:.....Estado:.....

Estou doando para o ESTUDO DA PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS DOMÉSTICOS E A PARTICIPAÇÃO NO CICLO DE TRANSMISSÃO, o gato cujas características são as seguintes:

Nome: .....

Espécie: .....

Raça: .....

Idade: .....

Sexo: .....

Pelagem: .....

Observações:.....

Teresina, ..... de ..... de .....

.....

Assinatura do Proprietário