



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CÂMPUS ARAGUAÍNA – TO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

ANNA KAROLLYNE MARTINS RODRIGUES

PESQUISA DE *Leishmania* spp. EM SECREÇÃO OCULAR DE
FELINOS DOMÉSTICOS NO ESTADO DO TOCANTINS

ARAGUAÍNA – TO
2023

ANNA KAROLLYNE MARTINS RODRIGUES

**PESQUISA DE *Leishmania* spp. EM SECREÇÃO OCULAR DE
FELINOS DOMÉSTICOS NO ESTADO DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientador: Profa. Dra. Andressa Francisca Silva Nogueira

Coorientador: Profa. Dra. Helcileia Dias Santos

ARAGUAÍNA – TO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R696p Rodrigues, Anna Karolynne Martins.
PESQUISA DE Leishmania spp. EM SECREÇÃO OCULAR DE FELINOS
DOMESTICOS NO ESTADO DO TOCANTINS. / Anna Karolynne Martins
Rodrigues. – Araguaína, TO, 2023.
29 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2023.

Orientador: Andressa Francisca Silva Nogueira

Coorientador: Helcileia Dias Santos

1. Parasitas. 2. Leishmaniose. 3. Gatos. 4. Diagnóstico. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANNA KAROLYNNE MARTINS RODRIGUES

PESQUISA DE *Leishmania* spp. EM SECREÇÃO OCULAR DE FELINOS DOMÉSTICOS NO ESTADO DO TOCANTINS

Dissertação foi avaliada e apresentada à UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína, Curso de Pós – Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos – PPGSaspt, para obtenção do título de mestre e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 19 / 09 / 2023

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **ANDRESSA FRANCISCA SILVA NOGUEIRA**
Data: 22/11/2023 00:10:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Andressa Francisca Silva Nogueira, UFNT

Documento assinado digitalmente
 **JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR**
Data: 21/11/2023 10:25:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior, UFNT

Documento assinado digitalmente
 **THASSIA SILVA REIS**
Data: 21/11/2023 20:49:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Thássia Silva Reis, UFNT

Araguaína, 2023

RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose mundialmente conhecida que apresenta importante relevância em saúde pública. No Brasil, a região Norte é considerada endêmica para esta zoonose, sendo evidenciada pelo elevado número de cães acometidos em todo o estado do Tocantins e estados circunvizinhos. Os felinos podem ser portadores da doença e se manterem clinicamente saudáveis ou ainda apresentar alguma sintomatologia inespecífica. Técnicas de diagnóstico com coleta de material menos invasiva, minimizando o estresse do paciente, facilitam a manipulação do animal e reduzem alterações dos parâmetros fisiológicos. Neste sentido, o *swab* de secreção ocular, se apresenta como uma possibilidade a ser estudada. O exame citológico apresenta alta especificidade, praticidade e baixo custo para o diagnóstico de leishmaniose. Já a PCR pode ser realizada quando a citologia for negativa e o animal apresenta sinais clínicos ou para detecção do parasita em pacientes assintomáticos. Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo detectar a presença de *Leishmania* spp. por meio da análise citológica e da PCR em amostras de secreção ocular de felinos domésticos no estado do Tocantins. Foram utilizados 46 felinos domésticos, sem distinção de sexo, raça e idade, domiciliados, errantes e abrigados, sendo dois desses sabidamente positivos para leishmaniose. Foram coletadas duas amostras de secreção ocular de cada animal, sendo uma utilizada para avaliação citológica e outra para PCR em busca do protozoário. Os dois animais sabidamente positivos foram positivos na citologia e PCR, e os demais negativos. A amostra de *swab* de secreção ocular, menos invasiva, pode ser utilizada na análise para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em gatos, devendo-se haver mais estudos para comprovação.

Palavras-Chaves: Parasitas. Leishmaniose. Gatos. Diagnóstico.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a world-famous zoonosis of major public health importance. In Brazil, the northern region is considered endemic for this zoonosis, as evidenced by the high number of affected dogs throughout the state of Tocantins and surrounding states. Felines can be carriers of the disease and remain clinically healthy or still show some non-specific symptoms. Diagnostic techniques with less invasive material collection, minimizing patient stress, facilitate animal handling and reduce alterations in physiological parameters. In this sense, the ocular secretion swab is a possibility to be studied. Cytology is highly specific, practical and inexpensive for diagnosing leishmaniasis. PCR, on the other hand, can be carried out when the cytology is negative, and the animal shows clinical signs or to detect the parasite in asymptomatic patients. In view of this, the aim of this study was to detect the presence of *Leishmania* spp. by means of cytological analysis and PCR in ocular secretion samples from domestic cats in the state of Tocantins. A total of 46 domestic cats were used, regardless of sex, breed or age, domiciled, stray or sheltered, two of which were known to be positive for leishmaniasis. Two samples of ocular secretion were collected from each animal, one of which was used for cytological evaluation and the other for PCR in search of the protozoa. The two animals known to be positive were positive in cytology and PCR, and the others were negative. The ocular secretion swab sample, which is less invasive, can be used in the analysis for the diagnosis of *Leishmania* spp. in cats, but further studies are needed to prove this.

Keywords: Parasites. Leishmaniasis. Cats. Diagnosis.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
LM	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVF	Leishmaniose visceral felina
PCR	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 09
2	OBJETIVOS..... 11
2.1	Objetivo Geral..... 11
2.2	Objetivos Específicos..... 11
3	REVISÃO DE LITERATURA..... 12
3.1	Considerações gerais..... 12
3.2	Leishmaniose visceral..... 12
3.3	Leishmaniose visceral felina..... 13
3.4	Métodos de diagnóstico..... 15
3.5	Controle e prevenção das leishmanioses..... 16
	REFERÊNCIAS..... 17
 CAPÍTULO II	
	ARTIGO A. Pesquisa molecular de Leishmania spp. em suabe de conjuntiva ocular como alternativa de menor invasividade para diagnóstico direto de leishmaniose visceral em felinos domésticos 22
	RESUMO..... 22
	ABSTRACT..... 22
1	INTRODUÇÃO..... 23
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 24
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 25
4	CONCLUSÃO..... 27
	REFERENCIAS..... 27
 CAPÍTULO III	
	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 29

CAPÍTULO I

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A leishmaniose é uma zoonose mundialmente conhecida e de grande importância em saúde pública, a qual denota uma epidemiologia amplamente diversificada (BRASIL, 2007). A mesma faz parte de um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes a mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. Essa enfermidade é transmitida aos humanos por vetores conhecidos como flebotomíneos. Existem três formas principais de apresentação da doença: a tegumentar (LT), a visceral (LV) e a mucocutânea (LM) (WHO, 2021).

Atualmente, cerca de 18 países das Américas relatam casos confirmados de leishmaniose, sendo a forma tegumentar a mais comum, enquanto a leishmaniose visceral é a mais severa e possui 90% de letalidade quando não tratada corretamente (MAIA-ELKHOURY; VALADAS; BUZANOVSKY, 2020). Conforme os princípios da resolução WHA60.13 - *World Health Organization* (WHO, 2007), o Brasil atende aos critérios de endemicidade para as leishmanioses e destaca-se negativamente tanto para a forma tegumentar, quanto para a visceral, figurando entre os países do mundo com maior incidência da doença (RUIZ POSTIGO, 2020).

Dentro desse cenário nacional, a região Norte destaca-se como endêmica para a leishmaniose, devido, principalmente, às grandes transformações ambientais, movimentos migratórios e urbanização, deixando de ser uma enfermidade restrita às áreas rurais e sendo constatado pela grande ocorrência de cães acometidos em todos os estados da referida região (BRASIL, 2016; BENEDETTI e PEZENTE, 2020).

Segundo a assessoria técnica de leishmanioses da Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins, o estado registrou 4.151 casos de leishmaniose visceral humana e 6.265 casos de leishmaniose tegumentar no período de 2007 a 2020 (BIGELI, 2021).

Um levantamento realizado pelo Núcleo de Controle de Zoonoses de Colinas do Tocantins contabilizou que no período de janeiro de 2021 à dezembro de 2022, 654 cães positivaram para leishmaniose visceral pelo teste de triagem imunocromatográfico *Dual Path Platform* (DPP), seguido do exame confirmatório ensaio imunoenzimático, para detecção de anticorpos (CARDOSO, 2023).

Com o aumento da população felina como animal de companhia, o aperfeiçoamento da medicina felina faz-se cada vez mais necessário, haja visto que estes animais apresentam

particularidades comportamentais e fisiológicas muito específicas, bem distintas dos cães (MENDES, 2013). Nesse contexto, há comprovação científica por meio de inúmeros estudos realizados, de que os felinos são importantes reservatórios da leishmaniose. Um estudo feito por Batista (2020), comprovou que os gatos são altamente capazes de atuar como fonte de infecção de *Leishmania* spp. para cães.

Dentre as formas de diagnóstico para a leishmaniose existem a identificação do parasito, por meio do exame parasitológico, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, por meio de testes imunológicos e a amplificação do DNA do parasito, por meio de testes moleculares (GARRIDO, 2012). Existe também, ainda que experimentalmente, a citometria de fluxo utilizada para a diferenciação da forma visceral para a forma tegumentar, por meio de imunoglobulinas (IgG) específicas (CONTIJO, 2011).

Santos *et al* (2018), revelam que a utilização da citologia de material como linfonodo, medula óssea, nódulos cutâneos e mucocutâneos suspeitos são de grande auxílio no fechamento do diagnóstico. Aspirados de lesões, em animais positivos, podem evidenciar a forma amastigota do parasito extracelular ou no interior de macrófagos.

O presente trabalho baseia-se no impacto que a Leishmaniose possui na saúde pública, bem como na quantidade de casos reportados na região Norte e no estado do Tocantins, buscando avaliar a detecção desse parasito na secreção ocular de felinos, que atuam como reservatório da doença, fazendo parte do ciclo epidemiológico da mesma.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Detectar a presença de leishmaniose felina, por meio do diagnóstico de *Leishmania* spp. em gatos domésticos no estado do Tocantins, utilizando o exame citológico e Reação em cadeia da polimerase (PCR) de secreção ocular, como possível técnica menos invasiva.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a presença de *Leishmania* spp. na secreção ocular de felinos domésticos no Tocantins;
- Verificar a eficácia do método citológico e PCR em secreção ocular para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em felinos domésticos no Tocantins;
- Avaliar a secreção ocular como material biológico para detecção de *Leishmania* spp. por meio da citologia e PCR.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Considerações gerais

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que acometem pele, mucosas e vísceras de mamíferos. Os protozoários do gênero *Leishmania* spp. são parasitas intracelulares obrigatórios que apresentam predileção pelas células do sistema monocítico fagocitário, onde se transformam em sua forma amastigota, aflagelada. Sua forma infectante, promastigota metacíclica é, principalmente, transmitida pela picada de flebotomíneos (BRASIL, 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A partir da picada na pele pelo hospedeiro invertebrado, ocorre a transmissão do parasito (forma promastigota) para os mamíferos. Nesses animais, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mono e polimorfonuclear, no qual se transformam em amastigotas. Essa forma do parasito se multiplica por divisão binária até a ruptura da célula, podendo infectar as células adjacentes. No local da picada, ocorre uma reação imune e inflamatória, levando ao aparecimento de uma lesão (CDC, 2020).

Os cães apresentam papel de destaque como principal reservatório urbano e periurbano. Contudo, os gatos vêm se destacando, tendo a *Leishmania infantum* como principal espécie associada à infecção (DANTAS-TORRES, 2007; PENNISI, 2015). Outros hospedeiros vertebrados naturais relatados são tatus, preguiças, macacos, gambás, humanos, cavalos e ratos (SILVA; WINCK, 2018).

3.2 Leishmaniose visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar, como é popularmente conhecida, é uma doença parasitária crônica grave que vem se tornando um importante problema de saúde pública mundial, devido à considerável expansão geográfica, elevada incidência e altas taxas de mortalidade (FRANÇA-SILVA et al., 2003).

A LV é uma doença infecciosa sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, aumento do fígado e baço, perda de peso, fraqueza, redução da força muscular, anemia, dentre outras manifestações clínicas (PICCICA et al., 2021; RAIMUNDO et al., 2022; VASCONCELOS et al., 2019). Essa enfermidade acomete órgãos como baço e fígado, sendo a forma mais agressiva e letal. A LV e Tegumentar se manifestam principalmente em cães e representam um grande problema de saúde pública em países endêmicos, como o Brasil (CASTRO et al., 2022).

3.3 Leishmaniose visceral felina

A leishmaniose em felinos foi reportada pela primeira vez na Argélia em 1912 (SERGENT et al., 1912), desde então, a enfermidade vem sendo alvo de pesquisas em diferentes regiões do mundo (DIAKOU et al., 2009). No Brasil, o primeiro registro de infecção em felinos ocorreu em 1962 (DEANE; DEANE, 1962). Apesar de haver grandes divergências em relação ao papel do felino no ciclo de transmissão dessa zoonose, estudos evidenciam essa espécie como fonte de infecção para a leishmaniose visceral, possivelmente por atuar como um reservatório adicional e/ou hospedeiro secundário, alternativo ou acidental, uma vez que este possui a capacidade de transmitir o protozoário ao vetor (COELHO et al., 2011; DALVI; CARVALHO; WERNECK, 2018; DA SILVA et al., 2010; MAIA; CAMPINO, 2011; NEMATİ et al., 2015).

Até o momento do presente estudo, cinco (5) espécies do gênero *Leishmania* foram descritas em gatos, *Leishmania (Leishmania) mexicana*; *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*. Os felinos, provavelmente, são infectados pela mesma espécie que infecta a população humana e canina. A infecção causada por *Leishmania infantum* é relatada principalmente em machos adultos, com idade média de 7 anos, pelo fato de que vivem ou estão em viagem para regiões endêmicas (PEREIRA; MAIA, 2021).

No Brasil, a leishmaniose felina já foi relatada em oito estados, sendo eles: São Paulo (CHAGAS et al., 1938), Bahia (SHERLOCK, 1996), Rio de Janeiro (SCHUBACH et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2009), Mato Grosso do Sul (NOÉ et al., 2015), Minas Gerais (SILVA et al., 2010), Distrito Federal (MARODIN, 2011), Tocantins (SOUSA, 2017) e Paraíba (ARRUDA et al., 2017).

A leishmaniose felina tem sido relatada de forma esporádica e, em decorrência disso, o papel dos felinos no ciclo biológico da *Leishmania* spp. não foi bem elucidado (COURA et al., 2018). Estudos relataram a presença de material genético (DNA) compatível com parasitas do gênero *Leishmania* spp. no interior do trato digestivo de flebotomíneos, após o repasto sanguíneo em felinos positivos, o que evidencia a capacidade desta espécie em ser fonte de infecção (LONGONI et al., 2012; MAROLI et al., 2007; SOBRINHO et al., 2012).

Segundo a literatura, a maioria dos indivíduos felinos são assintomáticos e os que apresentam sintomatologia clínica são de curso crônico e com sinais clínicos, na maioria das vezes, inespecíficos, que podem ser confundidos com outras enfermidades. Cerca de um terço dos animais apresentam coinfeção por outras enfermidades, tais como retrovírus

(FIV/FELV), coronavírus felino (FCoV), *Bartonella henselae* e *Toxoplasma gondii* (PEREIRA; MAIA, 2021).

As lesões de pele, normalmente, são as únicas que o animal apresentará ou podem estar acompanhadas por sinais sistêmicos inespecíficos e a doença pode assumir, eventualmente, uma forma aguda típica, com evolução em algumas semanas para o óbito (OZON et al., 1998). Em torno de 20% a 30% dos animais apresentam outras manifestações como lesões oftálmicas ou em cavidade oral, perda de peso, anorexia, letargia e desidratação (PENNISI et al., 2015; PEREIRA; MAIA 2021).

Os achados laboratoriais mais frequentes são anemia, geralmente normocítica normocrômica, e hiperproteinemia (FERNANDEZ-GALLEGO et al., 2020).

3.4 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico de *Leishmania* spp. pode ser realizado por meio de diversas técnicas, sejam elas diretas, como a visualização em microscopia óptica, avaliação molecular, a exemplo da reação em cadeia de polimerase (PCR), isolamento da forma promastigota ou indiretas, como a reação de imunofluorescência e ELISA indireto (BRASIL, 2007; MÜLLER et al., 2003).

Sabe-se que as técnicas sorológicas rotineiramente empregadas para cães não demonstram ser um instrumento eficiente para a determinação da infecção em gatos (WHO, 2007). Os resultados obtidos em vários estudos sugerem que a resposta imune em gatos difere da observada em cães e que os primeiros raramente desenvolvem uma resposta imune humoral. Portanto, o teste padrão ouro para diagnóstico de leishmaniose visceral felina é o exame parasitológico direto até o presente momento, em amostras de tecidos obtidas por punção biópsia aspirativa (PBA), identificando formas amastigotas, principalmente em linfonodos, medula óssea e baço. Entretanto, a técnica depende diretamente da carga parasitária do animal infectado, o que pode gerar resultados falso-negativos (CHATIZS et al., 2014; VILHENA et al., 2013).

O diagnóstico sorológico é amplamente empregado, sendo o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) mais comumente utilizados em cães (CAN et al., 2016; COSTA et al., 2010; SPADA et al., 2013).

Os títulos de anticorpos são úteis em identificar uma resposta imune contra antígenos de *Leishmania infantum*. A RIFI depende muito da experiência do examinador ao fazer a leitura das lâminas (CHATIZS et al., 2014). No entanto, é o método sorológico mais utilizado

em pesquisas sobre a Leishmaniose visceral felina (LVF), de 78 estudos transversais, publicados de 1982 a 2017, sobre o tema, cerca de 38,5% usaram esta técnica. Can e colaboradores (2016), evidenciaram que felinos negativos na RIFI, mas suspeitos para a doença, devem ser submetidos a testes como PCR ou *Western Blot*.

As técnicas moleculares apresentam maior sensibilidade para o diagnóstico de leishmaniose felina, como PCR por exemplo, que permite ainda a confirmação de *Leishmania infantum* (GRAMICCIA, 2011; PENNISI et al., 2015; SOLANO-GALLEGO et al., 2006). São consideradas também uma boa opção para confirmar o diagnóstico e para detecção do parasita em pacientes assintomáticos (GRAMICCIA, 2011). No entanto, a detecção de DNA de *Leishmania infantum* pode não significar necessariamente a existência de uma infecção ativa, uma vez que na literatura demonstraram que felinos domésticos infectados não apresentaram manifestações clínicas aparentes (PIRAJÁ et al., 2013).

O diagnóstico pela PCR possui a vantagem de conseguir identificar uma baixa carga parasitária em amostras biológicas (COELHO et al., 2011; CAN et al., 2016) e por isso é recomendado em gatos. Para o diagnóstico molecular pode-se utilizar fragmentos de pele, mucosas, sangue periférico, medula óssea, órgãos do sistema fagocítico-mononuclear ou *swab* de conjuntiva ocular, que tem se mostrado capaz de detectar felinos infectados com *Leishmania* spp. A coleta de amostras da conjuntiva vem sendo bastante estudado por ser um método simples, menos invasivo e pouco estressante para os felinos domésticos (OLIVEIRA et al., 2015).

3.5 Controle e prevenção das leishmanioses

O Brasil é um dos países com a maior população de animais domésticos do mundo, sendo, aproximadamente, 101,1 milhões. Os cães são os mamíferos considerados principais reservatórios da LV no perímetro urbano, devido a sua domesticação e proximidade com os humanos. Por esse motivo estão relacionados com o aumento do índice da doença na população humana (LAMOUNIE et al., 2017).

Dentre as orientações do Ministério da Saúde brasileiro para prevenção e controle das leishmanioses, destacam-se: evitar a construção de moradia em regiões próximas às matas; quando indicada pelas autoridades de saúde executar a dedetização do ambiente; evitar banhos de rio ou de igarapés; desenvolver o hábito de utilizar repelentes na pele em áreas endêmicas; usar mosquiteiros para dormir; uso de telas protetoras em janelas e portas e, por fim, eutanásia de cães positivos para a doença (BRASIL, 2016).

De forma geral, a profilaxia baseia-se na redução da população do mosquito vetor e na promoção de atividades de educação em saúde (MONTEIRO, 2017). Não existe na literatura nenhuma informação preventiva específica para a espécie felina, portanto, a profilaxia baseia-se de forma semelhante ao que é estipulado para os cães, com o uso de inseticidas de uso tópicos. Como a maioria dos piretróides é tóxico para os gatos, os colares de fumetrina são a única formulação piretróide licenciada para gatos (LEISHVET GUIDELINES, 2018). Estudos em cães sugerem que este colar age tanto para reduzir o risco de infecção em áreas endêmicas quanto para limitar a infecção nos animais já positivos (PENNISI et al., 2015). Além disso, uma forma de prevenção e controle dessa zoonose na espécie felina é a introdução desses animais como reservatórios confirmados e passar a incluir exames de triagem na conduta clínica de rotina, mesmo em pacientes aparentemente saudáveis, mas que estão inseridos em áreas endêmicas.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, J. F *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 4, 2020.
- BENEDETTI, M. S. G.; PEZENTE, L. G. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no extremo Norte do Brasil / Epidemiological aspects of visceral leishmaniosis in Northern Brazil. **Brazilian Journal Of Health Review**, Curitiba, v.3, n.5, p.14203-14226, 2020.
- BIGELI, J. **Informações sobre Leishmaniose visceral e tegumentar**. 2021[mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <lvtocontins@gmail.com > 17/05/2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 121 p.
- CAN, H *et al.* Soroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 167, p.109-114, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.05.011.
- CARDOSO, J. **Informações sobre Leishmaniose visceral em cães**. 2023.[mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <ncz.colinas@gmail.com > 19/07/2023.
- CASTRO, M. M *et al.* Pentoxifylline in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: A CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Biology. 2020.
- CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral americana. II. **Estudos epidemiológicos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 138-206, 1938.
- CHATZIS, M. K *et al.* Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 217-225, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.02.044.
- COELHO, W. M. D *et al.* Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 176, n. 2-3, p. 281-282, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.052.
- COSTA, T. A. C *et al.* Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 27, n. 4, p. 570–574, 2018.
- DA SILVA, S. M *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from anaturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 150-4, 2010.

DALVI, A.P.R.; CARVALHO, T.D.G.; WERNECK, G.L. Is There an Association Between Exposure to Cats and Occurrence of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs? **Vector Borne Zoonotic Dis**, v, 18, n. 7, p. 335-342, 2018.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 20 mar.2023.

FERNANDEZ-GALLEGO, A *et al.* Feline leishmaniosis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 22, n. 10, p. 993-1007, 2020. DOI: 10.1177/1098612X20902865.

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 Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 141-5, 2009.

FRANÇA-SILVA, J. C *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 161-173, 2003.

GARRIDO, J. M. C. B. G. Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania Infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 115f. 2012.

GONTIJO, B. B *et al.* Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **Pubvet**, v. 5, p. Art. 1245-1250, 2011.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

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 and infectious diseases**, v. 35, n. 5, p. 469–76, set. 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341-4, 2011.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; VALADAS, S. Y. O. B.; BUZANOVSKY, L. P. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>

MARODIN, N. B. Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana Distrito Federal. 2011. **Dissertação (Mestrado)** Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011.

- MAROLI, M *et al.* Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 357–60, 30 abr. 2007.
- MENDES, F. F *et al.* Obesidade felina. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 1602-1625, jul. 2013.
- MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p. 140-141, 2017.
- MÜLLER, N *et al.* PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary parasitology**, v. 114, n. 3, p. 223–9, 2003.
- NEMATI, T *et al.* Study on *Leishmania* infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and Northwest Iran by parasitological, serological and molecular methods. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 1, p. 40-3, 2015.
- 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, G. C *et al.* Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 464-470, 2015.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde: **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas [Internet]**. Núm. 10, dezembro de 2021. Washington, D.C.: Organização Pan-Americana da Saúde; 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em 15 març 2023.
- OZON, C *et al.* Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 273-277, 1998.
- PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 35–47, 2015.
- PEREIRA, A.; MAIA, C. *Leishmania* infection in cats and feline leishmaniosis: an updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. **Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 1, artigo 100035, 21 p., 2021.
- PERSICHETTI, M. F *et al.* Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, artigo 119, 8 p., 2017
- PICCICA, M *et al.* Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and RAIMUNDO, V. D. *et al.* Effects of terpenes in the treatment of visceral leishmaniasis: a Randomized Clinical Trial in Colombia. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 378, 2022.
- PIRAJÁ, G. V *et al.* Leishmaniose Felina-Revisão de Literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, p. 203-216, 2013.

RUIZ POSGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization**, Geneva, Switzerland. 19 jun 2020. Disponível em: [hp://www.scielo.br/pdf/soc/v18n41/1517-4522-soc-18-41-00216.pdf](http://www.scielo.br/pdf/soc/v18n41/1517-4522-soc-18-41-00216.pdf) Acesso em: 15 de març. 2023.

SANTOS, C. M. D *et al.* Análise citológica para diagnóstico de leishmaniose em um gato oligossintomático em área endêmica, Campo Grande, MS, Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**. Brasil, v.1, n.1, p.59-71, 2018. Disponível em: <http://brjd.com.br/index.php/BJAER/article/view/385/571>. Acesso em: 20 mar. 2023.

SCHUBACH, T. M. P *et al.* American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165- 167, 2004.

SILVA, C. M. H. S.; WINCK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, p. 125–128, 2018.

SOBRINHO, L. S. V *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.

SOLANO-GALLEGO, L *et al.* Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007.

SOUSA, S. A. P. Diagnóstico de leishmaniose em *Felis catus domesticus* de área urbana endêmica da região norte do Brasil. 2017. **Dissertação (Mestrado)** Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2017.

SPADA, E *et al.* Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* infection in stray cats in a nonendemic area in northern Italy. **International Scholarly Research Notices Parasitology**, New York, v. 2013, artigo 916376, 6 p., 2013.

TORRES-GUERRERO, E *et al.* **Open Peer Review Leishmaniasis: a review**. F1000Research, v.750, n.6, p.1-15, 2017.

VASCONCELOS, D. R. B. Detecção de *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* por meio de PCR em tempo real. Triagem de genes e métodos quantitativos. **Universidade Estadual do Ceará**. 2010.

VIDES, J. P *et al.* *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1, p. 22-28, 2011.

VILHENA, H *et al.* Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. **Parasites and Vectors**, London, v. 6, artigo 99, 6 p., 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fichas Técnicas. Leishmanioses.** 2021. Disponível em: [hps://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1). Acesso em: 15 de març. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Resolução WHA60.13.** 2007 Disponível em: [hps://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Eng.pdf?ua=1](https://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Eng.pdf?ua=1). Acesso em: 15 de març. 2023.

CAPÍTULO II – ARTIGO A

Pesquisa molecular de *Leishmania* spp. em suabe de conjuntiva ocular como alternativa de menor invasividade para diagnóstico direto de leishmaniose visceral em felinos domésticos

Molecular detection of Leishmania spp. in ocular conjunctival swabs as a less invasive alternative for direct diagnosis of visceral leishmaniasis in domestic cats

Anna Karolynne Martins Silva¹, Andressa Francisca Silva Nogueira²

Universidade Federal do Norte do Tocantins – Araguaína, Tocantins,
Brasil.

Correspondência: annakrmartins@gmail.com

RESUMO: A leishmaniose visceral é uma antropozoonose, endêmica, de grande relevância em saúde pública, além de acometer o homem, os cães e alguns animais silvestres, os gatos têm apresentado números gradativos da ocorrência da doença, impulsionando as investigações e o diagnóstico nesta espécie. Os felinos, quando manipulados, podem tornar-se altamente estressados, o que influencia diretamente na qualidade de amostras coletadas, bem como no resultado de um exame. Diante disto, as técnicas diagnósticas citológica, PCR e sorológicas, mais usadas, geram estresse significativo ao paciente durante a coleta. Como alternativa, amostras de conjuntiva ocular coletadas por *swab* vêm sendo utilizadas como método menos invasivo promissor para o diagnóstico de leishmaniose. A presente pesquisa teve como objetivo detectar a presença de *Leishmania* spp. em gatos domésticos no estado do Tocantins, utilizando o exame citológico e PCR de secreção ocular, como possível técnica menos invasiva. Foram utilizados 46 felinos domésticos, sem distinção de sexo, raça e idade, domiciliados, errantes e abrigados, sendo dois desses sabidamente positivos para leishmaniose. Foram coletadas duas amostras de secreção ocular de cada animal, sendo uma utilizada para avaliação citológica e outra para cPCR. Dentre os animais amostrados, 44 apresentaram resultados negativos e 2 foram positivos em ambas as amostras na citologia e PCR. Desta forma sugere-se que a amostra de secreção ocular pode ser utilizada como amostra para diagnóstico de *Leishmania* spp. em gatos, devendo-se haver mais estudos para comprovação.

Palavras chaves: Antropozoonose. Gato. Protozoário.

ABSTRACT: Visceral leishmaniasis is an endemic anthroponosis of great relevance to public health. As well as affecting humans, dogs and some wild animals, cats have shown a gradual increase in the occurrence of the disease, driving research and diagnosis in this species. Among the diagnostic techniques, cytology stands out due to its practicality and

affordability, as well as its high specificity, and the PCR technique, which is used in cases of negative cytology, but with a patient who is characteristic of leishmaniasis, where although negative, it is not possible to exclude the presence of the disease and a more comprehensive investigation becomes necessary, including in cases of asymptomatic patients and taking into account the need to minimize stress and seek minimally invasive techniques, such as the use of ocular secretions. In view of this, the aim of this study was to detect the presence of feline leishmaniasis by diagnosing *Leishmania* spp. in domestic cats in the state of Tocantins, using cytological examination and polymerase chain reaction (PCR) of ocular secretions as a possible less invasive technique. 46 domestic cats were used, without distinction of sex, race or age, domiciled, stray or sheltered, two of which were known to be positive for leishmaniasis. Two ocular secretion samples were collected from each animal, one of which was used for cytology and the other for cPCR in search of the protozoan. Of the animals sampled, 44 had negative results and 2 were positive in both the cytology and PCR samples. It is therefore suggested that the ocular secretion sample can be used as a sample for diagnosing *Leishmania* spp. in cats, but further studies are needed to prove this.

Keywords: Anthroozoonoses. Cats. Leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o detentor do maior número de casos de leishmaniose felina (LF) do mundo. A distribuição no país já foi relatada em diversos estados brasileiros de diversas regiões (ARRUDA et al., 2017; MARODIN, 2011; SOUSA, 2017). No entanto, o real papel dos felinos domésticos no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral humana ainda é pouco esclarecido. Dessa forma, faz-se necessário a realização de estudos que elucidem o verdadeiro papel do gato no ciclo zoonótico desta doença por meio da associação de métodos sorológicos e moleculares para maior precisão no diagnóstico (PERUCA, 2011).

Segundo Jusi et al. (2011), a maioria dos casos de infecção felina concentram-se em áreas endêmicas, com relatos prévios de infecção canina e humana (MOHEBALI et al., 2017), logo, pesquisas envolvendo a espécie em regiões não estudadas, como o estado do Tocantins, por exemplo, são de grande relevância.

Sabe-se que os métodos diagnósticos também podem apresentar limitações quanto ao esclarecimento da importância dos felinos para as leishmanioses. Independente do diagnóstico direto ou indireto, é necessário utilizar meios sensíveis e específicos. Nesse contexto, a PCR pode ser uma alternativa para monitoramento do parasita em animais reservatórios ou hospedeiros acidentais.

Os felinos apresentam maior predisposição à elevado estresse durante as coletas de material biológico para diagnóstico de enfermidades. A utilização de métodos menos invasivos, como suabes de mucosas, pode ser uma alternativa para proporcionar maior bem-

estar animal ao paciente e maior segurança ao profissional médico veterinário durante a coleta. Segundo Benassi *et al.* (2017), a detecção de leishmaniose felina por swab ocular é bastante interessante em gatos, principalmente por se tratar de um método menos invasivo.

Portanto, objetivou-se detectar a presença de *Leishmania* spp. em gatos domésticos no estado do Tocantins, utilizando o exame citológico e PCR de secreção ocular, como possível técnica menos invasiva.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 46 felinos, dos quais 2 animais eram sabidamente positivos para *Leishmania* spp. Todos os animais eram domiciliados, errantes ou abrigados nas cidades de Araguaína, Colinas do Tocantins, e Palmas. Não houve seleção ou distinção em relação à sexo, raça e idade.

Para os 2 animais comprovadamente positivos para *Leishmania* spp., foram coletadas amostras sanguínea periférica, punção de linfonodo e secreção ocular para realização da PCR. Para os demais felinos foram coletadas secreção ocular (OLIVEIRA *et al.*, 2015). As coletas foram realizadas no período de janeiro de 2021 a dezembro de 2022. As amostras foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Norte do Tocantins, em Araguaína-TO, para as análises citológicas no Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Veterinária Universitária e moleculares no Laboratório de microbiologia de alimentos.

Para avaliação citológica de linfonodo dos animais sabidamente positivos foi realizada a confecção das lâminas segundo Cowell *et al.* (2009). Para secreção ocular, de todos os animais, a confecção das lâminas foi realizada pelo método de rolamento, seguindo também a técnica recomendada por Cowell *et al.* (2009). As lâminas foram devidamente identificadas com numeração sequencial, iniciando pelo número 1 até o 46 e, após secagem, foram coradas com corante anóptico rápido New Prov[®] e analisadas por meio de microscopia óptica, em objetiva de 100x, com óleo de imersão.

Para realização da PCR, as amostras foram submetidas à extração de gDNA utilizando kit comercial (BIO GENE EXTRAÇÃO DE DNA/RNA, Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) conforme as recomendações do fabricante. O material extraído foi imediatamente submetido à reação de PCR.

As reações de PCR foram realizadas com ≈ 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada base nitrogenada, 2,5 μ L de 10X buffer, 75 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 20 pmol.L⁻¹ de cada

oligonucleotídeo iniciador e 2.5 U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), com volume final de 25 µL. Foram utilizados os primers MC1 (5'-GTTAGCCGATGGTGGTCTTG-3') e MC2 (5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3') gênero específico para *Leishmania* spp. conforme Cortes et al. (2004). As condições de amplificação dos ensaios uniplex foram as mesmas otimizadas por Cortes et al. (2004) (um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/2 min; 35 ciclos de 94°C/20 seg, anelamento a 60°C/20 seg e extensão a 72°C/30 seg; e, um ciclo de extensão final à 72°C/5min), com modificação somente em relação ao número de ciclos de 30 para 35.

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em brometo de etídio (20mg/L) e documentados sob luz ultravioleta, sendo considerados positivos amplicons de 447 pb.

O presente trabalho foi aprovado junto em complemento ao trabalho aprovado no comitê de ética da UFT sob o processo n°. 1 23101.001759/2016-42.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois animais sabidamente positivos para *Leishmania* spp., conforme esperado, testaram positivo para as análises citológicas de secreção ocular e linfonodo e PCR de sangue periférico, linfonodo e secreção ocular (Figura 1).

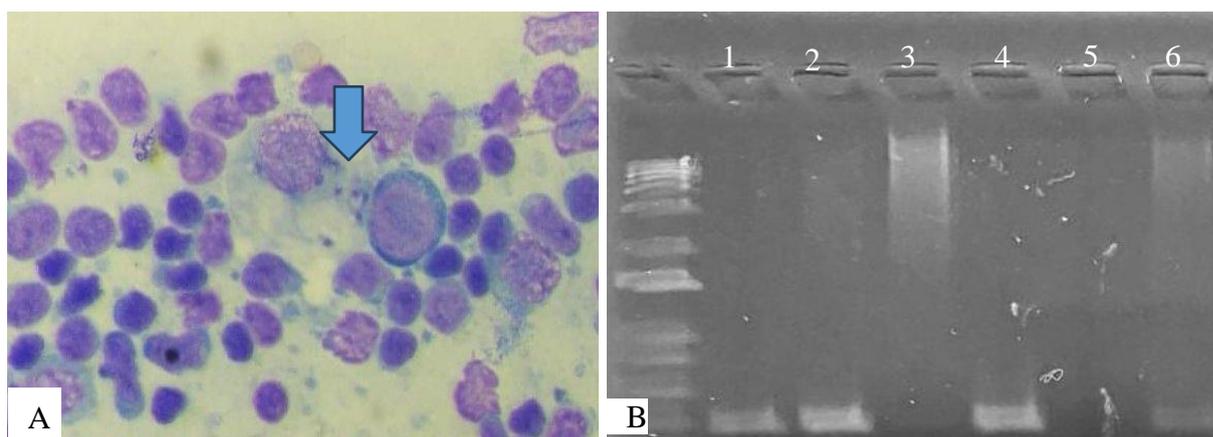


Figura 1 – **A:** *Leishmania* spp. no interior de monócitos, material de linfonodo. **B:** Leitura da PCR, poço 1 (secreção ocular), 2 (linfonodo submandibular), 3 (sangue), 4 (secreção ocular), 5 (secreção ocular – amostra negativa) e 6 (sangue), positivos para *Leishmania* spp.

As leituras dos resultados citológicos e moleculares desses dois animais positivos validaram os ensaios delineados e foram, portanto, utilizados como modelo para a testagem dos outros 44 animais que compuseram o estudo.

Na presente pesquisa, das 44 amostras de secreção ocular analisadas no exame citológico e PCR para *Leishmania* spp., todas obtiveram resultados negativos. Na figura 2 está representada a leitura do ensaio de PCR para algumas amostras.

Otranto et al. (2017) relatam que os métodos moleculares utilizados para diagnosticar leishmaniose felina são muito divergentes, inclusive quanto aos protocolos e reagentes utilizados e, portanto, difíceis de serem comparados entre si. De fato, o estudo de Oliveira et al. (2015) comparou dois métodos moleculares para diagnóstico direto de *Leishmania* spp. em suabe de conjuntiva ocular de gatos e não encontrou resultados positivos na PCR utilizando os primers MC1 e MC2, como os utilizados no presente estudo e que foram suficientes para identificação do parasita nas amostras oculares dos pacientes sabidamente positivos. Dessa forma, outras etapas do processamento molecular, como o kit de extração de DNA, qualidade do armazenamento do DNA alvo e/ou condições de amplificação podem influenciar nos resultados, ressaltando que a otimização intralaboratorial do método é fundamental para aumentar a sensibilidade analítica.

No estudo realizado por Metzdorf et al. (2017), 6% dos animais testados apresentaram diagnóstico positivo para *Leishmania* spp. em amostras de suabe ocular. Dessa forma, considerando os resultados da presente pesquisa, no qual foi observado resultado negativo na citologia e na PCR, é possível que todos os 44 animais do grupo experimental realmente eram negativos para a doença na forma subclínica, uma vez que nenhum também foi observado os sinais clínicos descritos para os felinos.

Lopes et al. (2017), salientam que não há testes diagnósticos considerados oficiais, ou um padrão-ouro para utilizar em gatos, o que permitiria mensurar adequadamente o valor dos testes por meio de cálculos de concordância e indicadores epidemiológicos. Portanto, o presente estudo fortalece perspectivas futuras de padronização de diagnósticos para detecção de *Leishmania* spp. em felinos, aliando praticidade e assertividade, buscando um melhor entendimento da epidemiologia da leishmaniose visceral, assim como o papel dos felinos como reservatórios do parasito.

A escolha do método citológico como diagnóstico utilizado na presente pesquisa deve-se à alta especificidade, praticidade e baixo custo que ele apresenta, podendo ser adotado como de eleição na confirmação do diagnóstico, embora o resultado negativo não exclua em muitos casos a presença da doença.

As aplicações da PCR na detecção e quantificação de espécies de *Leishmania* representam um grande avanço em termos de automação, rendimento, rapidez e alta sensibilidade, no entanto, ainda faltam estudos quanto à padronização dos ensaios, sendo,

portanto, árdua a definição de uma abordagem ideal devido à grande heterogeneidade dos ensaios publicados e da ausência de consenso quanto aos procedimentos de amostragem clínica e sequências-alvo (GALLUZZI *et al.* 2018).

4 CONCLUSÃO

Foram encontradas *Leishmania* spp. na secreção ocular de felinos positivos para leishmaniose pelos métodos de citologia e PCR, podendo sugerir que este material pode ser utilizado como amostra para detecção de *Leishmania* spp. em felinos, tendo a vantagem de ser uma coleta pouco invasiva e devendo, portanto, haver mais estudos e ampliação do número amostral para fundamentação de resultados mais robustos, além da comparação com métodos de diagnóstico indireto que podem complementar informações sobre o status sanitário dos animais avaliados.

REFERÊNCIAS

- BENASSI, J. C *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol*, v.177, p.93-97, 2017.
- CHAPPUIS, F *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Publishing Group**, v.5, p.873-882, 2007.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: proceedings of the International Canine Leishmaniasis forum. Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet., p.6-10, 1999.
- GALLUZZI, L *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v.2, p.273, 2018.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.338-349, 2004.
- GRINDEM, C.B *et al.* **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. Ed. Medvet, 3ª. Edição, São Paulo, 476p, 2009.
- LACHAUD, L *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p210-215, 2002.
- LOPES, E. G *et al.* Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiol Infect**, v.145, p.2436-2444, 2017.
- METZDORF, I. P. *et al.* Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic

cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 166, p. 121-125, 2017.

OTRANTO, D *et al.* Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. **Vet Parasitol**, v.15, p.144-151, 2017.

PERUCA, L. C. B. **Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose canina e humana.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de medicina veterinário e zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

SPADA, E *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats innorthern Italy. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.45, p.53-58, 2016.

CAPÍTULO III

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é um país com grande número de caso de Leishmaniose, embora ainda predominante em cães, sua ocorrência cada vez mais é identificada também em gatos, quando observados os lares nacionais, é notório que os ambientes possuem cada vez mais ambas as espécies, o que torna ainda mais fácil o adoecimento dos gatos, que estão diretamente expostos as mesmas condições que os cães.

Gatos são animais que precisam de um ambiente mais tranquilo para manuseio, principalmente veterinário, são animais com um nível de estresse significativo que pode implicar diretamente no agravo da saúde desse paciente. A busca por metodologias diagnósticas que minimizem esse estresse, e permitam um manuseio adequado desses animais é de suma importância, ainda por se tratar de animais que vem ganhando cada vez mais espaço no âmbito familiar, como um integrante tão importante quanto um filho.

Desta forma, o uso de secreção ocular, para o diagnóstico da leishmaniose, visa principalmente fornecer um método simples, minimamente invasivo e que implicará minimamente no estado geral do animal, permitindo um manuseio e diagnóstico mais simples, para os números cada vez mais crescentes da doença.