

NUNO WOLFGANG BALBINI PEREIRA

**Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da  
leishmaniose em gatos**

Pirassununga

2020

NUNO WOLFGANG BALBINI PEREIRA

**Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da  
leishmaniose em gatos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental  
Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

Pirassununga

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3924  
FMVZ

Pereira, Nuno Wolfgang Balbini  
Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da leishmaniose em gatos /  
Nuno Wolfgang Balbini Pereira. – 2020.  
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Pirassununga, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. Suabe oral. 2. Gatos. 3. Diagnóstico molecular. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Aplicação de swabe oral para o diagnóstico molecular da leishmaniose em gatos", protocolada sob o CEUA nº 6602050318 (ID 005848), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira; Nuno Wolfgang Balbini Pereira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 04/12/2018.

We certify that the proposal "Use of oral swab for molecular diagnosis of leishmaniasis in cats", utilizing 100 Cats (males and females), protocol number CEUA 6602050318 (ID 005848), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira; Nuno Wolfgang Balbini Pereira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/04/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **06/2019**

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 10 anos**

N: **100**

Linhagem: **SRD**

Peso: **2 a 10 kg**

Local do experimento: Coletas: Cidade de Ilha-Solteira - SP - Brasil Extração de DNA e Protocolos de PCR: Pirassununga - SP - Brasil

São Paulo, 26 de janeiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEREIRA, Nuno Wolfgang Balbini

Título: Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da leishmaniose em gatos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.

Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dizem que por trás de um grande homem, há uma grande mulher; se sou ou um dia serei um grande homem eu não sei – pelo menos em termos de altura eu já desisti – mas posso dizer que em minha vida tive o prazer de conhecer e conviver com quatro mulheres incríveis, às quais dedico esse trabalho:

À minha mãe, Ana Maria. Diz um dos clichês mais clássicos que “a mãe faz tudo pelo filho”. É verdade. Em minha experiência pessoal, creio até mesmo que “tudo” seria um advérbio bem modesto. Você não acreditaria.

À Camila, sempre ao meu lado, mesmo eu sendo um idiota. Se isso não é amor, eu não sei o que é.

À profa. Vera Lettice. Não é qualquer um que vê um aluno perdido num canto e se propõe a ajudar, faz dele seu amigo e até o recebe em sua casa. E tantas outras coisas que não caberiam aqui. Muito obrigado por tudo!

À profa. Trícia Maria. Estou certo de que não fiz por merecer toda a confiança e oportunidades que a Sra. me ofereceu. Já no dia em que nos conhecemos eu recebi uma. Serei eternamente grato.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu avô, pela criação, companhia e exemplo. Eu colocaria na dedicatória, mas não faria muito sentido dedicar esse trabalho, pois eu já dedico minha vida toda ao Sr.

Ao meu padrasto, Sérgio, por tudo que me permitiu, assim como pelo bem que fez à minha família. Eu nem mesmo teria feito graduação sem sua ajuda. Obrigado, de todo coração.

À toda minha família, em especial à minha avó, Aparecida, também parte fundamental de minha criação, e ao meu padrinho, Antônio Carlos, por todo o apoio durante a pós-graduação, tendo inclusive me arrastado até a inscrição.

Aos meus grandes amigos Cláudio, Jorge e Yo. Mesmo na fase da distância e WhatsApp, a logística é sempre violenta. Que todos esses anos juntos sejam poucos perto dos que virão.

Ao Mateus, grande companheiro. Cada momento, debates acalorados sobre Star Wars e conselhos foram muito especiais.

Ao pessoal da APAISA e Recanto Feliz, pelo trabalho desenvolvido e por conceder a possibilidade dessa pesquisa.

Aos professores Edson, Helena, Lara, Rodrigo, Valéria, Cláudia, Andrea e Wilma pelo exemplo que representam, assim como por auxiliarem nesse trabalho.

À Júlia Benassi, sempre acolhedora e disposta a ensinar e ajudar. Quase sempre sorridente, mas a exceção era provavelmente minha culpa. Obrigado por tudo nestes 5 anos.

Ao Diogo. Mestrando quando eu ainda era estagiário, não à toa me refiro ao mesmo como o “Nuno do Nuno”. Procurei sempre passar adiante o que me

ensinou, assim como o prazer e dedicação à pesquisa que aprendi contigo. Um grande exemplo ao qual sou imensamente grato por ter conhecido.

À equipe do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA), por todo o companheirismo nos tantos trabalhos e eventos nos quais estivemos juntos. Júlia, Diogo, João, Geovanna, Júlio, Maria Luana, Guilherme, Laís: guardarei todos em meu coração.

A todos os estagiários do LMVPA que lá estiveram para aprender, mas ajudaram e ensinaram muito e tornaram-se grandes companheiros. Muitíssimo obrigado Alex, Laís, Marina, Sharith, Pedro e Yasmin! Podem contar comigo para o que for.

Ao pessoal do VPS, especialmente ao Sr. Danival, sempre à disposição para informar e ajudar. Vocês são incríveis!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Brasil) – Código de Financiamento 001, pelo apoio institucional ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade de São Paulo (USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio de Pesquisa Regular (Projeto Nº 2016/08018-4), fundamental para a realização das atividades de pesquisa de trabalho.

Ao Sr. Oda, Iraci Moreira, Carlão, Leonardo Jaime, Maria de Fátima, Dona Marta e Francisco Jr. pelos seus grandes feitos e inspiração.

À Dóris, inspiração para esse trabalho, assim como pela companhia e afeto.

E, especialmente, a todos os gatos que, de alguma forma, ajudaram-me a concluir essa pesquisa, todo o meu reconhecimento e respeito.

## RESUMO

PEREIRA, N.W.B. Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da leishmaniose em gatos. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

*Leishmania* spp. são protozoários parasitas causadores de doenças conhecidas como leishmanioses, estas as quais costumam consistir em grande problema à Saúde Pública em vários países, incluindo o Brasil. A forma clínica mais grave da doença, conhecida como leishmaniose visceral, é causada pelo agente etiológico *Leishmania infantum*, transmitida por vetores do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão o principal reservatório no ambiente urbano. É demonstrado que os gatos também podem ser infectados por este parasita, persistindo a infecção geralmente sem a ocorrência de manifestações clínicas, o que vem a dificultar a obtenção de dados epidemiológicos acurados. Métodos moleculares utilizados para diagnosticar a leishmaniose felina são ainda muito diversos e difíceis de serem comparados. A detecção através de amostras de suabe conjuntival tem retornado bons resultados, com a vantagem do método não ser invasivo, embora especialmente difícil de ser realizado em gatos devido ao seu comportamento intrínseco, o que torna de interesse a hipótese de se realizar procedimento diagnóstico molecular a partir de amostras de suabe oral - este já realizado com sucesso em cães. Foram coletadas amostras de suabe oral, suabe conjuntival e sangue em 100 gatos procedentes de abrigos localizados em Ilha Solteira (município pertencente ao estado de São Paulo), região endêmica para a leishmaniose visceral, para avaliar a Reação em Cadeia da Polimerase realizada a partir de amostras de suabe oral como método diagnóstico da leishmaniose felina, estabelecendo comparações com outros métodos moleculares e sorológicos, utilizados para o diagnóstico nesta espécie.

**Palavras-chave:** Suabe oral. Gatos. Diagnóstico molecular.

## ABSTRACT

PEREIRA, N.W.B. Use of oral swab for feline leishmaniasis diagnosis. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

*Leishmania* spp. are protozoan parasites that are causative agents of diseases known as leishmaniasis, which usually constitute in a major public health problem in several countries, including Brazil. The most serious clinical form of the disease, known as visceral leishmaniasis, is caused by the etiological agent *Leishmania infantum* and transmitted by vectors of the genus *Lutzomyia*, being the dog deemed as its main reservoir in the urban environment. It has been shown that cats can also be infected by this parasite, developing a persisting infection generally without occurrence of clinical signs, which renders difficult to obtain accurate epidemiological data. Molecular methods currently used to diagnose feline leishmaniasis are still very diverse between them and thus difficult to compare. Detection using conjunctival swab samples has shown good results, and there's an advantage because it is a non-invasive method although, sometimes, especially difficult to be performed in cats due to its intrinsic behavior, which favors the hypothesis of performing a molecular diagnostic procedure in cats from oral swab samples - which has already been successfully performed on dogs. Samples of oral swab, conjunctival swab and blood was collected from 100 cats living in shelters located in Ilha Solteira (municipality in the state of São Paulo), an endemic region for visceral leishmaniasis, to evaluate if Polymerase Chain Reaction performed from oral swab samples can be used as a diagnostic method for feline leishmaniasis, as well as establishing comparisons with other molecular and serological methods used for diagnosis in this species.

**Keywords:** Oral swab. Cats. Molecular diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma das amostras e resultados em testes moleculares..... 33
- Figura 2** - Foto de gato apresentando sinais clínicos e que foi positivo na PCR de suabe oral, com sequenciamento de DNA amplificado idêntico a *Leishmania infantum* ..... 34
- Figura 3** - Fotomicrografia da Citologia Aspirativa por Agulha fina (CAAF) de linfonodo de gato positivo à PCR da amostra de suabe oral..... 35
- Figura 4** - Imagem obtida com a eletroforese em gel de agarose evidenciando as bandas obtidas de amostras de suabe oral de dois gatos testados ..... 35
- Figura 5** - Imagem mostrando a curva de amplificação em qPCR ..... 36
- Figura 6** - Eletroforese de amostras oriundas de cPCR ITS-1..... 38
- Figura 7** - Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta ..... 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados dos testes moleculares realizados .....	37
<b>Tabela 2</b> - Testes de concordância.....	40
<b>Tabela 3</b> - Testes de concordância (referencial fixo) .....	44

## LISTA DE ABREVIATÓES

cPCR – PCR convencional

DPP – *Dual Path Platform*

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ITS-1 – Espaço Transcricional Interno 1

kDNA – DNA do minicírculo do cinetoplasto

LMVPA – Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada

LV – Leishmaniose Visceral

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

qPCR – PCR em tempo real

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

SC-cPCR – PCR convencional feita a partir de amostras de suabe conjuntival

SG-cPCR – PCR convencional feita a partir de amostras de sangue

SO-PCR – PCR (convencional e em tempo real) feita a partir de amostras de suabe oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1. Agente e Doença .....	15
2.2. Epidemiologia.....	15
2.3. Leishmaniose em Gatos.....	17
2.4. Métodos Diagnósticos .....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Amostras .....	27
3.2. Controles.....	28
3.3. Diagnóstico Molecular .....	28
3.3.1 Extração do DNA .....	28
3.3.2 Amplificação do DNA via PCR em tempo real .....	28
3.3.3 Amplificação do DNA via PCR convencional .....	29
3.4. Sequenciamento .....	30
3.5. Controle Endógeno do diagnóstico molecular.....	30
3.6. Diagnóstico Sorológico para <i>Leishmania</i> .....	30
3.7. Teste imunocromatográfico para FIV e FELV .....	32
3.8. Análise dos resultados .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1. Diagnóstico Molecular de amostras de suabe oral.....	32
4.2. Diagnóstico molecular utilizando as amostras de suabe conjuntival e sangue.....	36
4.3. Diagnóstico Sorológico.....	38
4.4. Comparação entre os testes diagnósticos .....	39
4.5. Sequenciamento do produto de PCR.....	41
4.6. Desempenho dos métodos utilizados.....	41
4.7. Indicadores Epidemiológicos.....	45
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças de ampla diversidade em manifestações clínicas, presente em diversos países, em alguns dos quais consiste em sério obstáculo para a Saúde Pública. Tanto o ciclo das doenças quanto os membros pertencentes à cadeia epidemiológica das mesmas são conhecidos, mas ainda não é bem compreendido o papel epidemiológico de alguns animais, como os gatos.

Diversos métodos diagnósticos, tanto moleculares quanto sorológicos, têm sido testados e reportados nos últimos anos, justificadamente, em sua maioria com foco para o diagnóstico em humanos e cães, estes últimos por serem considerados os principais reservatórios da leishmaniose visceral (LV) no meio urbano.

Dentro desse panorama, este estudo busca obter informações de interesse à epidemiologia da LV e na interferência que gatos conferem à mesma, para tanto testando a possibilidade de diagnóstico da leishmaniose felina através do uso de amostras de suabe oral, considerada tal amostragem em um método não-invasivo e de operacionalização conveniente.

Considerando as dificuldades encontradas quanto às formas de triagem, diagnóstico e controle da disseminação da doença, voltam-se os olhares ao uso de métodos menos invasivos e mais fáceis de serem aplicados em larga escala de coleta de amostras biológicas a serem utilizadas em estudos epidemiológicos. Ainda, o papel do gato na epidemiologia das leishmanioses ainda é carente em entendimento, especialmente ao se considerar o potencial que nele reside, seja pelos hábitos naturais da espécie, circulando por uma maior área, quando comparado aos cães, ou pelo caráter silencioso da transmissão da doença, uma vez que gatos portadores de *Leishmania* muito raramente demonstram sinais clínicos.

Para tanto, o presente estudo, aliando o uso de suabe oral para o diagnóstico de gatos residentes em área endêmica para a LV, assim como comparando com outros métodos diagnósticos, tenciona resultar em importante fonte de conhecimento sobre o tema, ao testar uma possibilidade ainda não explorada e que pode consistir em facilitadora para estudos futuros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Agente e Doença

Leishmanias são protozoários parasitas intracelulares de células do sistema fagocitário mononuclear, apresentando duas formas: a amastigota intracelular, observada em tecidos de hospedeiros vertebrados; e a promastigota, flagelada, encontrada no tubo digestivo de insetos flebotomíneos (BRASIL, 2016). Tais parasitas são causadores de leishmanioses, um conjunto de doenças de grande diversidade clínica e epidemiológica (DESJEUX, 2004), os quais continuam a consistir em grande problema à Saúde Pública em vários países, nestes incluindo o Brasil (DE CARVALHO; PEIXOTO; ROMERO; DE OLIVEIRA, 2017).

Em seres humanos, a leishmaniose pode apresentar três formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral (DESJEUX, 2004), sendo esta última considerada a forma mais grave, e que, nas Américas, é causada pelo agente etiológico *Leishmania infantum* e transmitida por vetores do gênero *Lutzomyia* (LAINSON; RANGEL, 2005). A enfermidade caracteriza-se por evolução crônica e envolvimento sistêmico, sendo que, se não tratada, leva à morte em 90% dos casos (MAIA-ELKHOURY; ALVES; SOUSA-GOMES; SENA *et al.*, 2008).

### 2.2. Epidemiologia

Em mamíferos, o ciclo da LV inicia-se a partir da inoculação da promastigota (forma infectante) no mamífero hospedeiro, resistindo ao seu sistema imune e sendo interiorizada por macrófagos, dentro dos quais estará protegida e apta à replicação (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; READY, 2014; SOLANO-GALLEGO; MIRÓ; KOUTINAS; CARDOSO *et al.*, 2011). Uma vez infectado, o hospedeiro torna-se reservatório da doença (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004), fato este que reforça o papel do diagnóstico como parte das medidas de maior importância para potenciais ações de saúde pública voltadas à LV (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

A LV é considerada uma zoonose de ampla distribuição geográfica e alta incidência (WHO, 2010), sendo o cão o principal reservatório no meio urbano, fazendo do diagnóstico precoce da LV canina crucial a níveis clínicos e epidemiológicos (LEDESMA; BERRIATUA; THOMAS; BERNAL *et al.*, 2017). Uma vez que a LV canina apresenta sinais clínicos inespecíficos e semelhantes a muitas outras enfermidades, sendo não incomum passar despercebida por tutores e veterinários, seu diagnóstico clínico é complexo e seu controle é de difícil execução (HIRSCHMANN; SIMON; BROD; RADIN *et al.*, 2016).

Contudo, o parasita pode ser detectado a partir de métodos moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou por métodos sorológicos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA). Há ainda o teste rápido imunocromatográfico DPP® (Dual Path Platform) (SILVA; MENDES; SANTANA; SOUZA *et al.*, 2016), este considerado atualmente o teste oficial de triagem segundo recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

Na perspectiva *One Health*, um conceito de atividade ordenada dos envolvidos na saúde humana e animal, conceito este que por definição se concentra em patógenos zoonóticos emergentes da fauna e da produção de espécies animais (DAY, 2011), temos na LV um perfeito exemplo de doença que acomete pequenos animais de companhia e para qual a prevenção e controle interfere no sofrimento de pacientes humanos e seus animais (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

Ainda faltam estudos que produzam conclusões firmes que venham a ir além da consideração apenas de flebotomíneos e cães no ciclo não-humano da doença, ou seja, mensurando e caracterizando a importância relativa de outras rotas de transmissão e outros hospedeiros. Em uma perspectiva epidemiológica e de controle, surgem questões pertinentes sobre quais seriam as importâncias relativas de cada modo de transmissão e hospedeiro distintos, assim como do quão seriam estes suficientes para manter a infecção na ausência tanto de cães quanto de flebotomíneos (QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Em geral, considera-se que a pesquisa relacionada à leishmaniose tem se focado muito em aspectos de eco-epidemiologia descritiva em detrimento dos modelos de transmissão e do conceito de controle integrado, situação esta na qual pode ser inadequado negligenciar a importância de se entender o que determina as distribuições dos fenótipos parasitários de importância para o controle regional da zoonose (READY, 2014).

No município de Ilha Solteira, SP, endêmico para a LV, foi possível observar através de ferramentas de georreferenciamento que casos de LV no município estão dispersos pela área urbana, sendo que dividindo a região em 5 setores se obteve prevalências variáveis desde 3% até 14,5%, sendo que áreas com maior densidade em ocorrência de LV canina são localizadas nas proximidades de fragmentos de vegetação natural e áreas rurais (PAULAN; SILVA; LIMA; FLORES *et al.*, 2012), em que pese que a adaptação dos vetores ao peridomicílio relativizam o papel da vegetação como fator significativo na dinâmica epidemiológica da doença (BARATA; SILVA; MAYRINK; SILVA *et al.*, 2005; PAULAN; SILVA; LIMA; FLORES *et al.*, 2012).

### **2.3. Leishmaniose em Gatos**

A leishmaniose felina causada por *Leishmania infantum* surge como doença emergente, tendo sido reportada nas últimas duas décadas cada vez mais em áreas endêmicas, bem como esporadicamente em áreas não-endêmicas tem sido observada em gatos re-domiciliados. Guardadas as devidas proporções, deve-se observar que tal emergência pode ser fruto de um aumento nos cuidados médicos aos felinos, assim como da disponibilidade de ferramentas diagnósticas mais sensíveis e de progressos no entendimento da relação e interações entre o hospedeiro, vetor e parasita (CANTACESSI; DANTAS-TORRES; NOLAN; OTRANTO, 2015; PENNISI; PERSICHETTI, 2018).

Diversas espécies de leishmanias têm sido incriminadas como agentes causadores de leishmaniose em gatos, como *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. major* e *L. infantum*, dependendo da região estudada (CAN; DÖŞKAYA; ÖZDEMİR; ŞAHAR *et al.*, 2016; PAŞA;

VARDARLI; EROL; KARAKUŞ *et al.*, 2015; PENNISI; CARDOSO; BANETH; BOURDEAU *et al.*, 2015). De fato, a infecção de gatos por espécies distintas de *Leishmania* tem sido reportada em vários países (AYLLON; TESOURO; AMUSATEGUI; VILLAESCUSA *et al.*, 2008).

Achados de diferentes espécies como causadoras reforçam que diferentes espécies de *Leishmania* podem ser encontradas em gatos e que, portanto, a identificação da espécie envolvida na infecção é primordial para o entendimento epidemiológico da doença, especialmente pelo fato de sinais clínicos não serem indicativos de leishmaniose em gatos, assim como em cães (PAŞA; VARDARLI; EROL; KARAKUŞ *et al.*, 2015).

A partir de uma revisão de casos clínicos de leishmaniose felina, percebe-se que a forma clínica é geralmente caracterizada por sinais clínicos cutâneos com disseminação visceral do parasita, presumivelmente pela ação de *L. infantum* devido à área de ocorrência, enquanto que formas estritamente cutâneas são provavelmente causadas por outras espécies de *Leishmania* (MARTÍN-SÁNCHEZ; ACEDO; MUÑOZ-PÉREZ; PESSON *et al.*, 2007).

Há, contudo, casos reportados de leishmaniose cutânea em gatos, mas causada pela *L. amazonensis*, com um quadro típico de presença de nódulos nas regiões das narinas, orelhas e dígitos, sendo que a transmissão da leishmaniose cutânea por *L. amazonensis* é atribuída ao vetor *Bichromomyia flaviscutellata*, flebotomíneo que não apresenta particular tendência a se alimentar de sangue humano (DE SOUZA; BARROS; ISHIKAWA; ILHA *et al.*, 2005).

Para um melhor entendimento se gatos podem ser considerados reservatórios da LV, é necessário elucidar se a proporção de gatos infectados com *L. infantum* é alta o suficiente para manter a infecção em áreas endêmicas, se abrigam os parasitas nos tecidos em quantidade e por período de tempo competente a estarem acessíveis aos vetores que deles se alimentam, bem como compreender quão frequentemente os vetores flebotomíneos que nos gatos se alimentem são encontrados naturalmente infectados pelo parasita (MAIA; CAMPINO, 2011).

Sabe-se que os mosquitos flebotomíneos têm o hábito de circular entre o peridomicílio e o ambiente silvestre (HARHAY; OLLIARO; COSTA; COSTA, 2011), ao passo que os gatos possuem determinadas características comportamentais que favorecem a infecção, como o predatismo noturno, o que favorece a exposição aos mosquitos, e a frequente coabitação entre gatos, cães e humanos, especificamente em áreas endêmicas (MAIA; CAMPINO, 2011; SOARES; DUARTE; SOUSA, 2016).

Preocupa à Saúde Pública a ausência de dados epidemiológicos a respeito da leishmaniose felina, tanto com respeito ao potencial zoonótico da doença quanto pelas implicações aos que desejam proteger a saúde de seus cães e gatos de estimação (SPADA; CANZI; BAGGIANI; PEREGO *et al.*, 2016). Não parece haver argumentos que coloquem o gato à parte do papel de cães na epidemiologia da doença e, nestes, a obtenção de dados epidemiológicos é crucial para o conhecimento da doença e adoção de medidas preventivas e de controle necessárias por serviços de vigilância de saúde, sobretudo ao se considerar que animais sem sinais clínicos ou com poucos sinais clínicos disseminam silenciosamente a doença (HIRSCHMANN; SIMON; BROD; RADIN *et al.*, 2016).

Pelo desafio representado pelo diagnóstico da leishmaniose, o que não se deve exclusivamente a aspectos pertinentes à acurácia dos métodos, mas também pela difícil operacionalização, clama-se por uma reflexão sobre controle baseado em múltiplas ações (ROMERO, 2016), o que traz consigo a lembrança de não serem os cães e humanos os únicos reservatórios no meio urbano. A falta de um método de diagnóstico acurado para a leishmaniose felina em áreas endêmicas pode implicar no animal continuar sendo um potencial reservatório para *Leishmania infantum* (AKHTARDANESH; KHEIRANDISH; SHARIFI; MOHAMMADI *et al.*, 2018).

Não há consenso se a baixa prevalência de infecção e doença em gatos habitantes de áreas endêmicas se deve à subnotificação ou ao fato de gatos possuírem alta resistência ao parasita (VITA; SANTORI; AGUZZI; PETROTTA *et al.*, 2005). Diferenças em prevalências reportadas podem ser influenciadas por determinantes tais como diferenças nas populações estudadas, características geográficas e efeitos associados às técnicas utilizadas, como

pontos de corte ou limiares para positividade (SPADA; CANZI; BAGGIANI; PEREGO *et al.*, 2016).

Em estudo realizado nas ilhas Líparas, localizadas na Itália, ambiente considerado ideal para entender a dinâmica da transmissão de patógenos e vetores, encontrou-se uma prevalência de LV de 25,8% em gatos e 41,8% em cães, esta diferença é significativa e de acordo com outros estudos. Contudo, em termos absolutos esta prevalência em gatos é relativamente alta, o que indica que tais animais estão tão expostos quanto cães ao risco de infecção, podendo a diferença relativa ser explicada por diferenças no sistema imune destas espécies e ao fato de a polarização da resposta imunológica Th1 ser mais eficiente em gatos quando comparada à dos cães (OTRANTO; NAPOLI; LATROFA; ANNOSCIA *et al.*, 2017).

Mesmo ainda considerados como hospedeiros incomuns de *Leishmania*, gatos apresentando leishmaniose têm sido mais frequentemente reportados, o que incentiva a realização de estudos a respeito do papel do animal no ciclo da doença, uma vez que estão constantemente expostos aos vetores e não recebem medidas profiláticas consideráveis (REIF, 2011).

Alguns desses estudos focam na transmissibilidade do parasita destes animais para flebotomíneos; a infecção de *Phlebotomus perniciosus* já foi demonstrada experimentalmente, reforçando a tese de que gatos podem ser um hospedeiro adicional para a leishmaniose, em experimento visando endereçar dúvidas sobre o papel epidemiológico controverso dos gatos e a exclusividade de medidas para controlar a doença sendo relacionadas aos cães (MAROLI; PENNISI; DI MUCCIO; KHOURY *et al.*, 2007).

Foi também demonstrada a transmissão experimental de *L. infantum* de gatos para flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis*, o que confirma também a presença do parasita na pele de gatos infectados, como indicado por estudos de xenodiagnóstico. Ainda, pela habilidade do animal em infectar o hospedeiro invertebrado natural da doença no Brasil, pode-se inferir que os gatos participem do ciclo de transmissão do parasita, ainda que seja desconhecido em qual proporção (DA SILVA; RABELO; DE FIGUEIREDO GONTIJO; RIBEIRO *et al.*, 2010).

Em estudo realizado na Espanha, quanto às preferências alimentares de *Phlebotomus*, através de métodos moleculares, foi encontrado sangue de gatos em 3.57% das fêmeas de flebotomíneos estudadas, sendo os felinos encontrados em número apenas inferior ao de coelhos e lebres, muito acima de humanos (0,97%) e cães (0,33%) (GONZÁLEZ; JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ; MARTÍN-MARTÍN *et al.*, 2017).

Enquanto ainda apresentam-se escassos os estudos que elucidem a importância de determinadas rotas de infecção e o papel de determinados reservatórios (QUINNELL; COURTENAY, 2009), entre os quais os gatos (MANCIANTI, 2004; PENNISI; CARDOSO; BANETH; BOURDEAU *et al.*, 2015), sobretudo os errantes, por não receberem o devido cuidado veterinário e poderem ser fonte de patógenos para vetores (DIAKOU; DI CESARE; ACCETTURA; BARROS *et al.*, 2017), é de interesse um monitoramento e controle deste hospedeiro.

#### **2.4. Métodos Diagnósticos**

Apesar dos avanços obtidos na área diagnóstica nos últimos anos, tanto por métodos sorológicos (PEIXOTO; DE OLIVEIRA; ROMERO, 2015) quanto pelos moleculares (FRANCINO; ALTET; SANCHEZ-ROBERT; RODRIGUEZ *et al.*, 2006), o diagnóstico de infecções representa um desafio pela difícil operacionalização em larga escala (ROMERO, 2016), sendo um dos fatores limitantes a coleta de material, a qual pode ser especialmente difícil em gatos (HILLE; MÖBIUS; AKMATOV; VERSPOHL *et al.*, 2014), embora possa ser facilitada pelo uso de amostras de suabe oral para o diagnóstico molecular (ASCHAR; DE OLIVEIRA; LAURENTI; MARCONDES *et al.*, 2016).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo um teste diagnóstico confiável devido à rapidez e acurácia em identificar as espécies infectantes (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015), é frequentemente utilizada como teste primário em hospitais de referência e centros de pesquisa (READY, 2014).

O desenvolvimento de técnicas de PCR melhorou consideravelmente a sensibilidade na identificação de *Leishmania* em cães (GOMES; CAVALCANTI;

LIRA; ABATH *et al.*, 2008; MIRÓ; CARDOSO; PENNISI; OLIVA *et al.*, 2008), mostrando que a prevalência da infecção em áreas endêmicas é maior que a quantidade de animais sintomáticos, bem como com relação ao sugerido de acordo com resultados de técnicas sorológicas (ASHFORD; BOZZA; FREIRE; MIRANDA *et al.*, 1995; BERRAHAL; MARY; ROZE; BERENGER *et al.*, 1996; CABRAL; O'GRADY; GOMES; SOUSA *et al.*, 1998; MENDONÇA; BATISTA; WERNECK; SOARES *et al.*, 2017; SOLANO-GALLEGO; MORELL; ARBOIX; ALBEROLA *et al.*, 2001).

Com efeito, a PCR tem sido importante para a detecção de *Leishmania* em amostras de aspirados esplênicos, aspirados de medula óssea, aspirados de linfonodos, pele, sangue total, camada leucoplaquetária do sangue e suabe conjuntival (DE OLIVEIRA; DE FATIMA MADEIRA; OLIVEIRA; PACHECO, 2015; FRANCINO; ALTET; SANCHEZ-ROBERT; RODRIGUEZ *et al.*, 2006; HOSSAIN; GHOSH; KHAN; DUTHIE *et al.*, 2017; KHATUN; ALAM; KHAN; HOSSAIN *et al.*, 2017; LOPES; SEVÁ; FERREIRA; NUNES *et al.*, 2017; RAMPAZZO; DA SILVA SOLCÀ; SANTOS; DE NOVAES PEREIRA *et al.*, 2017; TRAJANO-SILVA; PESSOA-E-SILVA; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE; MORAIS *et al.*, 2017).

Em gatos, já foi demonstrada a identificação do parasita por meio de PCR em amostras de sangue (AKHTARDANESH; SHARIFI; MOHAMMADI; MOSTAFAVI *et al.*, 2017; CAN; DÖŞKAYA; ÖZDEMİR; ŞAHAR *et al.*, 2016; PAŞA; VARDARLI; EROL; KARAKUŞ *et al.*, 2015), aspirados de linfonodos (METZDORF; JUNIOR; MATOS; DE SOUZA FILHO *et al.*, 2017) e suabe conjuntival (BENASSI; BENVENGA; FERREIRA; PEREIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA; PEREIRA; BENVENGA; MARTIN *et al.*, 2015).

Em estudo realizado com cães testando o diagnóstico molecular a partir de amostras de suabe oral, nasal e conjuntival, devido aos altos índices de positivos, todos estes métodos de coleta foram considerados de alto potencial, sendo reputados como semelhantes aos de amostras coletadas invasivamente. Visando facilitar a coleta de materiais com fins diagnósticos, é preferível o uso de amostras não invasivas, uma vez que se preza pela rapidez e ausência de dor ao animal. O uso de amostras não-invasivas é considerado ideal pelo fato de as mesmas serem altamente práticas e teoricamente justificadas pela alta

proliferação celular e exfoliação sofrida pelas respectivas mucosas, embora, no caso do suabe conjuntival, muitos animais rejeitam o procedimento, pelo qual está também sujeito a lesões na córnea (ASCHAR; DE OLIVEIRA; LAURENTI; MARCONDES *et al.*, 2016; FERREIRA; ALMEIDA; SILVA; VOGAS *et al.*, 2013).

Adotado o suabe conjuntival como referência, devido a resultados promissores obtidos anteriormente, obteve-se resultados inferiores aos de amostras obtidas através de aspirado da medula óssea, mas a partir de combinações com outras amostras não-invasivas alcança-se resultados estatisticamente semelhantes aos de amostras invasivas, chegando-se à recomendação do teste diagnóstico a partir de duas amostras oculares e duas amostras nasais para triagem em cães, enquanto que o suabe oral por si só foi considerado como equivalente em resultados com relação às amostras de medula óssea, o que soma-se à sua praticidade para configurar o mesmo como um método de muita utilidade. Vale ainda mencionar que misturar tais amostras em uma única vem a aumentar a sensibilidade (FERREIRA; ALMEIDA; SILVA; VOGAS *et al.*, 2013). A falta de consenso quanto à amostra biológica a ser utilizada ocorre, principalmente, por diferenças decorrentes do estadiamento clínico do animal (MONTEIRO; MACHADO; ROCHA-SILVA; ASSUNÇÃO *et al.*, 2019).

Ainda que tenham ocorrido muitos avanços nas áreas de diagnóstico e controle, o principal desafio ainda é o de traduzir estes novos conhecimentos em medidas de controle efetivas e de custo aceitável, assim como aumentar a acessibilidade às mesmas (DESJEUX, 2004).

Em estudo realizado sobre a amostragem feita por proprietários, constatou-se que, para donos de cães e gatos, é factível a coleta de amostras de fezes, pêlos e suabes oral e nasal realizadas sem auxílio veterinário, pelos mesmos proprietários, em ambiente doméstico, obtendo ótima resposta em retorno de amostras pelos mesmos quando solicitado, assim como ausência de relatos dos mesmos quanto a problemas na realização da amostragem (HILLE; MÖBIUS; AKMATOV; VERSPOHL *et al.*, 2014).

A boa aceitação pode ser explicada por tais amostragens consistirem em demandas de fácil aplicação, gerenciáveis, sem a necessidade de investimento de muito tempo por parte dos proprietários e, apesar da dificuldade relativa da coleta de algumas amostras como as de suabes nasais, o que é de certa forma desagradável para o próprio animal por ser esta uma região altamente sensível em gatos, proprietários de modo geral relatam e apreciam a não-necessidade de um profissional veterinário para a amostragem de suabes orais, configurando aspecto participativo e redutor de custos (MÖBIUS; HILLE; VERSPOHL; WEFSTAEDT *et al.*, 2013).

Em gatos, foi demonstrado que leishmanias podem infectar e persistir em gatos aparentemente saudáveis e sem sinais clínicos, dificultando a obtenção de dados epidemiológicos acurados, especialmente em áreas previamente consideradas livres de leishmanioses, nas quais não se realizou inquérito epidemiológico incluindo essa espécie animal (SPADA; CANZI; BAGGIANI; PEREGO *et al.*, 2016). A literatura classifica os gatos como reservatórios de *Leishmania*, sem que haja uma decisão final sobre a classificação dos mesmos na epidemiologia do parasita (SOARES; DUARTE; SOUSA, 2016) como reservatórios primários ou secundários (QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Assim, faz-se de interesse o desenvolvimento de alternativas diagnósticas eficazes em detectar o parasita em gatos, sobretudo após o desenvolvimento das técnicas diagnósticas as quais permitiram uma maior documentação de casos de leishmaniose felina (PENNISI; CARDOSO; BANETH; BOURDEAU *et al.*, 2015).

Foi reportado que, para o uso de amostras de suabe oral em cães sem lesões orais aparentes (LOMBARDO; PENNISI; LUPO; MIGLIAZZO *et al.*, 2012), pôde ser detectado o DNA de *Leishmania*, com a ressalva de o método, se empregado isoladamente, não ter sido suficientemente sensível. A despeito da aparente limitação, o mesmo autor sugere uma implicação epidemiológica em tal achado, uma vez que sugere a possibilidade de transmissão através de mordedura.

A detecção através de suabe conjuntival é bastante interessante em gatos, sobretudo pelo método não ser invasivo (BENASSI; BENVENGA; FERREIRA; PEREIRA *et al.*, 2017), mas os métodos moleculares utilizados para diagnosticar a leishmaniose felina são ainda muito divergentes, inclusive quanto aos protocolos e reagentes utilizados e, portanto, difíceis de serem comparados entre si (OTRANTO; NAPOLI; LATROFA; ANNOSCIA *et al.*, 2017).

Em face da ocorrência de casos de leishmaniose canina em áreas livres de vetores, o que sugere a transmissão através do contato direto, contato com lesões mucosas, trocas sanguíneas, acasalamento ou mordedura (SCHANTZ; STEURER; DUPREY; KURPEL *et al.*, 2005; SLAPPENDEL; TESKE, 1999), a possível presença do parasita em suabe oral de felinos pode adquirir importância epidemiológica inédita, além de servir como método diagnóstico de coleta fácil e não invasiva, podendo até ser realizada pelos próprios tutores, desde que com o devido treinamento, representando uma boa maneira de reduzir custos e contribuir para a saúde pública (MÖBIUS; HILLE; VERSPOHL; WEFSTAEDT *et al.*, 2013).

As aplicações do PCR em tempo real (qPCR) na detecção e quantificação de espécies de *Leishmania* representam um grande avanço em termos de automação, rendimento, rapidez e alta sensibilidade, mas ainda falta estudos quanto à padronização dos ensaios para simultaneamente estimar a carga parasitária e identificar espécies de *Leishmania*, 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; CECCARELLI; DIOTALLEVI; MENOTTA *et al.*, 2018).

Há, ainda, algumas limitações relacionadas às técnicas moleculares as quais merecem menção, como a ocorrência de falsos negativos devido ao uso de amostras inadequadas, presença de inibidores residuais devido a erros em protocolos de extração e erros de armazenamento (TRAJANO-SILVA; PESSOA-E-SILVA; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE; MORAIS *et al.*, 2017).

Existe ampla literatura a respeito do uso de qPCR para diagnóstico da leishmaniose canina, sendo possível a quantificação da carga parasitária de forma precisa e considerada ferramenta útil para confirmação diagnóstica em casos nos quais a sorologia é inconclusiva, ou que o animal ainda não sofreu soroconversão ou até mesmo para monitorar o a eficácia de um tratamento, seja fazendo uso de amostras de aspirados de linfonodo, medula óssea, sangue (MARTÍNEZ; QUILEZ; SANCHEZ; ROURA *et al.*, 2011), suabe conjuntival e suabe oral (LOMBARDO; PENNISI; LUPO; MIGLIAZZO *et al.*, 2012).

No caso dos gatos foi recentemente realizado com qPCR utilizando amostras de sangue e suabe conjuntival (BENASSI; BENVENGA; FERREIRA; PEREIRA *et al.*, 2017), fazendo uso de protocolo adaptado de ensaio TaqMan™, baseado nesta sonda e tendo como alvo o DNA do minicírculo do cinetoplasto, sendo tal ensaio reportado previamente como efetivo no diagnóstico e quantificação de carga parasitária em cães (FRANCINO; ALTET; SANCHEZ-ROBERT; RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Para estabelecer um número mínimo de parasitas que podem ser detectados por um ensaio de qPCR, realiza-se a diluição de DNA extraído de cultura *in vitro* de promastigotas de *Leishmania*, sendo que a realização das curvas para cada das diluições permite futura mensuração da carga parasitária analisada em amostras diagnósticas (HOSSAIN; GHOSH; KHAN; DUTHIE *et al.*, 2017). O uso da ferramenta do qPCR permite também uma alta reprodutibilidade dos resultados através da estimativa de valores de limiar do ciclo (Ct), desvios-padrão e coeficiente de variação intra-ensaio (VERMA; KUMAR; KATARA; SINGH *et al.*, 2010).

Ainda que com todas as vantagens do uso de qPCR, aparentemente melhorando a sensibilidade do diagnóstico da LV, há as dificuldades de operacionalização em serviços de saúde pública e a necessidade de validação e padronizações que venham a reduzir a variação e alcançar maior reprodutibilidade (LOPES; SEVÁ; FERREIRA; NUNES *et al.*, 2017). Há, ainda, a vantagem da possibilidade de realização de análise de curvas de *melting* como método rápido para a identificação de espécies em estudos diagnósticos e epidemiológicos, permitindo a análise de sequências de nucleotídeos no

próprio experimento de qPCR que analisa a carga parasitária (GOMES; CAVALCANTI; LIRA; ABATH *et al.*, 2008).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostras**

Foram utilizadas amostras de suabe oral, conjuntival e sangue obtidas em 100 gatos que vivem em dois abrigos para animais localizados no município de Ilha Solteira (SP), região endêmica para leishmaniose e situada na Mesorregião de Araçatuba, localizado a uma latitude 20°38'44" Sul e a uma longitude 51°06'35" Oeste, em uma altitude de 335 metros a nível do mar. Para a coleta de todas as amostras biológicas mencionadas a seguir, obteve-se autorização dos responsáveis pelos abrigos através de termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1).

Para a coleta dos suabes oral e conjuntival foram utilizados suabes estéreis, sendo que para o suabe oral foram raspados ambos os lados da cavidade oral e para o suabe conjuntival as duas conjuntivas oculares. O DNA extraído foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL livres de enzimas e armazenados em freezer para preservação.

Para a coleta de amostras de sangue, os gatos foram capturados com puçá e contidos quimicamente através de anestesia dissociativa (11 mg/kg de cetamina e 1,1 mg/kg de xilazina, associados), submetidos a tricotomia, lavagem e antissepsia da área a ser puncionada através de álcool iodado. Foram coletados 5 mL de sangue pela veia jugular, para então 3 mL do material ser armazenado a 4°C em tubos a vácuo com o anticoagulante EDTA para a realização de PCR e 2 mL em tubos de coleta a vácuo com ativador de coágulo, este para a obtenção de soro imune com fins à realização de RIFI.

Para todos os animais com amostras coletadas, foram obtidas informações através de anamnese e sobre a presença ou não de sinais clínicos como alopecia, condições de escore corporal, palpação de linfonodos e presença e localização de lesões, em dados preenchidos em prontuário próprio para tal (ANEXO 2).

### 3.2. Controles

Como controles positivos das reações de PCR foram utilizadas amostras padrão de DNA de *Leishmania (L.) infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedidas pelo Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, e para o controle negativo foi utilizada água deionizada estéril

Já os controles positivos e negativos utilizados nos testes sorológicos consistiram em amostras de gatos sabidamente positivos e negativos, respectivamente, pertencentes estas ao acervo do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA) da FZEA /USP.

### 3.3. Diagnóstico Molecular

#### 3.3.1 Extração do DNA

As extrações do DNA de amostras de suabe oral e conjuntival foram realizadas através de protocolo modificado da técnica *salting out*, descrita em literatura (LAHIRI; NURNBERGER JR, 1991), sendo que por conveniência foi também realizada a extração de algumas amostras através do uso do kit DNA Isolation Kit for Blood & Tissues (Qiagen, USA), este último fazendo uso de protocolo fornecido pelo fabricante. O kit supracitado foi também utilizado para a extração de todas as amostras de sangue.

#### 3.3.2 Amplificação do DNA via PCR em tempo real

A amplificação do DNA extraído do sangue, suabe conjuntival e suabe oral foi executada através de qPCR de acordo com a técnica descrita por em experimento descrito anteriormente (FRANCINO; ALTET; SANCHEZ-ROBERT; RODRIGUEZ *et al.*, 2006), fazendo uso da sonda TaqMan™ (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-BHQ-1) para a detecção de segmento conservado do minicículo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania infantum*, bem como dos oligonucleotídeos LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3'), estas pequenas modificações para a adaptação dos ensaios com a sonda TaqMan™ dos oligonucleotídeos

13A (5'– GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3') e 13B (5'– ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'), desenvolvidos para regiões conservadas dos minicírculos do cinetoplasto (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990).

Para a reação de qPCR descrita acima utilizou-se o kit LightCycler™ 480 Probes Master (Roche®, Life Science, Brasil) no volume de 20 µL, sendo 10 µL de concentrado PCR Mix contendo FastStart™ Taq DNA Polymerase, tampão de reação, dNTP mix e 6,4 nM de MgCl<sub>2</sub>, 1,8 µL de cada oligonucleotídeo (900 nM de cada), 0,4 µL de sonda (200 nM) e 1 µL de amostra. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador LightCycler 480 II (Roche Diagnosis, Mannheim, Alemanha) nos ciclos que seguem: 95° C (10 min) para a pré-incubação; 50 ciclos a 95°C por 15 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 segundo, estas como ciclos de amplificação e aquisição de fluorescência emitida configurada para a fase de extensão.

### 3.3.3 Amplificação do DNA via PCR convencional

Com fins de testar as amostras através de PCR convencional (cPCR) e de preparar amostras positivas pelo qPCR para serem sequenciadas para confirmação da presença e distinção da espécie de *Leishmania* encontrada, foi realizada a amplificação do DNA através do uso dos primers LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e LS8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), estes pertencentes à região genômica situada entre os genes 18S rRNA e 5.8S rRNA do parasita, sendo o procedimento chamado ITS1-PCR e partir do qual é esperada a amplificação, em amostra positiva, de fragmento no tamanho de 350 a 400 pares de bases (EL TAI; OSMAN; EL FARI; PRESBER *et al.*, 2000; SALLOUM; KHALIFEH; TOKAJIAN, 2016), que foi submetido ao sequenciamento para identificação da espécie de *Leishmania*.

Outro protocolo de cPCR utilizado, direcionado à amplificação de fragmentos do DNA do minicírculo (kDNA), alvo muito utilizado devido à presença de quantidade considerável de cópias-alvo no genoma de leishmanias, consiste no emprego dos primers 13A (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3') e 13B (5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'), conforme descrito na literatura (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990).

### 3.4. Sequenciamento

Após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, os produtos de PCR foram retirados do gel e purificados usando o kit Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare, New York, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando 20 ng/ul de produto purificado da PCR e 5µM de cada primer. As amostras foram enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Instituto Biológico (IB) da Universidade de São Paulo (USP).

A sequência consenso obtida após o alinhamento dos primers foi submetida ao BLAST para o alinhamento de sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

### 3.5. Controle Endógeno do diagnóstico molecular

Foram utilizados genes de referência (beta actina) através de reação de qPCR com a finalidade de garantir que as amostras testadas continham, de fato, DNA de animais mamíferos, ou seja, assegurando que resultados negativos sejam devidos ao fato de serem negativos para o teste, que é a detecção de *Leishmania*, e não à ausência total de DNA nas amostras coletadas.

Para tanto, foram realizadas reações com todas as 100 amostras de suabe oral coletadas segundo protocolo presente em literatura (MANNA; REALE; VIOLA; VITALE *et al.*, 2006) e conduzidas através do uso do kit FastStart Universal Probe Master (Roche, Life Science, Brasil) no mesmo aparelho LightCycler® 480 System mencionado anteriormente.

### 3.6. Diagnóstico Sorológico para *Leishmania*

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi efetuada segundo recomendações (CAMARGO, 1966), fazendo uso de conjugado espécie-específico (Anti-feline-IgG FITC, Sigma®, USA) e considerando-se positivas

amostras de soro com titulação igual ou maior que 1:40, segundo recomendações. Alguns autores e instituições como a LeishVet, contudo, recomendam que o ponto de corte para considerar uma amostra positiva seja na diluição 1:80 (PENNISI; CARDOSO; BANETH; BOURDEAU *et al.*, 2015), razão pela qual esta última diluição também será comparada com outros testes neste estudo.

Microplacas foram utilizadas para as amostras em diluição inicial 1:40 consistindo de 78  $\mu$ L de solução de PBS 0,01M, pH 7,2, e 2  $\mu$ L do soro do animal a ser testado. O mesmo é feito com os controles positivo e negativo. Em lâminas Immunodot® com o antígeno fixado (formol 4%) para o diagnóstico in vitro de *Leishmania infantum*, é distribuído 10  $\mu$ L deste soro na diluição 1:40, para então ser acondicionado em câmara úmida e incubado em estufa de incubação na temperatura de 37°C durante 30 minutos, após os quais as lâminas são lavadas três vezes com PBS 0,01M por 5 minutos e posteriormente secadas em estufa.

O conjugado espécie-específico foi diluído segundo título pré-estabelecido em solução de Azul de Evans a 20%, sendo o qual previamente diluído em PBS na proporção de 1:10. Após distribuídos 10  $\mu$ L do conjugado para cada diluição, repete-se respectivamente a incubação e a lavagem com PBS nas mesmas condições supracitadas.

Realizada a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8.5, e cobertas com lamínulas de 24x60 mm. Os soros positivos na diluição 1:40 foram também avaliados em diluições maiores (1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-Leishmania.

Para a visualização e leitura das amostras foi utilizado microscópio de fluorescência modelo Zeiss Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) na objetiva de 40x.

### **3.7. Teste imunocromatográfico para FIV e FELV**

Todos os animais foram também testados para detecção dos vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV), uma vez que estas doenças apresentam sinais clínicos parecidos àqueles reportados para a leishmaniose felina. Foi utilizado o teste imunocromatográfico de fluxo bidirecional (SNAP® Combo IDEXX), nas orientações fornecidas pelo fabricante.

### **3.8. Análise dos resultados**

Os resultados obtidos através da PCR a partir de amostras de suabe oral (SO-PCR) foram comparados com aqueles obtidos através de suabe conjuntival (CS-cPCR), sangue (SG-cPCR) e RIFI, mensurando a concordância segundo teste de kappa Cohen ajustado, sendo a concordância avaliada em nenhuma ( $k < 0$ ), leve ( $0 < k < 0.2$ ), razoável ( $0.2 < k < 0.4$ ), moderada ( $0.4 < k < 0.6$ ), substancial ( $0.6 < k < 0.8$ ) e quase perfeita ( $0.8 < k < 1$ ) (COHEN, 1960; LANDIS; KOCH, 1977).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

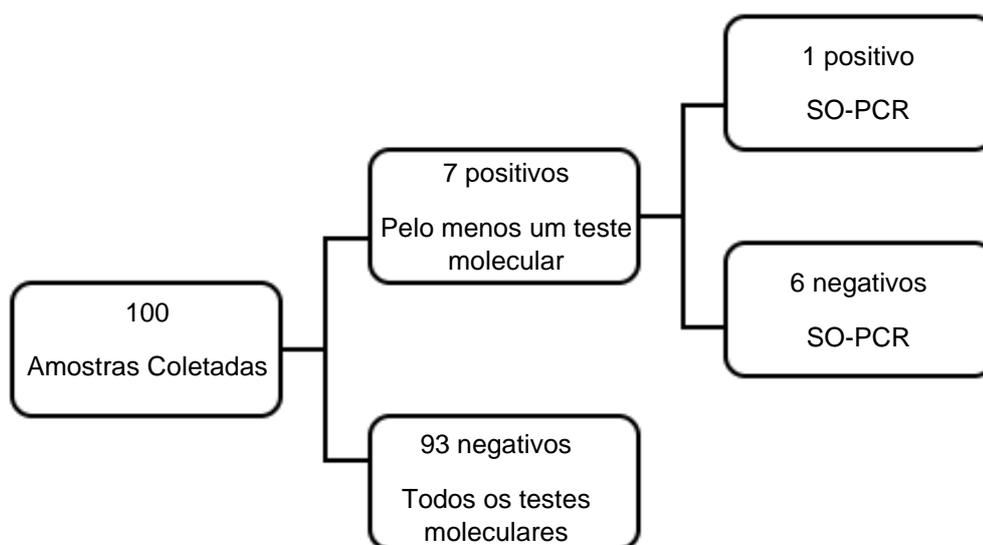
### **4.1. Diagnóstico Molecular de amostras de suabe oral**

Amostras de suabe oral de todos os 100 animais provenientes de área endêmica foram submetidas à extração de DNA, sendo todas positivas no teste da Beta actina realizado através de qPCR, e posteriormente testadas tanto por PCR convencional quanto *real time*. Foi encontrado apenas um animal positivo em ambas as PCR convencionais e qPCR realizadas para amostras de suabe oral (SO-PCR).

Com relação ao teste de amostras obtidas a partir de outros métodos de coleta, para todos os animais foram realizados ensaios de PCR convencional (cPCR) de amostras de sangue (SG-cPCR) e suabe conjuntival (SC-cPCR), tanto fazendo uso dos primers 13A/13B quanto utilizando o ITS1, culminando no achado de sete resultados positivos ( $7/100 = 7\%$ ). Os resultados descritos

estão esquematizados no fluxograma a seguir (Figura 1). Todos os 93 animais negativos pelo cPCR das amostras de sangue e suabe conjuntival apresentaram-se também negativos na amostra de suabe oral, seja pelo PCR *real time* ou convencional.

**Figura 1** - Fluxograma das amostras e resultados em testes moleculares



Fonte: (PEREIRA, 2020)

Quanto ao animal positivo em amostra de suabe oral, o mesmo apresentou ao exame clínico perda de peso, lesões no focinho e na pele de algumas regiões da cabeça e membros (Figura 2). Também foi detectada linfadenomegalia do linfonodo poplíteo, do qual foi obtida amostra por citologia aspirativa. Em teste RIFI foi verificado resultado positivo até a diluição 1:80. Testes diagnósticos para leucemia felina e imunodeficiência felina retornaram resultado negativo.

**Figura 2** - Foto de gato apresentando sinais clínicos e que foi positivo na PCR de suabe oral, com sequenciamento de DNA amplificado idêntico a *Leishmania infantum*

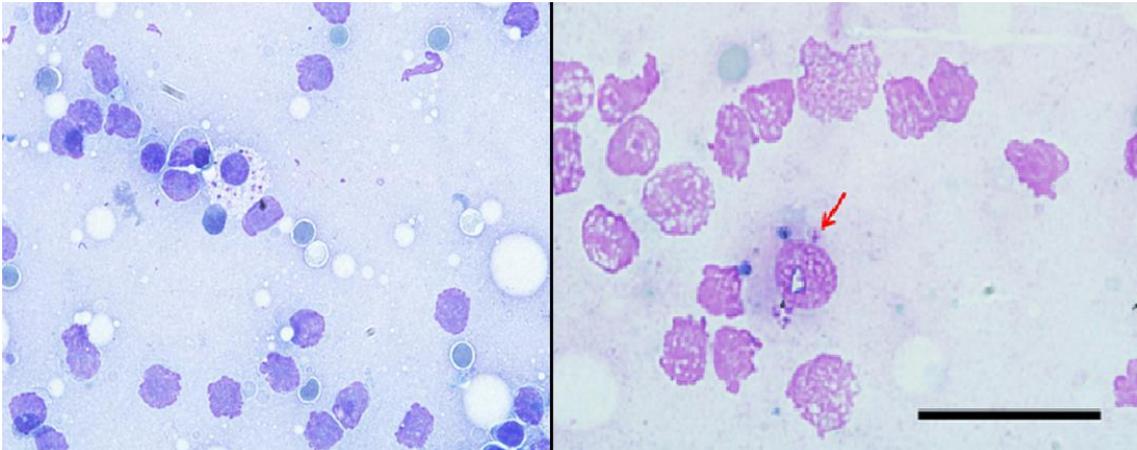


Fonte: Arquivo do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA)

Legenda: Imagens demonstrando lesões na cabeça (A), presença de lesão mucocutânea ulcerativa no focinho e lábio superior direito (B, D) e no corpo (C).

Todos os testes diagnósticos para leishmaniose realizados nesse gato, a saber, exame citológico de aspirado do linfonodo poplíteo (Figura 3), RIFI e PCR fazendo uso de suabe conjuntival, sangue e suabe oral, foram positivos, sendo para a amostra de suabe oral demonstrados nas figuras abaixo seus resultados, respectivamente, a eletroforese em gel de agarose do produto da PCR convencional através do uso dos *primers* da região ITS-1 (Figura 4) e a curva de fluorescência obtida a partir da PCR em tempo real (Figura 5). Sequenciamento realizado a partir do produto de PCR identificou DNA de *Leishmania infantum*, fita consenso em códigos com 100% de identidade segundo o GenBank®: KY379078.1; KY379077.1; KY379075.1.

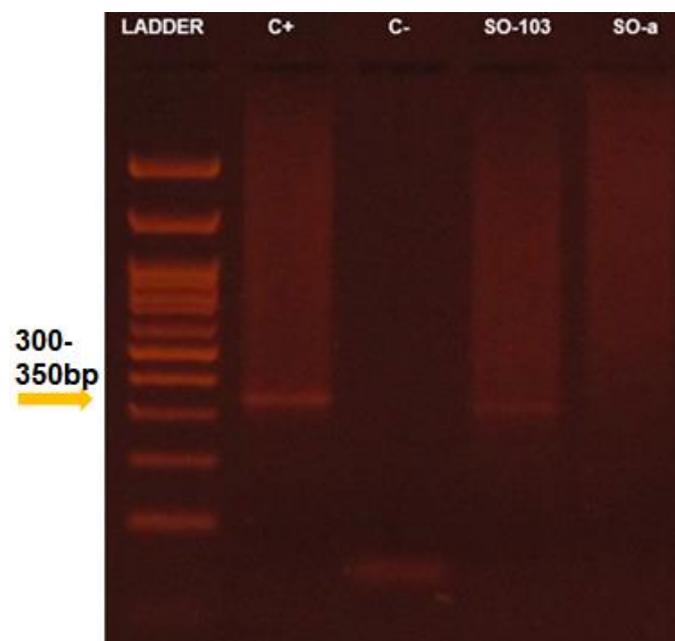
**Figura 3** - Fotomicrografia da Citologia Aspirativa por Agulha fina (CAAF) de linfonodo de gato positivo à PCR da amostra de suabe oral



Fonte - Arquivo do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA)

Legenda: Aspirado de linfonodo poplíteo. A seta aponta para a presença de amastigotas de *Leishmania* no interior de um macrófago. Coloração Panótico, aumento 1000x.

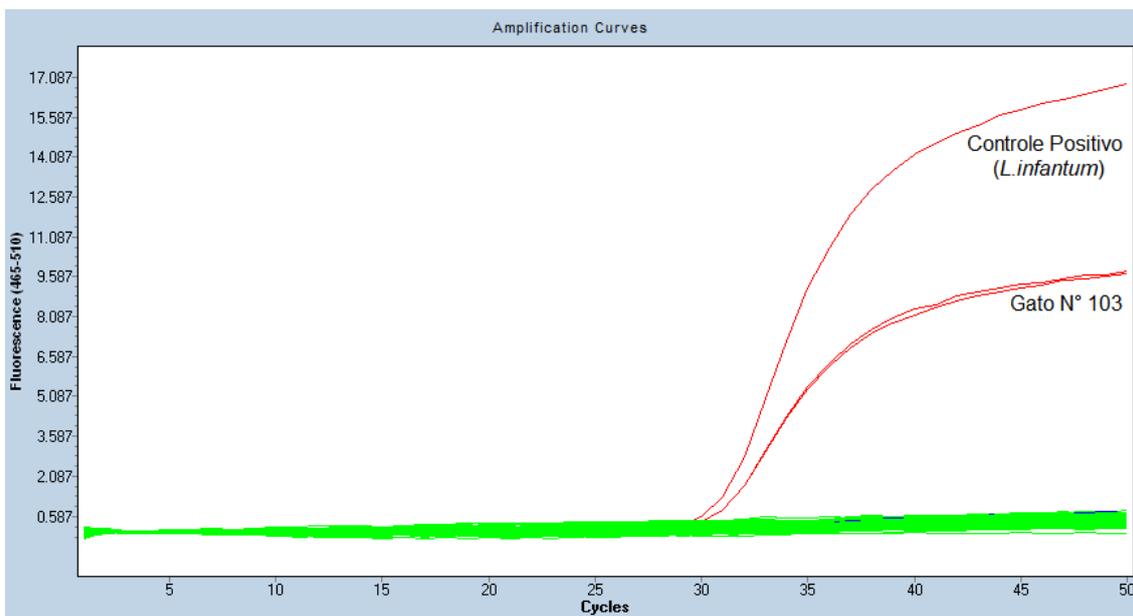
**Figura 4** - Imagem obtida com a eletroforese em gel de agarose evidenciando as bandas obtidas de amostras de suabe oral de dois gatos testados



Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: Imagem das bandas obtidas através de eletroforese em gel de agarose do produto de PCR ITS-1 mostrando o ladder 100 bp K9-100I Kasvi, controle positivo (C+), controle negativo (C-) e resultados do DNA extraído do suabe oral de dois gatos amostrados, sendo o primeiro positivo (SO-103) e o segundo negativo (SO-a).

**Figura 5** - Imagem mostrando a curva de amplificação em qPCR



Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: Resultado da qPCR realizada com amostras de DNA extraído de suabe oral dos gatos amostrados evidenciando apenas um gato positivo (Gato N°103) e curva do controle positivo utilizado (*Leishmania (L.) infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, Fiocruz).

#### 4.2. Diagnóstico molecular utilizando as amostras de suabe conjuntival e sangue

Entre os 100 animais testados, 93 dos mesmos foram considerados negativos através da realização de testes moleculares a partir de PCR convencional fazendo uso de amostras de sangue. Os 7 animais positivos, contudo, não apresentaram resultados similares em função do alvo da amplificação, sendo que todos estes foram positivos pela PCR feita através dos *primers* da região ITS-1, mas apenas cinco ( $5/7 = 71,43\%$ ) foram positivo pelos *primers* 13A/13B; um desses cinco se trata do mesmo animal apresentado no item anterior como positivo para *Leishmania infantum* através de PCR realizado com uso de amostra de suabe oral.

Nos testes realizados com amostras de suabe conjuntival, apenas os mesmos 5 dos 100 animais supracitados foram considerados positivos, tanto pelos *primers* da região ITS-1 quanto pelos *primers* 13A/13B.

Tais resultados encontram-se demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Resultados dos testes moleculares realizados

Gato	Suabe Oral		Sangue		Suabe Conjuntival		
	qPCR	ITS-1 cPCR	13A/13B cPCR	ITS-1 cPCR	13A/13B cPCR	ITS-1 cPCR	13A/13B cPCR
102				X	X		X
103	X	X	X	X	X	X	X
104				X	X		X
105				X	X		X
178				X			
196				X			
241				X	X	X	X

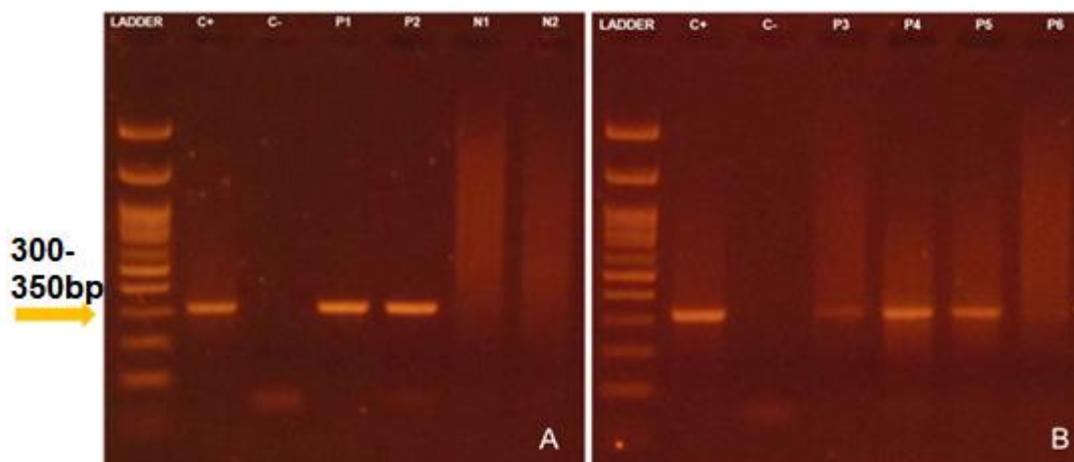
Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: A Tabela mostra as PCRs realizadas nas diferentes amostras clínicas coletas nos gatos; X corresponde aos resultados positivos de cada gato.

Amostras de SG-cPCR fazendo uso dos *primers* da região ITS-1 foram enviados para sequenciamento, sendo indenticada a presença de DNA de *Leishmania infantum* em cinco animais (a saber, animais 102, 103, 104, 105 e 241). Quanto aos demais, os amplificados não obtiveram qualidade requerida para um sequenciamento adequado.

Algumas das bandas obtidas através de eletroforese do produto das reações de PCR convencional seguem, abaixo (Figura 6).

**Figura 6** - Eletroforese de amostras oriundas de cPCR ITS-1



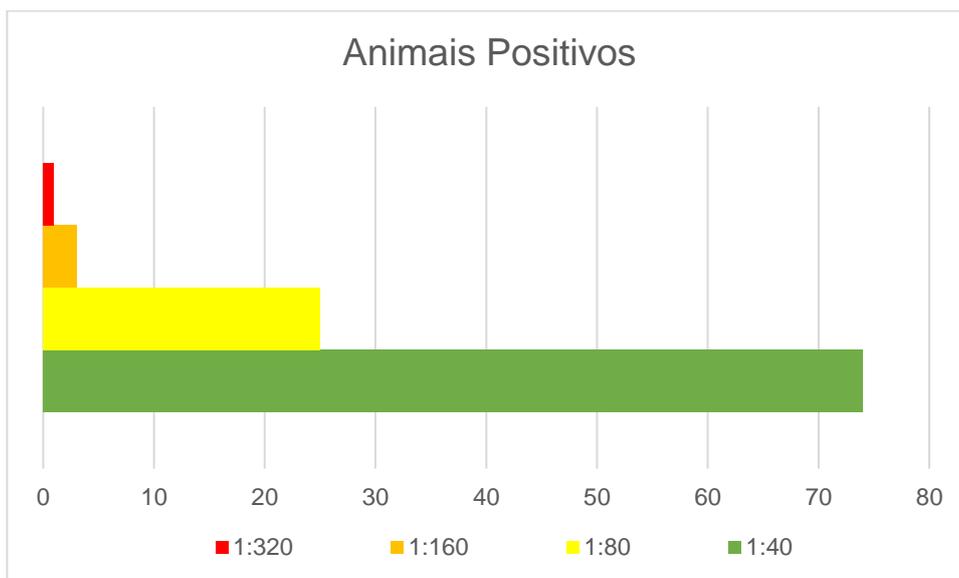
Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: Imagem das bandas obtidas através de eletroforese em gel de agarose do produto da PCR fazendo uso dos primers da região ITS-1, estando presentes o ladder 100bp K9-100I Kasvi, controles positivo e negativo, duas amostras positivas (P1-P2) e duas amostras negativas (N1-N2) (Figura 1-A) e quatro amostras positivas (P3-P6) (Figura 1-B).

### 4.3. Diagnóstico Sorológico

Para o diagnóstico sorológico dos animais, foi realizada RIFI, demonstrando positividade em 74 amostras diluídas em 1:40, frente ao antígeno de *Leishmania*. Destes, em procedimento de titulação, encontrou-se resultado positivo em 25 animais na titulação 1:80, 3 animais na titulação 1:160 e 1 animal na titulação 1:320.

Todos os sete animais que foram positivos em algum dos testes moleculares realizados estão incluídos nestes 74 animais positivos através de RIFI na diluição 1:40. A figura abaixo (Figura 7) demonstra tais resultados.

**Figura 7 - Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta**

Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: Gráfico em barras ilustrando a quantidade de animais positivos em cada titulação realizada, do maior título (1:320), positivo em um gato, até o menor (1:40), positivo em 74 gatos.

#### 4.4. Comparação entre os testes diagnósticos

Foram realizadas múltiplas comparações acerca da concordância entre os testes utilizados, comparando métodos diagnósticos sorológicos e moleculares, bem como entre o uso de diferentes amostras nos testes moleculares.

Ao se comparar a concordância entre o SO-PCR com relação ao SG-cPCR se obtém que ambos os testes concordam em um resultado, ou seja, apenas uma amostra é positiva em ambos simultaneamente, concordando simultaneamente ambos com o resultado negativo em 93 animais. Considerando que o SO-PCR por si só inclui 0 amostras como positivas e o SG-cPCR inclui por si só 6 amostras, temos um kappa ajustado de 0.2366, ou seja, razoável concordância.

Quanto à concordância entre o SO-PCR com relação ao SC-cPCR temos que ambos concordam com o resultado positivo em 1 animal e com o resultado negativo de 95 animais. A SO-PCR é responsável por incluir por si só

zero animais, ao passo que a SC-cPCR inclui por si só quatro animais, ao que se obtém um kappa ajustado de 0.322, revelando uma razoável concordância.

Comparando o SC-cPCR com o SG-cPCR temos que ambos concordam em 5 resultados, concordando simultaneamente com diagnóstico negativo em 93 animais; como o SC-cPCR inclui por si só 0 amostras ao passo que o SG-cPCR inclui por si só 2 amostras, temos um kappa ajustado de 0.823, indicando concordância quase perfeita entre ambos.

Quanto à comparação entre a SO-PCR com relação à RIFI, temos que ambos simultaneamente concordam que uma amostra é positiva. Como 73 amostras são positivas apenas pela RIFI e nenhuma é positiva apenas pela SO-PCR, mas ambas concordam com o resultado negativo de 26 animais, obtém-se um kappa ajustado de 0.0071, demonstrando quase nenhuma concordância. Mesmo ao se comparar a SG-cPCR com a RIFI, sendo que ambos concordam em sete resultados positivos, zero exclusivamente pela SG-cPCR e 67 exclusivamente pela RIFI, concordando com o resultado negativo de 26 animais, a concordância obtida (0.0515) é, também, muito baixa, embora possa mais seguramente ser classificada como concordância leve ( $0 < k < 0.2$ ) segundo os parâmetros considerados.

Tais resultados encontram-se compilados na tabela a seguir (Tabela 2).

**Tabela 2 - Testes de concordância**

Comparação		Resultado				
Teste A	Teste B	Apenas A inclui	Apenas B inclui	Ambos incluem	Ambos excluem	Kappa
SO-PCR	SG-cPCR	0	6	1	93	0.2366
SO-PCR	SC-cPCR	0	4	1	95	0.322
SC-cPCR	SG-cPCR	0	2	5	93	0.823
SO-PCR	RIFI 1:40	0	73	1	26	0.0071
SG-cPCR	RIFI 1:40	0	67	7	26	0.0515

Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: Resultados dos testes de concordância Kappa de Cohen ajustado, demonstrando os valores de interesse para a realização do teste e o respectivo resultado para cada comparação na forma do índice kappa.

#### 4.5. Sequenciamento do produto de PCR

Sequenciamento do produto de PCR destes animais positivos pelo SG-cPCR revelou a presença de DNA de *Leishmania infantum* em cinco dos sete animais, correspondendo aos mesmos cinco animais considerados positivos pelo SC-cPCR; tal achado permite discriminar tais animais como positivos para *Leishmania infantum*, o que permite configurar um referencial, com fins comparativos, a ser trabalhado no item seguinte.

#### 4.6. Desempenho dos métodos utilizados

Resultados de análises presente na literatura referentes ao desempenho do suabe oral no diagnóstico de LV canina mostram ser esta uma forma de amostragem adequada para o diagnóstico de animais doentes, com número alto de positivos e equivalente ao encontrado a partir do uso de amostras de aspirados de linfonodos, mas o mesmo resultado não foi obtido em animais infectados, mas saudáveis, sendo que para estes é necessária a combinação de amostragens, sugerindo-se o uso de suabe conjuntival para tal (ASCHAR; DE OLIVEIRA; LAURENTI; MARCONDES *et al.*, 2016). Neste trabalho, foi encontrado apenas um resultado positivo através da amostra de suabe oral; cinco, pelas amostras de suabe conjuntival, conferindo ao diagnóstico molecular da leishmaniose felina características distintas comparadas ao da leishmaniose canina.

Deve-se salvaguardar a possibilidade de um resultado positivo obtido em amostras de mucosa oral ser consequência de lesões na região, não indicando necessariamente a presença do parasita na mucosa oral, mas sim na suposta lesão, como já reportado em estudos anteriores, embora já foi encontrado o DNA de *Leishmania* em amostras de suabe oral de cães sem quaisquer lesões orais evidentes. A presença do DNA de *Leishmania* na mucosa oral de cães e gatos apresentaria uma implicação de grande importância epidemiológica ao se considerar a sugestão de diversos estudos de que *Leishmania* pode ser transmitida por meio direto, como mordedura, contato direto animal a animal ou via vertical (LOMBARDO; PENNISI; LUPO; MIGLIAZZO *et al.*, 2012).

Considerando que o animal positivo através da amostra de suabe oral apresentava lesões orais e nasais evidentes, sendo o único de todos os animais positivos testados através desse estudo, fica a dúvida acerca da procedência do DNA de *Leishmania infantum* detectado, podendo indicar, se presente de fato na mucosa oral, ser este um método de coleta não tão confiável por discriminar apenas um animal dentre um grupo de sete positivos; se não presente na mucosa oral, não ser este um método de coleta apropriado para o diagnóstico. Apesar dos cuidados tomados na coleta visando reduzir tal erro, o mesmo não pode ser desconsiderado.

Há, contudo, grande falta de consistência entre métodos sorológicos e moleculares, dependendo estes de suas distintas performances quanto à sensibilidade, especificidade e outros fatores (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). Não é, portanto, incomum o achado de gatos positivos por meio da realização de PCR, mas negativos em métodos sorológicos (AYLLON; TESOURO; AMUSATEGUI; VILLAESCUSA *et al.*, 2008; CAN; DÖŞKAYA; ÖZDEMİR; ŞAHAR *et al.*, 2016; MIRÓ; CARDOSO; PENNISI; OLIVA *et al.*, 2008), o que não foi o caso neste trabalho, reservado o fato de nada menos de 74% dos gatos terem sido positivos pela RIFI ao ponto de corte 1:40.

Uma possível discrepância pode ser explicada por algumas razões, como a suposição de que os gatos estejam em estágio inicial de infecção e, portanto, anticorpos IgG anti-*Leishmania* não tenham ainda aparecido, e o ponto de corte utilizado, podendo este ser predefinido em valor alto para reduzir a presença de falsos positivos devido à possibilidade de reações cruzadas (CAN; DÖŞKAYA; ÖZDEMİR; ŞAHAR *et al.*, 2016).

Estudo prévio, realizado no município de Araçatuba, através do uso de RIFI e ELISA, considerando positivos animais positivos por pelo menos um destes métodos sorológicos, reportou a ocorrência de 6,5% gatos infectados com *Leishmania spp.*, em n amostral de 200 animais (ROSSI, 2007). Tomando tal estudo como comparativo, os resultados aqui reportados podem indicar uma alta prevalência de leishmaniose felina nos abrigos estudados ou um excessivo número de falsos-positivos pelos métodos sorológicos utilizados. Na ausência de um método considerado de referência no Brasil, esta dúvida não pode ser sanada adequadamente. Contudo, ao se utilizar recomendações da LeishVet

(PENNISI; CARDOSO; BANETH; BOURDEAU *et al.*, 2015), a qual sugere um ponto de corte de 1:80 para o diagnóstico da leishmaniose felina através da RIFI, reduziríamos o número de positivos para 25, classificando aqueles positivos apenas na triagem (1:40) como falsos positivos e, possivelmente, uma nova prevalência de 25% atribuível às características locais da infecção.

Os resultados sorológicos, apesar de muito díspares com relação aos moleculares, mesmo aumentando o ponto de corte da RIFI, não chegam, contudo a serem surpreendentes; a literatura reporta diversas limitações inerentes a tais métodos. Por exemplo, níveis altos de anticorpos estão presentes em casos de leishmaniose tanto assintomáticos quanto de infecção ativos, podendo estar presentes por muitos anos após a infecção e, nesse contexto, análises como as da especificidade do teste tornam-se atribuladas (ELMAHALLAWY; MARTÍNEZ; RODRIGUEZ-GRANGER; HOYOS-MALLECOT *et al.*, 2014).

Não há, para a leishmaniose felina, testes diagnósticos considerados oficiais, ou um padrão-ouro, o que permitiria mensurar adequadamente o valor dos testes diagnósticos através de cálculos de concordância e indicadores epidemiológicos (LOPES; SEVÁ; FERREIRA; NUNES *et al.*, 2017). No intuito de se produzir conclusões sobre o valor dos testes diagnósticos aqui testados, estabelecemos como padrão-ouro o resultado combinado de todos os testes aqui realizados. Em tal referencial, são considerados animais positivos apenas os cinco animais nos quais houve presença comprovada do DNA de *Leishmania infantum* através de sequenciamento do produto de SG-cPCR; os demais 95 animais são considerados negativos. Foram, então, calculadas as concordâncias entre os métodos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Testes de concordância (referencial fixo)

Comparação		Resultado				
Teste A	Teste B	Apenas A inclui	Apenas B inclui	Ambos incluem	Ambos excluem	Kappa
<b>SO-PCR</b>	Seq-DNA	0	4	1	95	0.322
<b>SC-cPCR</b>	Seq-DNA	0	0	5	95	1
<b>SG-cPCR</b>	Seq-DNA	2	0	5	93	0.823
<b>RIFI 1:40</b>	Seq-DNA	69	0	5	26	0.0363
<b>RIFI 1:80</b>	Seq-DNA	22	2	3	73	0.1273

Fonte: (PEREIRA, 2020)

Legenda: Resultados dos testes de concordância Kappa de Cohen ajustado, tomando como padrão-ouro o resultado de sequenciamento (Seq-DNA).

Com relação ao discutido anteriormente no item 4.4, pela tabela acima verifica-se que, com relação ao resultado do sequenciamento do DNA de *Leishmania infantum*, a concordância com o SC-cPCR é perfeita; todos animais positivos pelo SC-cPCR tiveram comprovada a presença do parasita através de sequenciamento. O mesmo não pode ser dito sobre o SG-cPCR, mas não indica, necessariamente, uma falha no método: ambos os animais positivos pelo SG-cPCR mas negativos no sequenciamento o foram pois os produtos de PCR não puderam ser sequenciados, não retornando resultado negativo para o DNA de *Leishmania*, mas uma baixa qualidade do amplificado. De qualquer forma, o resultado coloca o SC-cPCR em patamar similar ao do SG-cPCR para o diagnóstico da leishmaniose felina.

Outro achado notável diz respeito à performance da RIFI 1:80; trata-se do único teste, além do SO-PCR, para o qual o sequenciamento foi responsável por incluir por si só algum animal, o que consistiria em resultado falso negativo para esses testes. De fato, mesmo comparado com o SG-cPCR ou com SC-cPCR, sendo este último um referencial redundante uma vez que teve resultados idênticos aos do sequenciamento, o emprego do ponto de corte 1:80 seria incapaz de detectar dois animais que, em última análise, foram considerados positivos por todos os outros métodos.

O entendimento do papel dos gatos na epidemiologia da *L. infantum* é complicada por diferenças na resposta imune entre cães e gatos e da escassez de dados acerca da habilidade dos vetores em transmitir o parasita em gatos naturalmente infectados, o que reforça perspectivas futuras para a padronização de procedimentos para um diagnóstico imediato da infecção por *L. infantum* e da triagem de populações felinas como tarefas cruciais para o melhor entendimento da epidemiologia da leishmaniose felina, assim como do papel dos gatos como reservatórios (IATTA; FURLANELLO; COLELLA; TARALLO *et al.*, 2019).

Ainda que os resultados aqui presentes ainda deixem muitas dúvidas acerca do valor de cada teste diagnóstico, pode-se dizer, devido ao achado de 7 animais positivos em todos os testes realizados, e dentre os quais nas amostras de produto de SG-cPCR de 5 animais foi possível o sequenciamento e identificação de DNA de *Leishmania infantum*, que a atenção dada ao papel epidemiológico dos gatos no ciclo da doença pode até não se equiparar àquele dos cães, mas certamente não deve ser negligenciado.

#### **4.7. Indicadores Epidemiológicos**

Um grande obstáculo para a avaliação de testes diagnósticos reside no fato que indicadores como sensibilidade, especificidade e valores preditivos não podem ser devidamente calculados devido ao não-estabelecimento de um padrão ouro, vindo a prejudicar a comparação entre técnicas, sendo portanto inadequado e não recomendado por protocolos internacionais de avaliação de testes diagnósticos (LOPES; SEVÁ; FERREIRA; NUNES *et al.*, 2017). Pode-se, contudo, comparar métodos através de sua concordância, em estatísticas como o indicador kappa de Cohen, não isento, contudo, de problemas inerentes aos métodos, como o paradoxo de Cohen e o efeito prevalência (ROSNOW; ROSENTHAL, 1995).

Verifica-se neste trabalho um fato curioso acerca da confiabilidade entre os testes comparados, não se levando em consideração a RIFI com ponto de corte 1:80: considerando o teste A como aquele que detectou menor número de positivos, e o teste B como aquele que detectou maior número de positivos,

como demonstrado nos resultados, em nenhuma das comparações o teste A foi responsável por incluir, por si só, um animal como positivo. Esta ocorrência pode estar sujeita a diversas interpretações e implicações de interesse em um maior entendimento da epidemiologia da enfermidade.

Em uma situação hipotética na qual a RIFI 1:40 seria considerada como referencial (padrão-ouro), a partir apenas dos resultados deste trabalho, não teríamos nenhum animal falso positivo para quaisquer dos testes moleculares. Teríamos, portanto, uma especificidade e valor preditivo positivo de 100%. A mesma análise se aplicaria caso o SG-cPCR fosse considerado o padrão-ouro e comparado com os testes de SC-cPCR e SO-PCR. Ainda, em uma suposição tendo a RIFI como referencial, o teste do SG-cPCR mostraria uma sensibilidade muito baixa: com 7 verdadeiros positivos e 67 falsos negativos, a mesma seria de 9,46%.

Considerando-se a ocasião de considerarmos como padrão-ouro aqueles animais positivos por pelo menos um método molecular e pelo menos um método sorológico, teríamos sete animais positivos e 93 animais negativos. Nesse n amostral, a PCR a partir de amostras de suabe oral identifica um verdadeiro positivo, seis falsos negativos e 93 verdadeiros negativos. Tais dados permitem calcular uma sensibilidade de 14,29% e uma especificidade de 100%. Como já demonstrado, o uso de qualquer padrão-ouro manteria a especificidade de 100% para o PCR a partir de amostras de suabe oral, entretanto, a sensibilidade é sempre baixa, chegando em seu máximo ao valor de 20% caso comparado tomando-se o SC-cPCR como referencial.

No caso da SG-cPCR considerada referencial, para o teste SC-cPCR obteríamos 5 verdadeiros positivos, 2 falsos negativos e 95 verdadeiros negativos, o que configuraria ao método uma sensibilidade de 71,43% e a especificidade, como já exemplificado, novamente de 100% devido à ausência de falsos positivos. Em uma comparação inversa, ou seja, com o SC-cPCR como referencial, para o teste SG-cPCR teríamos 2 falsos positivos, mas estes não puderam ser comprovados, negativos ou positivos, através de sequenciamento.

Ao passo que a RIFI 1:40, caso tomada como teste de triagem, não excluiria nenhum animal que tenha sido, afinal, considerado positivo após todos os testes moleculares, caso fosse utilizada RIFI com ponto de corte 1:80 o mesmo não ocorreria. A RIFI 1:80 excluiria em eventual triagem animais que, por fim, tiveram resultado positivo para *Leishmania infantum* comprovado por outros testes, sequenciamento inclusive. Não se recomenda, portanto, o uso do ponto de corte 1:80 para procedimentos de triagem pois, apesar de ser essa a recomendação da LeishVet para se evitar a ocorrência de falsos positivos, teríamos removido 3 animais como falsos negativos caso comparado com a SG-cPCR; dois, caso comparado com os resultados da SC-cPCR e do sequenciamento. Essas amostras perdidas consistiriam em, respectivamente, 40% e 42,9% dos animais positivos nos testes moleculares.

Autores têm constantemente recomendado a realização de amostragem de múltiplos tecidos para um diagnóstico confiável da leishmaniose felina, o que certamente relegaria a realização de testes moleculares fazendo uso de amostras não-invasivas a pontos mais distantes. Em estudo comparando a PCR através de quatro amostras distintas (sangue, tecido cutâneo, aspirado de medula óssea e *swab conjuntival*), foi reportado o achado de resultados muito distintos entre si, e particularmente baixos no caso do *swab conjuntival* (CHATZIS; ANDREADOU; LEONTIDES; KASABALIS *et al.*, 2014).

Outros estudos seriam necessários para se realizar inferências com mais propriedade, mas pode-se afirmar, a partir desses dados, que os testes moleculares apresentam alta especificidade, recomendando-se, caso não convir a amostragem de tecidos múltiplos, o emprego de PCR através do uso dos *primers* da região ITS-1, utilizando amostras de suabe conjuntival ou sangue, em estudos futuros concernentes à leishmaniose felina.

## 5. CONCLUSÕES

O trabalho realizado mostra que, ao contrário de relatos sobre o diagnóstico da leishmaniose em cães, para o diagnóstico molecular da leishmaniose felina o uso de amostras de suabe oral não apresentam resultados significativos que justifiquem sua escolha ao invés de amostras

invasivas, apesar de todas as facilidades que a coleta do mesmo oferece. Devido aos ótimos resultados obtidos através das amostras de suabe conjuntival, sendo a coleta destes também não-invasiva, recomenda-se a realização de amostragem de suabe conjuntival quando métodos invasivos não forem convenientes. Entretanto, de modo geral, são todos os diagnósticos moleculares através de PCR, fazendo uso de quaisquer das amostras aqui estudadas, testes de alta especificidade, viés este que se mostra presente com frequência em métodos sorológicos.

Recomenda-se, portanto, o uso de amostragens múltiplas para estudos relacionados ao diagnóstico molecular da leishmaniose felina e, para a possibilidade do uso de amostras de suabe oral, o teste de um maior número de animais e a discriminação das amostras quanto à presença de lesões próximas a boca do animal que possam, em um resultado positivo, ocultar a certeza de que o DNA de *Leishmania* estaria realmente presente na mucosa oral. Caso não possível a realização de amostragens múltiplas, o uso de amostras de sangue ou de suabe conjuntival para a realização de diagnóstico molecular aparentam ser os métodos mais confiáveis entre aqueles aqui testados. Recomenda-se a realização de triagem através de RIFI com um ponto de corte 1:40, uma vez que a titulação em diluições maiores acaba por excluir do rol de animais positivos uma quantidade considerável de falsos negativos quando comparado a testes moleculares e sequenciamento do produto de PCR.

## 6. REFERÊNCIAS

- AKHTARDANESH, B.; KHEIRANDISH, R.; SHARIFI, I.; MOHAMMADI, A. *et al.* Low susceptibility of domestic cats to experimental *Leishmania infantum* infection. **Journal of vector borne diseases**, 55, n. 3, p. 230, 2018.
- AKHTARDANESH, B.; SHARIFI, I.; MOHAMMADI, A.; MOSTAFAVI, M. *et al.* Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: Serological and molecular study. **Journal of vector borne diseases**, 54, n. 1, p. 96, 2017.
- ASCHAR, M.; DE OLIVEIRA, E. T. B.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. *et al.* Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, 225, p. 108-113, 2016.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C. *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 53, n. 3, p. 251-255, 1995.
- AYLLON, T.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; VILLAESCUSA, A. *et al.* Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1149, n. 1, p. 361-364, 2008.
- BARATA, R. A.; SILVA, J. C. F. d.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C. d. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. 2005.
- BENASSI, J. C.; BENVENGA, G. U.; FERREIRA, H. L.; PEREIRA, V. F. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental parasitology**, 177, p. 93-97, 2017.
- BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A. *et al.* Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 55, n. 3, p. 273-277, 1996.
- BRASIL, M. d. S. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. . **Leishmaniose Visceral 2016**, Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/26/Modelo-Apresentacao-SVS-2018-periodo-eleitoral-CGDT.pdf>. Acesso em 17 de Janeiro de 2020.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; GOMES, S.; SOUSA, J. *et al.* The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary parasitology**, 76, n. 3, p. 173-180, 1998.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 8, n. 5, p. 227-234, 1966.

CAN, H.; DÖŞKAYA, M.; ÖZDEMİR, H. G.; ŞAHAR, E. A. *et al.* Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. **Experimental parasitology**, 167, p. 109-114, 2016.

CANTACESSI, C.; DANTAS-TORRES, F.; NOLAN, M. J.; OTRANTO, D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in parasitology**, 31, n. 3, p. 100-108, 2015.

CHATZIS, M. K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D. *et al.* Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary parasitology**, 202, n. 3-4, p. 217-225, 2014.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and psychological measurement**, 20, n. 1, p. 37-46, 1960.

DA SILVA, S. M.; RABELO, P. F. B.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; RIBEIRO, R. R. *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary parasitology**, 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

DAY, M. J. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. **Parasites & vectors**, 4, n. 1, p. 49, 2011.

DE CARVALHO, I. P. S. F.; PEIXOTO, H. M.; ROMERO, G. A. S.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, 22, n. 12, p. 1579-1589, 2017.

DE OLIVEIRA, G. M.; DE FATIMA MADEIRA, M.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S. PCR associated with molecular hybridization detects *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in healthy skin in canine tegumentary leishmaniasis. **Journal of Parasitology**, 101, n. 1, p. 91-94, 2015.

DE SOUZA, A. I.; BARROS, E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N. *et al.* Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIAKOU, A.; DI CESARE, A.; ACCETTURA, P. M.; BARROS, L. *et al.* Intestinal parasites and vector-borne pathogens in stray and free-roaming cats living in continental and insular Greece. **PLoS neglected tropical diseases**, 11, n. 1, p. e0005335, 2017.

EL TAI, N.; OSMAN, O.; EL FARI, M.; PRESBER, W. *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

ELMAHALLAWY, E. K.; MARTÍNEZ, A. S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 8, n. 08, p. 961-972, 2014.

FERREIRA, S. d. A.; ALMEIDA, G. G.; SILVA, S. d. O.; VOGAS, G. P. *et al.* Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS neglected tropical diseases**, 7, n. 4, p. e2150, 2013.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M. *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, 11, n. 1, p. 273, 2018.

GOMES, Y.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R.; ABATH, F. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONZÁLEZ, E.; JIMÉNEZ, M.; HERNÁNDEZ, S.; MARTÍN-MARTÍN, I. *et al.* Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. **Parasites & vectors**, 10, n. 1, p. 368, 2017.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HILLE, K.; MÖBIUS, N.; AKMATOV, M. K.; VERSPOHL, J. *et al.* Zoonoses research in the German National Cohort. **Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz**, 57, n. 11, p. 1277-1282, 2014.

HIRSCHMANN, L. C.; SIMON, C. F.; BROD, C. S.; RADIN, J. *et al.* CLINICAL AND HEMATOLOGICAL EVALUATION OF LEISHMANIASIS SERUM-POSITIVE DOGS IN RIO GRANDE DO SUL. **Science And Animal Health**, 4, n. 2, p. 179-197, 2016.

HOSSAIN, F.; GHOSH, P.; KHAN, M. A. A.; DUTHIE, M. S. *et al.* Real-time PCR in detection and quantitation of *Leishmania donovani* for the diagnosis of Visceral Leishmaniasis patients and the monitoring of their response to treatment. **PLoS one**, 12, n. 9, p. e0185606, 2017.

IATTA, R.; FURLANELLO, T.; COLELLA, V.; TARALLO, V. D. *et al.* A nationwide survey of *Leishmania infantum* infection in cats and associated risk factors in Italy. **PLoS neglected tropical diseases**, 13, n. 7, p. e0007594, 2019.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. **Dermatologic clinics**, 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KHATUN, M.; ALAM, S. S.; KHAN, A. H.; HOSSAIN, M. A. *et al.* Novel PCR primers to diagnose visceral leishmaniasis using peripheral blood, spleen or bone marrow aspirates. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 10, n. 8, p. 753-759, 2017.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometrics**, p. 363-374, 1977.

LEDESMA, D.; BERRIATUA, E.; THOMAS, M. C.; BERNAL, L. J. *et al.* Performance of Leishmania PFR1 recombinant antigen in serological diagnosis of asymptomatic canine leishmaniasis by ELISA. **BMC veterinary research**, 13, n. 1, p. 304, 2017.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A. *et al.* Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary parasitology**, 184, n. 1, p. 10-17, 2012.

LOPES, E.; SEVÁ, A.; FERREIRA, F.; NUNES, C. *et al.* Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology & Infection**, 145, n. 12, p. 2436-2444, 2017.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. d.; SENA, J. M. d. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de saude publica**, 24, p. 2941-2947, 2008.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in parasitology**, 27, n. 8, p. 341-344, 2011.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F. *et al.* Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C. *et al.* Infection of sandflies by a cat naturally infected with Leishmania infantum. **Veterinary parasitology**, 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B. *et al.* Infection by Leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary parasitology**, 145, n. 3-4, p. 267-273, 2007.

MARTÍNEZ, V.; QUÍLEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. *et al.* Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & vectors**, 4, n. 1, p. 57, 2011.

MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological reviews**, 201, n. 1, p. 206-224, 2004.

MENDONÇA, I. L. d.; BATISTA, J. F.; WERNECK, G. L.; SOARES, M. R. A. *et al.* Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 50, n. 4, p. 483-488, 2017.

METZDORF, I. P.; JUNIOR, M. S. d. C. L.; MATOS, M. d. F. C.; DE SOUZA FILHO, A. F. *et al.* Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, 166, p. 121-125, 2017.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G. *et al.* Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MÖBIUS, N.; HILLE, K.; VERSPOHL, J.; WEFSTAEDT, P. *et al.* Owner-collected swabs of pets: a method fit for the purpose of zoonoses research. **Epidemiology & Infection**, 141, n. 9, p. 1892-1896, 2013.

MONTEIRO, F. M.; MACHADO, A. S.; ROCHA-SILVA, F.; ASSUNÇÃO, C. B. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: detection of *Leishmania* spp. genome in peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). **Microbial pathogenesis**, 126, p. 263-268, 2019.

OLIVEIRA, T. M. F. d. S.; PEREIRA, V. F.; BENVENGA, G. U.; MARTIN, M. F. A. *et al.* Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 24, n. 2, p. 220-222, 2015.

OTRANTO, D.; NAPOLI, E.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G. *et al.* Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. **Veterinary parasitology**, 236, p. 144-151, 2017.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & vectors**, 4, n. 1, p. 197, 2011.

PAŞA, S.; VARDARLI, A. T.; EROL, N.; KARAKUŞ, M. *et al.* Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary parasitology**, 212, n. 3-4, p. 389-392, 2015.

PAULAN, S. d. C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. A.; FLORES, E. F. *et al.* Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Engenharia Agrícola**, 32, n. 4, p. 765-774, 2012.

PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, 20, n. 3, p. 334-352, 2015.

PENNISI, M.-G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P. *et al.* LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & vectors**, 8, n. 1, p. 302, 2015.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? **Veterinary parasitology**, 251, p. 131-137, 2018.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

RAMPAZZO, R. d. C. P.; DA SILVA SOLCÀ, M.; SANTOS, L. C. S.; DE NOVAES PEREIRA, L. *et al.* A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, 246, p. 100-107, 2017.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**, 6, p. 147, 2014.

REIF, J. S. Animal sentinels for environmental and public health. **Public Health Reports**, 126, n. 1\_suppl, p. 50-57, 2011.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental parasitology**, 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

ROMERO, G. A. S. O controle de leishmaniose visceral no Brasil: transformar é preciso. **Cadernos de Saúde Pública**, 32, p. eCO010616, 2016.

ROSNOW, R. L.; ROSENTHAL, R. "Some things you learn aren't so": Cohen's paradox, Asch's paradigm, and the interpretation of interaction. **Psychological Science**, 6, n. 1, p. 3-9, 1995.

ROSSI, C. N. Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba-São Paulo-Brasil. 2007.

SALLOUM, T.; KHALIFEH, I.; TOKAJIAN, S. Detection, molecular typing and phylogenetic analysis of *Leishmania* isolated from cases of leishmaniasis among Syrian refugees in Lebanon. **Parasite epidemiology and control**, 1, n. 2, p. 159-168, 2016.

SCHANTZ, P. M.; STEURER, F. J.; DUPREY, Z. H.; KURPEL, K. P. *et al.* Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 226, n. 8, p. 1316-1322, 2005.

SILVA, R. B.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUZA, H. C. *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras**, 36, n. 7, p. 625-629, 2016.

SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. **R Killick-Kendrick Canine Leishmaniasis: an Update, Hoechst Rouse, Barcelona**, p. 54-59, 1999.

SOARES, C. S. A.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. What do we know about feline leishmaniosis? **Journal of feline medicine and surgery**, 18, n. 6, p. 435-442, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & vectors**, 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of clinical microbiology**, 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SPADA, E.; CANZI, I.; BAGGIANI, L.; PEREGO, R. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 45, p. 53-58, 2016.

TRAJANO-SILVA, L. A. M.; PESSOA-E-SILVA, R.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. d. C.; MORAIS, R. C. S. d. *et al.* Standardization and evaluation of a duplex real-time quantitative PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA: a sample quality control approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 50, n. 3, p. 350-357, 2017.

VERMA, S.; KUMAR, R.; KATARA, G. K.; SINGH, L. C. *et al.* Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PloS one**, 5, n. 4, p. e10107, 2010.

VITA, S.; SANTORI, D.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E. *et al.* Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary research communications**, 29, p. 319-321, 2005.

WHO. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.** World Health Organization, 2010. 9241209496.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Termo de Consentimento



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Pós-graduação em Epidemiologia Experimental  
Aplicada às Zoonoses



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu (s) felinos (s) está (ão) sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa. O Sr. (Sra.) como responsável pelo animal (is), após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do professor responsável. Em caso de recusa o Sr. (Sra.) não será penalizado (a) de forma alguma.

**Título da pesquisa:** Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da leishmaniose em gatos

**Nome do pesquisador responsável:** Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

1. **Natureza da pesquisa:** o Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu (s) animal (is) nesta pesquisa com a finalidade de detectar *Leishmania* spp. em felinos através de método não invasivo.
2. **Envolvimento da pesquisa:** ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o pesquisador colete e utilize o soro sanguíneo do animal, sangue e suabe conjuntival e oral retirado por veterinários capacitados, para realizar exames laboratoriais. Para tanto, realizaremos coleta de sangue e amostras de suabe conjuntival e oral, sendo o primeiro procedimento realizado em prol de fins comparativos com relação aos métodos não invasivos (coleta de suabe), os quais pretendemos com este projeto demonstrar serem eficazes na detecção de leishmanioses. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal.
3. **Sobre os dados necessários:** identificação do proprietário e do(s) animal(is) e data da coleta da amostra.
4. **Riscos e desconforto:** Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o

Conselho Nacional no Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008, não oferecem riscos e causam muito pouco desconforto aos animais.

5. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados individuais dos animais.

6. **Benefícios:** esperamos que este estudo experimental traga informações importantes sobre métodos de detecção e sobre a existência de *Leishmania* spp. em felinos e nos comprometemos a divulgar os resultados obtidos no meio científico.

7. **Pagamento:** o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

8. **Acesso e Compromisso do pesquisador:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, cujo contato está disponível no rodapé deste documento. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa ou após a aprovação da CEUAVET.

Frente a estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa, presente a seguir.

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DO ANIMAL

Eu,

\_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado responsável,

permito que meu (s) felino (s) participe (em) do estudo: Aplicação de suabe oral para o diagnóstico molecular da leishmaniose em gatos.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação do animal na pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar meu

consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento/assistência/tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável:

Endereço: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

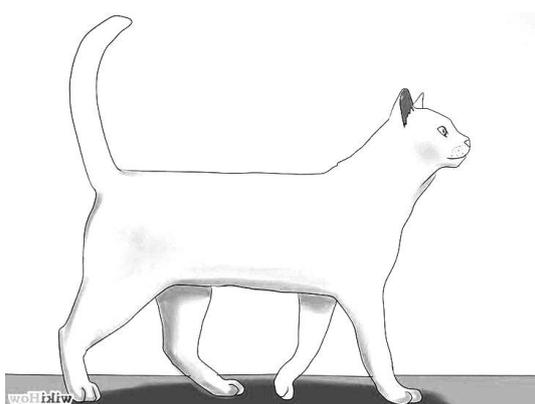
## ANEXO 2 – Ficha de identificação e anamnese



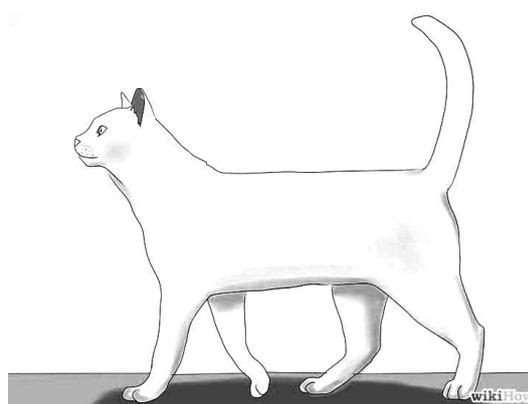
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às  
Zoonoses

## FICHA DE IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL – FELINOS

<b>Data:</b>		<b>Número:</b>	
<b>Nome:</b>	<b>Sexo:</b> ( ) M      ( ) F	<b>Pelagem:</b> ( ) curto   ( ) longo   ( ) sem pelos	
<b>Idade:</b>			
<b>Proprietário:</b>			
<b>Endereço:</b>			
<b>Cidade:</b>		<b>Estado:</b>	
<b>Telefone:</b>			



Lado direito



Lado esquerdo

**Observações:**

**ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA:****Cidade de procedência:****Contactantes:****Possui cães com leishmaniose no convívio:****Possui histórico de cães eutanasiados com leishmaniose:** ( ) sim ( ) não**Animal fica:** ( ) zona rural ( ) zona urbana**Realiza algum tratamento no animal:** ( ) sim ( ) não

Qual: \_\_\_\_\_

**Presença de ectoparasitas:****Vermifugação:****Vacinas:****Temperatura (°c):**                      **FC (bpm):**                      **FR (mpm):****Mucosas oculares:** ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) hiperacorada**Mucosas genitais:** ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) hiperacorada**Mucosas orais:** ( ) hipocorada ( ) normocorada ( ) hiperacorada**Lesões (especialmente de pele):****Outras informações:****Responsável pelo preenchimento:**