



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

JÚLIA CAMPOS BEZERRA FREIRE

**IDENTIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA* sp. EM AMOSTRAS DE GATOS
DOMÉSTICOS (*Felis catus*) DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO
HORIZONTE**

BELO HORIZONTE

2023

JÚLIA CAMPOS BEZERRA FREIRE

**IDENTIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA* sp. EM AMOSTRAS DE GATOS
DOMÉSTICOS (*Felis catus*) DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO
HORIZONTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Parasitologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito à
obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Guilherme Ribeiro Valle

BELO HORIZONTE

2023

043

Freire, Júlia Campos Bezerra.

Identificação de Leishmania sp. em amostras de gatos domésticos (*Felis catus*) da região metropolitana de Belo Horizonte [manuscrito] / Júlia Campos Bezerra Freire. – 2023.

44 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientador: Guilherme Ribeiro Valle.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Leishmania. 3. Leishmaniose /diagnóstico. 4. Gatos. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Valle, Guilherme Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO: 451/2023/06

**" IDENTIFICAÇÃO DE LEISHMANIA SP. EM AMOSTRAS DE GATOS DOMÉSTICOS (FELIS CATUS) DA
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE"**

JÚLIA CAMPOS BEZERRA FREIRE

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **30 de maio 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Gilberto Fontes

Universidade Federal de São Joao Del Rey (Divinópolis)

Jacqueline Araújo Fiúza

IRR/FIOCRUZ

Guilherme Ribeiro Valle - Coorientador

PUC/MG

Ricardo Toshio Fujiwara - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 30 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 31/05/2023, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilberto Fontes, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 08:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Araujo Fiuza, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Ribeiro Valle, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2285712** e o código CRC **800B8282**.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos – LICP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, com a participação dos seguintes colaboradores e órgãos de fomento:

COLABORADORES

Clínica Veterinária da Associação Bichos Gerais

Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG

Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Hospital Veterinário Santo Agostinho

Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Valle

Prof. Dr. Vitor Márcio Ribeiro

Ana Carolina Amado Gomes

Dra. Marianna de Carvalho Clímaco

ÓRGÃOS FINANCIADORES

Fundo de Incentivo à Pesquisa / PUC Minas – Bolsa de iniciação científica

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Bolsa de mestrado

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Dedico este trabalho à minha família pelo
apoio e paciência incondicional!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a São Francisco de Assis por sempre iluminar minhas decisões e meus caminhos.

Aos meus pais, meus irmãos e meu marido por todo amor, confiança, paciência e por sempre acreditarem na minha competência e determinação.

Ao Peter, meu grande amor de quatro patas, por sempre me fazer companhia, pelo amor que é me dado todos os dias, pelo carinho e por sempre estar por perto principalmente nos meus momentos de escrita e estudo.

Aos meus padrinhos e avós, em especial minha madrinha, pelo apoio incondicional.

A Ana Carolina Amado Gomes e a Marianna de Carvalho Clímaco, do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP) pela companhia, amizade e por toda a dedicação a este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara por me receber como aluna, pela amizade, companheirismo e disponibilidade para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Valle pelo auxílio, por ter me incentivado a seguir a carreira científica, por ter acreditado na minha capacidade como pesquisadora desde o ano de 2018 e por ter se tornado um grande amigo e ponto de apoio excepcional para a conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, em especial a Sumara e Sibebe, pelo carinho e cuidado.

A todos os meus professores que foram fundamentais para minha formação como médica veterinária e como parasitologista, em especial o Prof. Dr. Vítor Márcio Ribeiro.

Às agências financiadoras FIP/PUC Minas e CAPES por tornarem esse projeto viável.

A todos que me acompanharam até aqui e me apoiaram nesta jornada, muito obrigada!

RESUMO

Casos naturais de leishmaniose visceral felina (LVF) são conhecidos desde o início do século XX. No Brasil, o primeiro caso foi descrito no ano de 1940 por Mello. A doença clínica em gatos é rara e quando apresenta sinais clínicos incluem: lesões cutâneas, mucocutâneas, linfadenomegalia, letargia, anorexia, caquexia, fraqueza, febre, diarreia, êmese, poliúria, polidipsia, dispneia, icterícia e hepatoesplenomegalia. Para diagnóstico da LVF podem ser feitos exames sorológicos, moleculares e parasitológicos. O objetivo do presente estudo foi identificar a presença de *Leishmania* sp. em superfícies mucosas biológicas de gatos domésticos, provenientes da Região Metropolitana de BH. Foram coletadas 155 amostras de sangue (1 por animal) e 620 swabs (4 por animal) de diferentes acessos biológicos (ocular, oral, cólon e genital). Para identificação do protozoário foram realizadas as técnicas de ELISA- rKDDR, testes rápidos (DPP/Bio-Manguinhos e KDDR-plus) e PCR. Os resultados encontrados demonstraram a presença de *Leishmania* sp. em todas as amostras para pelo menos uma das técnicas utilizadas. Para a técnica de ELISA-rKDDR 37,41% das amostras foram positivas. Para os testes imunocromatográficos foram observados 4,5% e 2,6% de soropositividade, para DPP/Bio-Manguinhos e KDDR-plus, respectivamente. Quanto à PCR foi observado 66% de positividade, independentemente da superfície mucosa avaliada. As análises por ELISA comparadas com o teste padrão ouro (PCR) demonstraram associação significativa entre si ($p < 0,0001$). No entanto, os testes rápidos não mostraram esta mesma associação ($p = 1,000$ e $p = 0,246$, respectivamente). Desta forma o estudo ampliou os conhecimentos sobre a LVF, indicando que a coleta de swabs pode ser prática adotada no dia a dia das clínicas veterinárias especialmente aqueles de conjuntiva oral, por serem menos invasivos. Além disso a infecção em gatos associada a falta de sinais clínicos indica que esses animais sejam portadores assintomáticos deste protozoário.

Palavras-chave: *Leishmania* sp.; Leishmaniose felina; Diagnóstico

ABSTRACT

Natural cases of feline visceral leishmaniasis (LVF) have been known since the beginning of the 20th century. In Brazil, the first case was described in 1940 by Mello. Clinical disease in cats is rare and when it presents clinical signs include: skin lesions, mucocutaneous lesions, lymphadenomegaly, lethargy, anorexia, cachexy, weakness, fever, diarrhea, emesis, polyuria, polydipsia, dyspnea, jaundice and hepatosplenomegaly. For the diagnosis of LVF, serological, molecular and parasitological tests can be performed. The aim of the present study was to identify the presence of *Leishmania* sp. on biological mucosal surfaces of domestic cats from the Metropolitan Region of Belo Horizonte. 155 blood samples (1 per animal) and 620 swabs (4 per animal) were collected from different biological accesses (ocular, oral, colon and genital). To identify the protozoan, ELISA-rKDDR techniques, rapid tests (DPP/Bio-Manguinhos and KDDR-plus) and PCR were performed. The results found demonstrated the presence of *Leishmania* sp. in all samples for at least one of the techniques used. For the ELISA-rKDDR technique, 37.41% of the samples were positive. For the immunochromatographic tests, 4.5% and 2.6% of seropositivity were observed for DPP/Bio-Manguinhos and KDDR-plus, respectively. As for the PCR, 66% of positivity was observed, regardless of the evaluated mucosal surface. Analyzes by ELISA compared with the gold standard test (PCR) showed a significant association between them ($p < 0.0001$). However, the rapid tests did not show this same association ($p = 1.000$ and $p = 0.246$, respectively). In this way, the study expanded the knowledge about the LVF, indicating that the collection of swabs can be adopted in the daily routine of veterinary clinics, especially those of the oral conjunctiva, as they are less invasive. In addition, the infection in cats associated with the lack of clinical signs indicates that these animals are asymptomatic carriers of this protozoan.

Keywords: *Leishmania* sp.; Feline Leishmaniasis; Diagnostic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metodologias de diagnóstico da leishmaniose felina. RIFI, teste de imunofluorescência indireta de anticorpos; ELISA, ensaio imunoabsorvente ligado a enzima, teste de aglutinação direta; PCR, reação em cadeia da polimerase; qPCR, PCR quantitativo. Fonte: Nascimento et al., 2021.	19
Figura 2: A) Mapa do Brasil com destaque para o estado de Minas Gerais; B) Mapa do estado de Minas Gerais com destaque da região metropolitana de Belo Horizonte; C) Mapa da região metropolitana de Belo Horizonte e Ribeirão das Neves. Fonte: Adaptado de IBGE, 2020.	21
Figura 3: Coleta das amostras biológicas. A) Amostra superfície mucosa vaginal; B) Amostra de superfície mucosa prepucial; C) Amostra de superfície mucosa do cólon; D) Amostra de superfície mucosa oral e E) Amostra de superfície mucosa ocular	23
Figura 4: Exemplo de resultado do teste de Imunocromatografia de dupla migração DPP Bio Manguinhos® Fonte: Amado-Gomes, 2020.	23
Figura 5: Exemplo de resultado do teste de Imunocromatografia de fluxo lateral rKDDR-Plus®. Fonte: Amado-Gomes, 2020.....	24
Figura 6: Géis representativos do resultado da técnica de PCR com amostras biológicas dos diferentes animais. PM: peso molecular; C: cólon; P: prepucial; V: vaginal; OR: oral; OC: ocular; N: controle negativo e P: controle positivo	26
Figura 7: Representação da positividade dos animais nos testes sorológicos; M: machos e F: fêmeas	27
Figura 8: Representação da soropositividade dos animais nos testes sorológicos	28
Figura 9: Representação esquemática dos testes sorológicos para <i>Leishmania</i> spp. realizados com as 155 amostras.....	28
Figura 10: Representação gráfica dos resultados diagnósticos do teste de PCR para <i>Leishmania</i> spp.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPP-Bio Manguinhos: Imunocromatografia de dupla migração

ELISA-rKDDR: Ensaio de Imunoabsorção enzimática com antígeno rKDDR

HV PUC MINAS: Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

KDDR-PLUS: Imunocromatografia de dupla migração utilizando o antígeno rKDDR

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutâneo-difusa

LMC: Leishmaniose muco-cutânea

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

LVF: Leishmaniose Visceral Felina

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase convencional

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

SFM: Sistema fagocítico mononuclear

ANEXO

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais-----44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Leishmania</i> e Leishmanioses	15
1.2. Leishmaniose visceral.....	16
1.3. Leishmaniose visceral felina (LVF).....	17
1.4. Diagnóstico da LVF	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Delineamento experimental	21
3.2. Considerações éticas	21
3.3. Área de estudo.....	21
3.4. Instituições.....	22
3.5. Seleção dos animais.....	22
3.6. Coleta sanguínea	22
3.7. Coleta de superfícies mucosas.....	22
3.8. Testes sorológicos.....	23
3.8.1. Teste imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos®	23
3.8.2. Teste imunocromatográfico rKDDR-PLUS	23
3.8.3. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática – ELISA-rKDDR.....	24
3.9. Diagnóstico molecular	25
3.9.1. Extração de DNA das amostras de superfícies mucosas	25
3.9.2. PCR para diagnóstico de <i>Leishmania</i> sp.	25
3.10. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	26
4.1. Diagnóstico sorológico	26
4.2. Diagnóstico molecular por PCR.....	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS	34
8 ANEXO – Parecer do CEUA	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses correspondem a um grupo de doenças infectoparasitárias e estão entre as seis principais doenças tropicais negligenciadas do mundo. São causadas por um protozoário digenético heteroxeno do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida), sendo que cerca de 30 espécies se agrupam neste gênero, das quais mais de 20 são capazes de infectar humanos (Motta, 2021; Rossi e Fasel, 2017). Este protozoário possui grande importância na medicina humana e veterinária e são transmitidos para os mamíferos, incluindo o homem, pelo repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, que são seus vetores (WHO, 2020; Ministério da Saúde, 2014; Dantas-Torres, 2006; Ross, 1903).

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado é estritamente intracelular e sua transmissão ocorre quando a fêmea de flebotomíneo infectada realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado havendo o depósito na derme de formas promastigotas metacíclicas flageladas infectantes que logo após são fagocitadas pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM), especialmente macrófagos, uma vez que são atraídos devido a inflamação local (Bates, 2007). No interior dessas células ocorre a mudança de forma, para amastigotas, seguidas de divisão binária e posteriormente a evasão do parasito de forma passiva através da apoptose celular infectada ou pelo rompimento da célula hospedeira devido a quantidade de protozoário no interior do citoplasma, permitindo a infecção de outras células mononucleares presentes no local. A continuação do ciclo ocorre quando um novo repasto sanguíneo é realizado por uma nova fêmea, sendo ingeridas as formas amastigotas do protozoário existentes no citoplasma de células do SFM presentes na derme do hospedeiro infectado. No interior do hospedeiro invertebrado, no intestino, as formas amastigotas sofrem nova diferenciação para forma promastigota (Neuber, 2008; Dantas-Torres, 2006). Além da transmissão vetorial, anteriormente citada, em cães observa-se formas de transmissão não convencionais como: através de fluidos genitais, orais e oculares, de mãe para filho, demonstrando uma transmissão vertical e transfusão sanguínea, relatadas anteriormente (Magro *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2015; Karkamo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2009; Freitas *et al.* 2006; Gaskin *et al.*, 2002)

O espectro clínico das leishmanioses manifesta-se sob quatro formas: mucocutânea (MC), cutânea (LC), cutâneo-difusa (LCD) e visceral (LV), a qual constitui a forma mais

grave das leishmanioses e 90% dos casos, quando não tratados, podem levar a morte, devido o envolvimento sistêmico e comprometimento de órgãos como medula óssea, fígado e baço (OPAS, 2021; WHO, 2020).

1.2. Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar, é uma doença causada pela *Leishmania donovani* e pela *L. infantum*, de distribuição geográfica ampla e alta incidência principalmente em regiões em desenvolvimento como: África Oriental, Sul da Ásia, América do Sul e região do Mediterrâneo (WHO, 2020; Bi et al., 2018).

A doença é de evolução crônica, grave, de alta letalidade se não tratada e apresenta aspectos epidemiológicos e clínicos diversos e inespecíficos, o que dificulta o seu diagnóstico na fase aguda. Anualmente estima-se uma incidência de 500.000 novos casos, sendo que o subcontinente indiano e a África Oriental carregam mais de 70% da carga de LV (Griensven, 2019).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) 2022, de 2001 a 2021 foram registrados 69.665 novos casos de LV na Região das Américas, com uma média anual de 2.488 casos. Os dados publicados em 2021 revelaram uma redução de 9,5% em relação ao ano anterior e 57% em relação ao ano de 2017, podendo essa diminuição estar correlacionada com a diminuição devido os pacientes não estarem expostos aos fatores de risco ou até mesmo a falta de notificação devido a pandemia de COVID-19, uma vez que durante este período ocorreu baixa procura médica por meio dos pacientes. Cabe ressaltar que apesar do decréscimo, ocorreu um aumento significativo no número de casos em relação ao ano de 2020 em alguns países, como: Venezuela, Paraguai, e Argentina (OPAS, 2022; OPAS, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de um bilhão de pessoas vivem em áreas de risco para pelo menos uma das formas clínicas da doença, com 556 milhões de pessoas em risco de desenvolver leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2016). No entanto, nos últimos anos, o número global de LV humana diminuiu substancialmente, de 400.000 para 200.000 casos em 2012 para aproximadamente 17.000 casos anualmente em 2018 (WHO, 2020). De acordo com a fonte de infecção, de um reservatório humano ou animal, a leishmaniose pode ser classificada como antropozoonótica. (WHO, 2020).

Os cães são considerados os principais reservatórios do protozoário, no entanto, relatos na literatura mostraram que a infecção em felinos, incluindo os gatos domésticos

(*Felis catus*), tem sido identificada em áreas enzoóticas, sugerindo o possível envolvimento destes animais no ciclo biológico do protozoário, uma vez que estes indivíduos podem albergar o parasito, sem necessariamente apresentar manifestações clínicas (Sousa et al., 2021; Benassi et al., 2017; Pennisi et al., 2015; Dantas-Torres e Brandão-Filho 2006).

1.3. Leishmaniose visceral felina (LVF)

A leishmaniose visceral felina (LVF) é causada pelas mesmas espécies de *Leishmania* que acometem os cães e tem sido estudada em muitas regiões, especialmente em áreas endêmicas para leishmaniose canina e humana (Pennisi e Persichetti 2018; Soares et al. 2015).

No Velho mundo, a leishmaniose felina foi relatada principalmente em países mediterrâneos (Urbani et al. 2020; Asfaram et al. 2019; Iatta et al. 2019; Miró et al. 2014), e segundo Asgari e cols (2020) a doença passou a ser preocupante em gatos vadios no Irã. Na América do Sul e Central casos de LVF têm aumentado significativamente, especialmente no Brasil, no entanto não há um consenso sobre o papel dos gatos na manutenção da transmissão da *Leishmania* em urbanas e periurbanas (Nascimento, 2021; Asfaram et al. 2019; Soares et al. 2015).

Casos naturais de Leishmaniose Visceral Felina (LVF) são conhecidos desde o início do século XX (Sergent et al., 1912). No Brasil, a LVF foi descrita primeiramente por Mello (1940), seguido por Passos e cols (1996) em Minas Gerais em um gato doméstico que apresentava lesão na região interdigital do membro pélvico esquerdo com múltiplas amastigostas observadas em lâminas coradas por Giemsa. Posteriormente vários relatos da doença foi descrito em diversos estados brasileiros (Coelho et al., 2011; Souza et al., 2005; Savani et al., 2004; Schubach et al., 2004).

O primeiro relato de infecção por *L. infantum* transmitida pela fêmea do vetor *Lutzomyia longipalpis* em um gato naturalmente infectado foi relatado em 2010 por Silva e colaboradores, que por meio de xenodiagnóstico, foram observadas formas promastigotas no intestino médio do vetor, demonstrando assim a capacidade de se infectar por *L. infantum* de gatos afetados durante a hematofagia, o que também foi confirmado no estudo realizado por Mendonça e cols (2020) em que oito animais com o protozoário presentes na medula óssea e na pele foram capazes de infectar o vetor. Para averiguar a possibilidade de transmissão de *L. infantum* de um gato doméstico clinicamente afetado para um cão doméstico saudável por meio do vetor invertebrado, um estudo recente realizado por Batista

e cols (2020) reafirmaram a capacidade dessa via de transmissão e demonstrou que o cão desenvolveu sinais clínicos semelhantes aos observados na LV canina, como alopecia generalizada, linfonomegalia, perda de peso e lesões nas orelhas. Os relatos descritos acima além de destacarem a possibilidade de transmissão da doença de gatos para cães, também chamam a atenção para a possível transmissão de felinos para humanos (Batista *et al.*, 2020).

A doença clínica em gatos é rara e, quando ocorre, os sinais são inespecíficos, o que dificulta seu diagnóstico. Grande parte dos casos descritos estão associados à presença concomitante de doenças imunossupressoras, como leucemia felina, imunodeficiência felina, diabetes e neoplasias (Pennisi *et al.*, 2018). Entretanto, Brianti e cols (2019) confirmaram a potencial progressão da doença e dos sinais clínicos, mesmo na ausência de comorbidades. Os sinais clínicos frequentemente relatados na LVF incluem, lesões cutâneas (dermatite ulcerativa, nodular, crostosa ou escamosa) e mucocutâneas (ulcerativa), linfadenomegalia e distúrbios oculares (blefarite, conjuntivite e uveíte) (Brianti *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2010). Além disso, os gatos podem apresentar letargia, anorexia, caquexia, fraqueza, febre, diarreia, vômito, icterícia, poliúria, polidipsia, dispneia, hepatomegalia e esplenomegalia (Pennisi *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2010).

1.4. Diagnóstico da LVF

Diversas técnicas podem ser empregadas para o diagnóstico de um animal infectado sendo que as aquelas aplicadas em cães tem sido utilizadas também para o diagnóstico da doença em gatos (Figura 1).

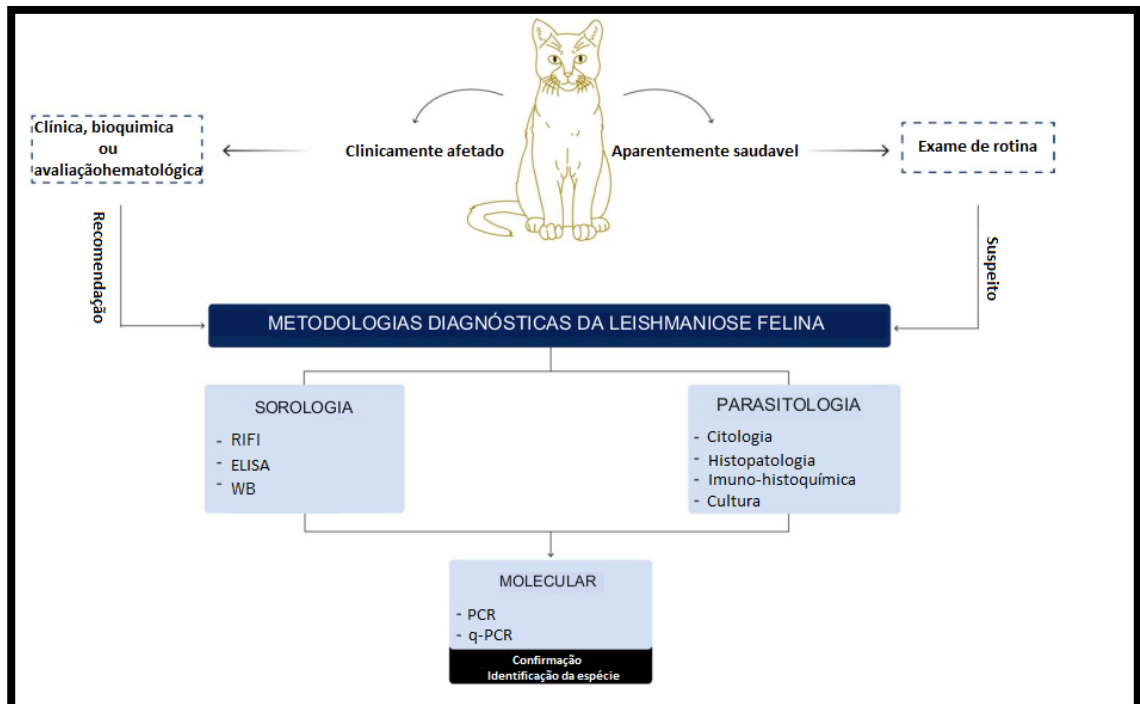


Figura 1: Metodologias de diagnóstico da leishmaniose felina. RIFI, teste de imunofluorescência indireta de anticorpos; ELISA, ensaio imunoadsorvente ligado a enzima, teste de aglutinação direta; PCR, reação em cadeia da polimerase; qPCR, PCR quantitativo. Fonte: Nascimento *et al.*, 2021.

Frequentemente, o diagnóstico tem início com a anamnese, relativa a zona geográfica onde o animal vive, risco de exposição, dentre outros fatores. O diagnóstico deve ser complementado com uma avaliação física, onde são avaliados os sinais clínicos característicos da leishmaniose e análise laboratorial, no qual possíveis alterações no hemograma, fornecem subsídios para investigação mais específica (Nascimento *et al.*, 2021).

O diagnóstico da LVF é baseado nos exames sorológicos, moleculares e parasitológicos e o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos tem levado ao aumento do número de casos documentados em gatos (Brianti *et al.* 2019; Pennisi *et al.*, 2015).

Os testes sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), baseados na detecção sérica de anticorpos IgG anti- *Leishmania*, possuem sensibilidade e especificidade variadas, dependendo do antígeno e da metodologia de execução empregada, no entanto, são os métodos mais utilizados para o diagnóstico no Brasil (Pennisi e Persichetti 2018; Trevisan *et al.*, 2015; Silva, 2012). Em contrapartida, os testes parasitológicos oferecem a forma mais específica de diagnóstico, com exames citológicos de esfregaços de material colhido de medula óssea, linfonodos,

baço, fígado, pele, córnea e sangue tendo demonstrado a presença de formas amastigotas (Pennisi *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2011; Savani *et al.*, 2004). No entanto, ainda não é possível definir qual é o melhor material para o diagnóstico citológico (Coura *et al.*, 2018; Marcos *et al.*, 2009).

Técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica podem ser úteis para caracterizar a lesão tecidual bem como na identificação das formas parasitárias (Abramo *et al.*, 2021). Estudo realizado em gatos por Navarro e cols (2010) demonstrou, em amostras de pele e olhos, que as lesões histopatológicas caracterizam-se predominantemente por inflamação granulomatosa difusa com macrófagos contendo numerosas formas amastigotas.

Além disso, vários testes moleculares para a detecção de *Leishmania* sp. podem ser empregados, dentre eles, os mais utilizados, destacam-se a PCR convencional (PCR) e a PCR quantitativa (qPCR), podendo o teste ser feito em tecidos, sangue e outros fluidos corporais, mas medula óssea, linfonodos, baço e pele demonstraram melhores resultados (Baneth *et al.*, 2020; Pennisi e Persichetti 2018; Chatzis *et al.*, 2014; Baneth e Solano-Gallego, 2012). Oliveira e cols (2015) avaliaram a eficácia do uso do PCR para detecção de gatos infectados por *Leishmania* sp. a partir de swab de conjuntiva ocular, e concluíram que esse método foi capaz de identificar animais infectados. No entanto, cabe destacar que as técnicas foram descritas para a LVC e não para a LVF, desta forma os estudos acerca de testes moleculares aplicados para a doença em gatos são limitados.

Dessa forma, o objetivo deste estudo é a busca de *Leishmania* sp. em diferentes superfícies mucosas biológicas de gatos domésticos, uma vez que pouco se sabe ainda sobre a patogenia, epidemiologia e diagnóstico da LVF, especialmente se comparado ao que se conhece para a LV em cães.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar a presença de *Leishmania* sp. em diferentes amostras biológicas de gatos domésticos da região metropolitana de Belo Horizonte-MG.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar a presença de anticorpos específicos (IgG) para *Leishmania* sp. a partir dos testes sorológicos de imunocromatografia de fluxo lateral (KDDR-Plus e DPP) e de ELISA-rKDDR (ensaio de imunoabsorção enzimática).

- Identificar a presença de DNA de *Leishmania* sp. em diferentes amostras biológicas (swab ocular, oral, cólon e genital) pela PCR convencional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

O estudo possui caráter experimental transversal, com coleta que ocorreu apenas em momento pontual.

3.2. Considerações éticas

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comitê de Ética no Uso de Animais da PUC Minas (protocolo nº 022/2018) (ANEXO 1).

3.3. Área de estudo

As amostras deste estudo foram coletadas nos municípios de Belo Horizonte e Ribeirão das Neves, localizados no estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil, com 853 municípios e possui 586.520,732 km² de área (Figura 2). Belo Horizonte, a capital do estado, possui 33,354 km² de área e uma população estimada em 2.530.701 habitantes, enquanto o município de Ribeirão das Neves possui 155,105 km² de área e uma população estimada em 341.415 habitantes em 2020 (IBGE, 2021).

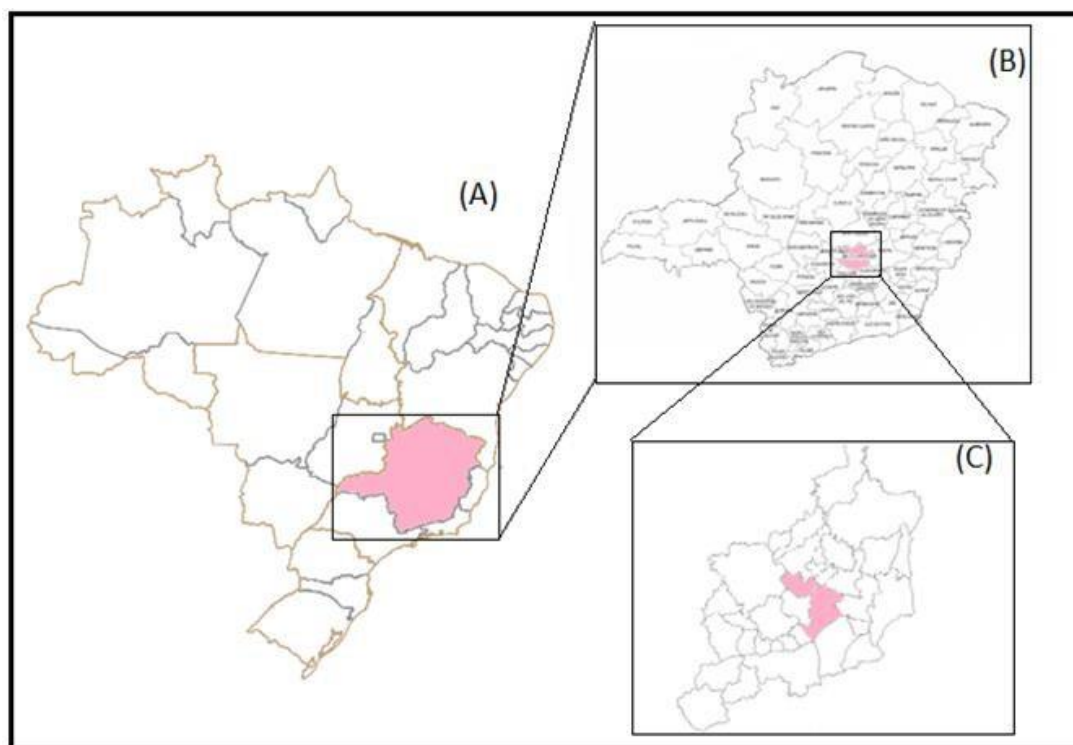


Figura 2: A) Mapa do Brasil com destaque para o estado de Minas Gerais; B) Mapa do estado de Minas Gerais com destaque da região metropolitana de Belo Horizonte; C) Mapa da região metropolitana de Belo

Horizonte e Ribeirão das Neves. Fonte: Adaptado de IBGE, 2020

3.4. Instituições

Fizeram parte deste estudo duas clínicas veterinárias comunitárias pertencentes a Associação Bichos Gerais, localizadas em Ribeirão das Neves e Belo Horizonte, além do Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC), no campus Praça da Liberdade/BH. As instituições realizam projeto de castração para gatos, cujos tutores se inscrevem para o procedimento.

3.5. Seleção dos animais

Os gatos deste estudo foram selecionados conforme a data do procedimento cirúrgico de castração, dessa forma, após a cirurgia os animais ainda anestesiados eram conduzidos ao consultório onde eram realizadas as coletas. Apesar de não ser possível discriminar a idade dos gatos, uma vez que a maioria foi adotado já na idade adulta, todos os pacientes foram avaliados fisicamente e não foi observado nenhum sinal clínico aparente. Posteriormente, realizou-se a coleta sanguínea e de superfícies mucosas para a realização dos testes diagnósticos. Todo gato participante da coleta, teve o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelo tutor.

3.6. Coleta sanguínea

Foram coletados 2-3 ml de sangue por animal da veia jugular ou veia femoral interna. O sangue foi armazenado em tubo de coleta sem anticoagulante e posteriormente centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos, para separação do soro. Após a centrifugação o soro foi aliquoteado em eppendorfs devidamente identificados de 2 ml. Em seguida as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento de processamento.

3.7. Coleta de superfícies mucosas

Para a coleta de superfícies mucosas foram utilizados swabs de algodão, previamente umedecidos com soro fisiológico, para a fricção tecidual, realizando cinco movimentos rotatórios completos, na parte caudal da vagina/vulva, no prepúcio, na terceira pálpebra ocular, na região do cólon e na mucosa alveolar superior da cavidade oral (Figura 3). A extremidade do swab foi separada com auxílio de uma tesoura limpa e esterilizada e armazenada em tubos eppendorfs, conservados a -80°C até a extração de DNA. Cabe ressaltar que para cada animal, foi coletado 4 swabs dos acessos biológicos citados acima.

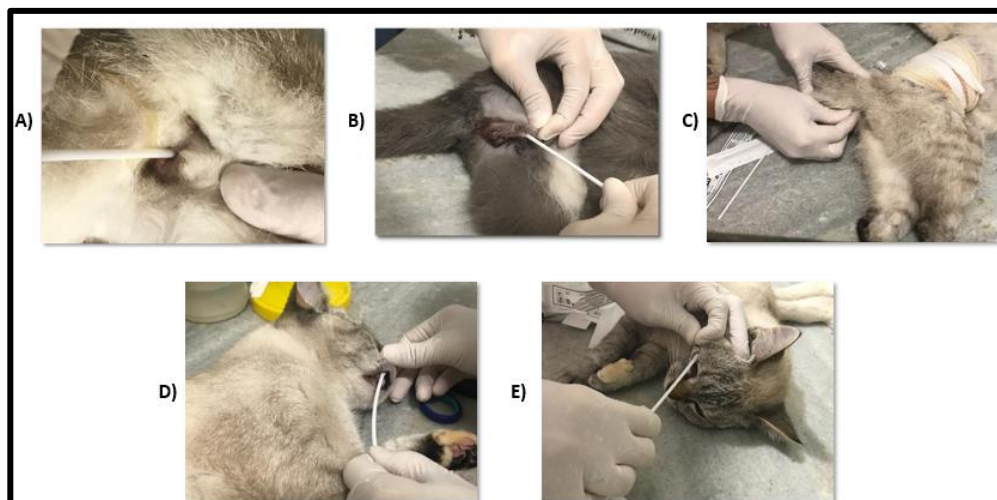


Figura 3: Coleta das amostras biológicas. A) Amostra superfície mucosa vaginal; B) Amostra de superfície mucosa prepuçial; C) Amostra de superfície mucosa do cólon; D) Amostra de superfície mucosa oral e E) Amostra de superfície mucosa ocular

3.8. Testes sorológicos

3.8.1. Teste imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos®

O teste DPP Bio-Manguinhos® (FIOCRUZ, Brasil) foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. Foi realizado a adição de 5µL do soro no poço 1 denominado “Amostra + Tampão”, em seguida foram adicionadas 2 gotas do tampão. Após cinco minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T) desapareceram. Posteriormente foram colocadas quatro gotas do tampão no poço 2 denominado “Tampão “. A leitura dos resultados foi realizada 10 minutos após esta etapa, sendo visualizadas as seguintes condições: aparecimento de duas linhas vermelhas – resultado positivo (Figura 4A) ou de uma linha vermelha – resultado negativo (Figura 4B).

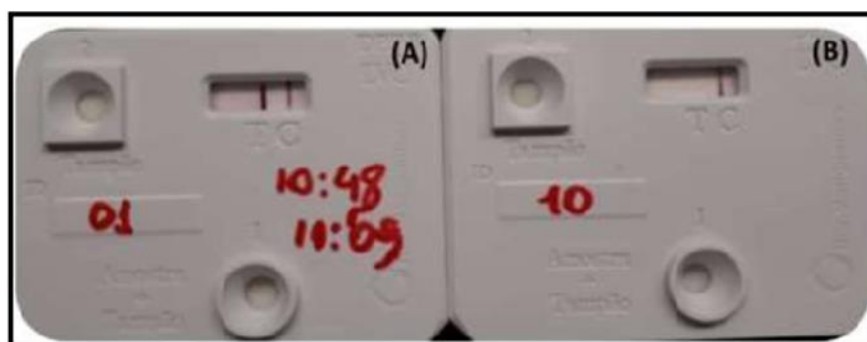


Figura 4: Exemplo de resultado do teste de Imunocromatografia de dupla migração DPP Bio Manguinhos® Fonte: Amado-Gomes, 2020.

3.8.2. Teste imunocromatográfico rKDDR-PLUS

O teste imunocromatográfico rKDDR-Plus (Safetest® Diagnósticos, Brasil) foi

utilizado de acordo com as orientações do fabricante. Foram adicionados 20µL da amostra de soro no local de aplicação de amostra, posteriormente uma gota de tampão de corrida foi adicionado. Após 15 minutos de incubação o resultado foi visualizado. Posteriormente a esta etapa, foram visualizadas as seguintes condições: aparecimento duas linhas vermelhas – resultado positivo (Figura 5A); ou de uma linha vermelha – resultado negativo (Figura 5B).

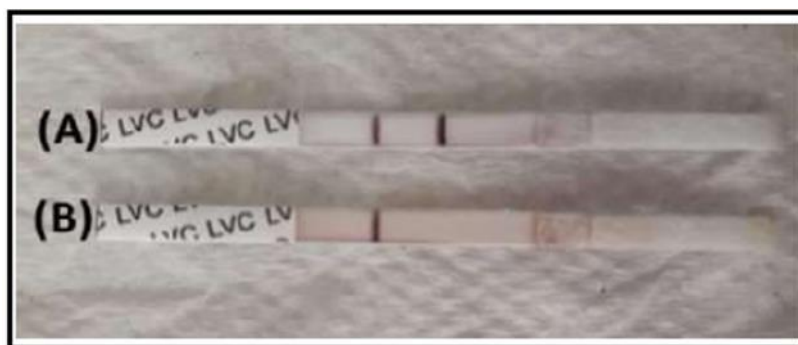


Figura 5: Exemplo de resultado do teste de Imunocromatografia de fluxo lateral rKDDR-Plus®. Fonte: Amado-Gomes, 2020.

3.8.3. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática – ELISA-rKDDR

O teste de ELISA foi realizado em duplicata seguindo um protocolo de três dias consecutivos (Lemos *et al.*, 2019). No primeiro dia, uma placa de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, USA) foi sensibilizada com 100 ng do antígeno rKDDR-Plus e incubada por pelo menos 12 horas na temperatura de 4°C. No segundo dia, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20, PBST20) e, posteriormente foram adicionados 200µL de solução de bloqueio de sítios inespecíficos (PBS-0,5 % + BSA 1%). Após incubação por 60 minutos em temperatura ambiente a placa foi vertida para descarte da solução de bloqueio seguida da aplicação de 100µl dos soros diluídos 1:100 em PBST20 em cada poço; em seguida a placa foi incubada por pelo menos 12 horas na temperatura de 4°C. Em todas as placas testadas foram adicionados controles (2 amostras positivas, 3 negativas e 2 brancos). No terceiro e último dia, cada placa foi lavada cinco vezes com 200µL de solução de lavagem (PBST20), seguido da adição de 100 µL do conjugado Anti-IgG felino marcado com HRP (Biorad – HRP AAI26P) diluído 1:5000 em PBST20, e incubada por 60 minutos em temperatura ambiente. Cada placa foi lavada cinco vezes com 200µL de solução de lavagem (PBS-0,05% Tween 20), e foi adicionado a cada poço 100µl da solução reveladora contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e em local escuro, a reação

foi interrompida com a adição de 50µL de H₂SO₄ (4N) (ácido sulfúrico) e realizada a leitura usando um leitor automático de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, EUA) com comprimento de onda de 492 nm e os resultados expressos em valores de absorvância. Para cada placa o ponto de corte (*cut-off*) foi determinado a partir da média das leituras de absorvância dos seis soros negativos, mais duas vezes o desvio padrão. A média da absorvância dos soros testados foi dividido pelo valor de *cut-off* encontrado em cada placa, com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR), normalizando assim os valores de densidade óptica (OD). Soros que apresentaram valor de IR>1,0 foram considerados positivos.

Os reagentes utilizados nestes estudo foram provenientes da Safe Test Diagnostic, Brasil e da Sigma-Aldrich, EUA.

3.9. Diagnóstico molecular

3.9.1. Extração de DNA das amostras de superfícies mucosas

Foi realizada extração de DNA das amostras de superfícies mucosas coletadas por swab, utilizando o kit Nucleo Spin Tissue® (Macherey Nagel, USA), de acordo com as instruções do fabricante com pequenas modificações.

3.9.2. PCR para diagnóstico de *Leishmania* sp.

O DNA extraído das amostras de swab genital, do cólon, oral e ocular foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando 4µL de GoTaqGreen Buffer, 2µL de DNTP's, 1µL de cada iniciador Forward: 5'CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG3',
Reverse: 5'
CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3' (Lachaud, 2002), 0,25µL de Taq DNA polimerase PHT, 50ng de DNA/µL por amostra e H₂O ultrapura com a finalidade de ajustar a reação para o volume final de 20µL. As condições de PCR consistiram de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 59°C por 30 segundos, e extensão de 72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Brasil) a 2%, em tampão de corrida TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA (TBE - 50 mM de Tris, 50mM de ácido bórico, 2,5 mM de EDTA, pH 8,0). As bandas de tamanho esperado (145 pb) foram comparadas com o padrão molecular de 50pb (Invitrogen, Brasil). Controles positivos e negativos foram utilizados como controle interno de reação.

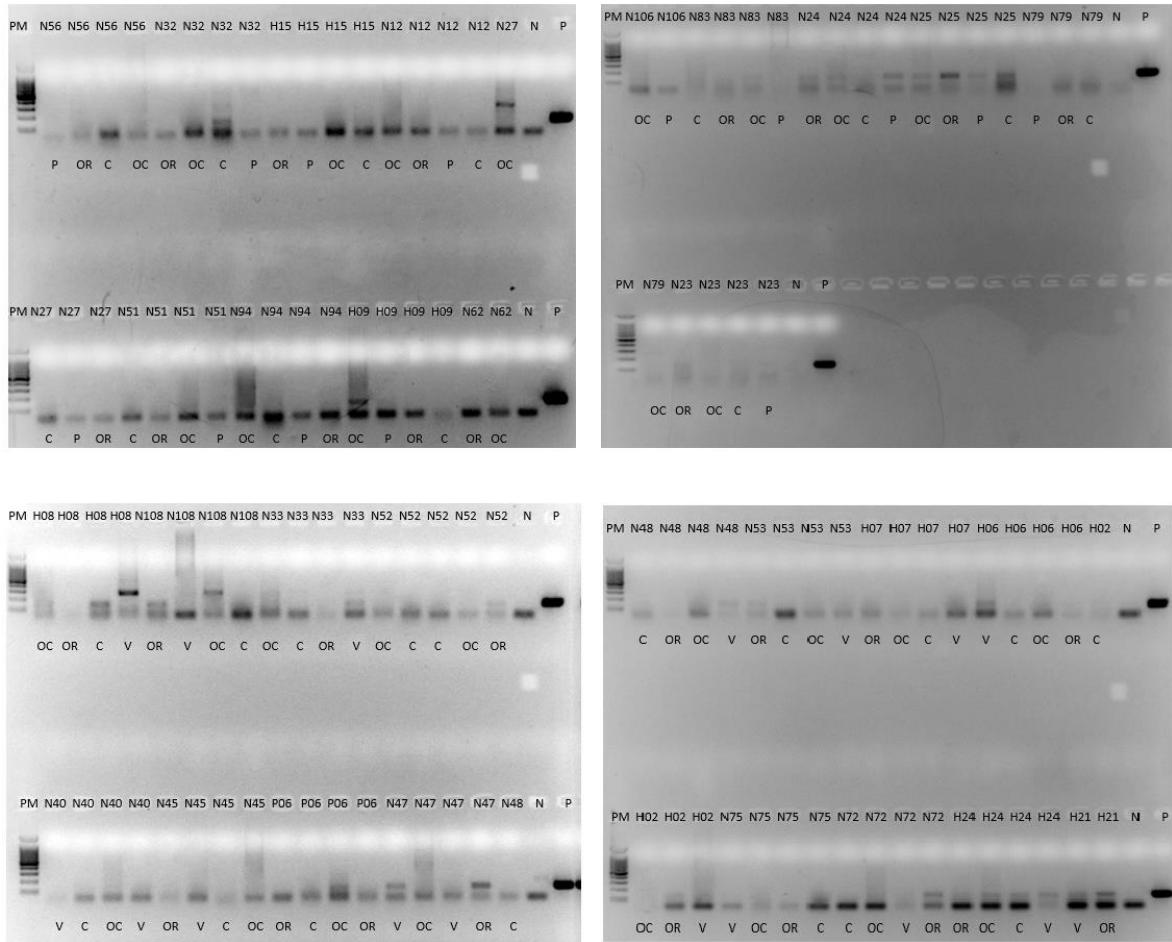


Figura 6: Géis representativos do resultado da técnica de PCR com amostras biológicas dos diferentes animais. PM: peso molecular; C: cólon; P: prepucial; V: vaginal; OR: oral; OC: ocular; N: controle negativo e P: controle positivo

3.10. Análise estatística

A distribuição dos resultados de diferentes testes diagnósticos foi analisada por meio de tabelas de contingência a 5% de significância pelo teste de Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc, EUA) e o Microsoft Excel (2019).

O teste padrão ouro classificado para este estudo foi a junção dos resultados obtidos das PCRs em todas as superfícies mucosas testadas (genital, ocular, oral e de cólon).

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico sorológico

Dos 155 gatos (91 fêmeas e 64 machos) avaliados pelo teste de ELISA, teste imunocromatográfico rKDDR PLUS® e DPP Bio-Manguinhos, 58 (37,41%), foram soropositivos para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no exame de ELISA, sendo 31

fêmeas (34,06%) e 27 machos (42,18%). No caso do teste rápido rKDDR PLUS 4 gatos (2,58%) foram sororeagentes para o teste, sendo 3 fêmeas (3,29%) e 1 macho (1,56%). Já para o teste rápido imunocromatográfico DPP Bio-Manguinhos®, 7 (4,51%), foram soropositivos sendo 3 fêmeas (3,29%) e 4 machos (6,25%). Estes resultados podem ser visualizados na figura 6 e figura 7.

As análises por ELISA com o teste padrão ouro demonstrou associação significativa entre si ($p < 0,0001$), no entanto, os testes rápidos quando comparados com a PCR não houve associação significativa ($p = 1,000$ e $p = 0,246$, respectivamente).

Utilizando o diagrama de Venn (Figura 7) foi possível observar a soropositividade simultânea de apenas 1/68 animais para todos os testes sorológicos.

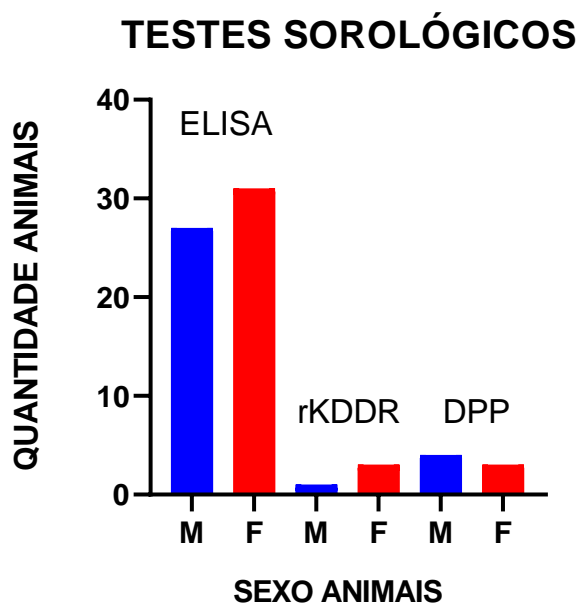


Figura 7: Representação da positividade dos animais nos testes sorológicos; M: machos e F: fêmeas

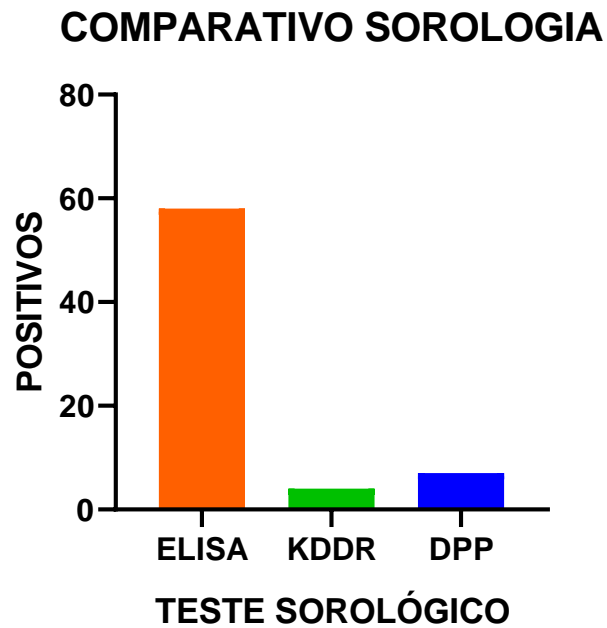


Figura 8: Representação da soropositividade dos animais nos testes sorológicos

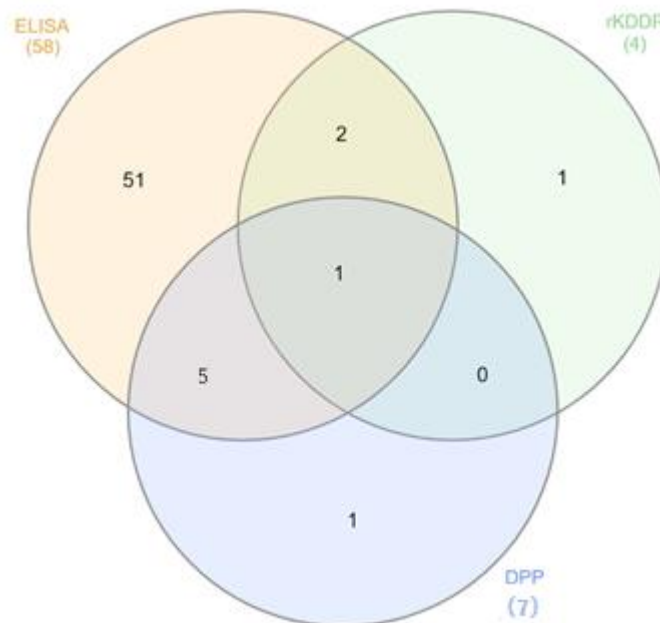


Figura 9: Representação esquemática dos testes sorológicos para Leishmania spp. realizados com as 155 amostras.

4.2. Diagnóstico molecular por PCR

Das 155 amostras de superfície mucosa genital analisadas por PCR convencional (91 amostras de fêmeas e 64 machos), 42 (27,09%), foram positivas, sendo 28/91 de fêmeas (30,76%) e 14/64 (21,87%). Nas amostras de superfície mucosa oral 56/155 (36,12%)

animais, foram positivos, sendo 33/91 de fêmeas (36,26%) e 23/64 machos (35,93%), enquanto nas amostras de superfície mucosa de cólon analisadas, 23/155 (14,83%), foram positivas, sendo 12/91 de fêmeas (13,18%) e 11/64 machos (17,18%), por fim nas amostras de superfície mucosa ocular analisadas, 40/155 (25,80%), foram positivas, sendo 29/91 de fêmeas (31,86%) e 11/64 machos (17,18%).

As análises por PCR de todas as amostras biológicas com o teste padrão ouro demonstraram associação significativa entre si ($p < 0,0001$).

Conforme observado no diagrama de Venn (Figura 8), foi possível verificar a maior presença de DNA da *L. infantum* em tecidos individualizados do que quando comparado com a positividade em múltiplos tecidos.

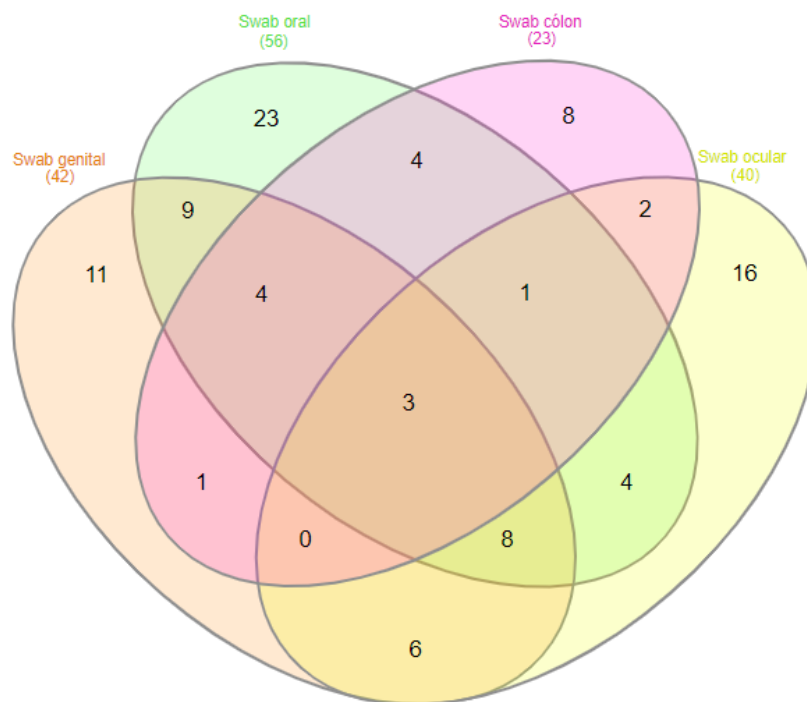


Figura 10: Representação gráfica dos resultados diagnósticos do teste de PCR para *Leishmania spp.*

Considerando o padrão ouro utilizado para o presente trabalho (a somatória das PCRs em todos os tecidos testados) 100/155 animais foram positivos independente do tecido avaliado.

5. DISCUSSÃO

A LVC é uma doença de grande importância social e epidemiológica e que apresenta conceitos na literatura bem definidos, enquanto em LVF a enfermidade ainda é pouco estudada e caracterizada. Dessa forma, os métodos que foram padronizados para diagnosticar cães infectados também podem ser utilizados para os gatos, uma vez que não existe, até o momento, padronização para os felinos.

No meio clínico veterinário, os testes sorológicos são uma das principais técnicas utilizadas para diagnóstico de leishmaniose, já que são menos onerosos quando comparados com o teste molecular. A partir dos resultados encontrados foi possível indicar a sororeatividade entre os gatos, no entanto, cabe ressaltar que ser sororeagente não significa estar necessariamente doente. No teste de ELISA realizado neste estudo, 37,4% dos gatos foram sororreativos, esses valores foram superiores aos dados de soroprevalência encontrados em diversas regiões brasileiras utilizando-se a mesma metodologia, porém com antígenos diferentes (Camprigher *et al.*, 2019; Coelho *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2009). Nossos resultados se assemelham àqueles encontrados por Costa-Val e cols (2020), onde das 64 amostras avaliadas pela técnica de ELISA, 40,63% foram soropositivos para o patógeno. A alta taxa de positividade para LVF observada no presente estudo pode ser explicada pela provável exposição prévia dos animais ao protozoário, sem necessariamente a presença de manifestações clínicas; ainda pela possibilidade de co-infecções com outros patógenos (Sobrinho *et al.*, 2012). Já os testes imunocromatográficos de fluxo lateral como o DPP Bio-Manguinhos e o rKDDR PLUS demonstram resultados inferiores quando comparados com o teste de ELISA (4,5%; 2,6% respectivamente). Apesar destes testes serem excelentes ferramentas de triagem na LVC, os mesmos devem ser otimizados para utilização no diagnóstico em felinos, levando em consideração a diferença de titulação e tempo de produção de anticorpos (Ac).

Já a técnica de PCR é uma ferramenta que apresenta alta especificidade e sensibilidade no diagnóstico molecular das doenças; sua execução apresenta complexidade e abrange diversas etapas de trabalho, sempre acompanhada de protocolo bem definido.

Durante a leitura dos resultados no diagrama de Venn, para a técnica de PCR, ressalta-se um maior índice de positividade nas amostras individualizadas, indicando possivelmente a localização do parasito e estágios iniciais de infecção e de proliferação do protozoário. Cabe ressaltar que foi pouco prevalente a positividade multi-tecidual, indicando que nesses animais possivelmente pode ser o reflexo de um estado mais avançado da doença ou ainda um

estabelecimento mais exacerbado do parasito. Segundo Schimming; Pinto e Silva (2012), na LVC apesar da infecção se espalhar para os órgãos linfóides nas primeiras horas após a picada do vetor, a progressão da doença para a forma sistêmica e conseqüentemente as manifestações clínicas, ocorrem de forma lenta, sendo que o acometimento dos órgãos varia acordo com a resposta imune do hospedeiro, podendo assim justificar nossos resultados.

Dentre os acessos biológicos foi observado maior positividade no swab oral, que sugere uma recomendação para o potencial uso no diagnóstico do patógeno, gerando menos estresse no animal durante a coleta, promovendo o bem-estar do paciente. No entanto, o médico veterinário deve considerar também os demais acessos biológicos (ocular, genital e de cólon, respectivamente) onde também foi encontrado o DNA de *L. infantum*, embora fatores como, necessidade de contenção e sedação devam ser considerados nas coletas, pois os gatos são considerados pelos clínicos, mais temperamentais quando comparados com os cães.

Estudos sobre diagnóstico para leishmaniose felina foram publicados a partir do uso de teste molecular em diferentes amostras, como sangue (Akhtardanesh *et al.*, 2017; Spada *et al.*, 2013; Sherry *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2010; Martín-Sánchez *et al.*, 2007), conjuntiva ocular (Oliveira *et al.*, 2015; Chatzis *et al.*, 2014), urina (Persichetti *et al.*, 2018) e órgãos linfóides (Mohebbali *et al.*, 2017; Otranto *et al.*, 2017; Noe *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2011). Nosso estudo demonstrou que 36,12% dos animais foram positivos para a presença do DNA de *Leishmania* sp. na superfície mucosa oral, o que difere dos resultados obtidos por Costa-Val e cols (2020), onde apenas 6,25% dos gatos foram positivos para PCR de superfície de mucosa oral. A diferença de resultados observada entre os estudos pode ser devido a, aspectos epidemiológicos que tendem a mudar com o passar do tempo, diferença das metodologias e primers utilizados bem como a diferença ao realizar as coletas das amostras.

Chatzis e cols (2014) demonstraram, em animais assintomáticos, que a PCR de swab conjuntival ocular foi menos sensível para o diagnóstico molecular, quando comparada com amostras de sangue, medula óssea e pele. Entretanto, Oliveira e cols (2015) demonstraram que de 52 gatos analisados por PCR de swab conjuntival, mesmo na ausência de sinais clínicos, 13,5% foram positivos, resultados semelhantes ao observado em nosso estudo, onde 22,58% dos gatos testaram positivos, em amostras de superfície mucosa ocular, mesmo sem a presença de sinais clínicos para a infecção.

As análises de sexo em comparação com o teste padrão ouro revelaram 73,6% de positividade em fêmeas e 51,6% em machos. Esse achado difere dos estudos publicados anteriormente sobre o tema em cães, os quais relatam maior frequência de infecção em

machos do que em fêmeas (Benites *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2008; Diniz *et al.*, 2005). A positividade maior em fêmeas quando comparado aos machos demonstrados nos resultados deste estudo, sugere que elas possam ser mais suscetíveis devido as questões fisiológicas, hormonais e imunológicas. No estudo de Magro e cols (2017) foi demonstrado que cadelas naturalmente infectadas pela *Leishmania* spp. e estrogenizadas (apresentando cio), apresentaram menor incidência do protozoário em superfícies mucosas vaginais em comparação com cadelas não estrogenizadas, uma vez que este hormônio aumenta localmente a resistência uterina contra bactérias e ativa sistemicamente as células T CD4⁺ de linhagem Th1, contribuindo para a resistência genital feminina contra infecções durante o proestro e o estro, além do IFN- γ produzido pelas células Th1 T CD4⁺ que é essencial para a ativação de macrófagos e morte intracelular de *Leishmania* (Papadogiannakis e Koutinas 2015; Sugiura *et al.* 2004). No entanto, a presença de progesterona no ciclo estral, também pode influenciar na imunidade local, conforme descrito por Miyaura e Iwata, (2002), Faas e cols (2000) , que demonstraram em modelos murinos que a presença deste hormônio tem papel imunossupressor (perfil Th2), com conseqüente inibição da resposta Th1, devido aos altos níveis de liberação de IL-10, que estão associados a uma resposta imunossupressora, favorecendo maior carga parasitária e a persistência da doença no hospedeiro. Bertolo *et al.* (2022) também observaram que cadelas com maior nível de progesterona tiveram subtipos de linfócitos T (CD3, CD4 e CD8) além da presença de macrófagos, mostrando assim que a influência hormonal modulando o fenótipo desses leucócitos a um fenótipo menos protetor, contribuindo para a persistência da infecção no entanto, dessa vez em tecido mamário. O mesmo processo, apesar de não ter sido avaliado, poderia ocorrer na LVF, embora sejam necessários novos estudos que demonstrem esta relação.

A superfície mucosa genital, nunca antes estudada em gatos, demonstrou associação positiva quando comparada com o padrão ouro, indicando assim a possibilidade de sua utilização para o diagnóstico de LVF.

Uma vez encontrado DNA do parasito na superfície mucosa genital é possível sugerir que haja transmissão venérea bidirecional entre estes animais, fato este já observado em cães (Boechat *et al.*, 2016), onde a partir da cópula traumática, com surgimento de lesões na mucosa vaginal ou prepucial, pode facilitar a penetração do parasito na superfície do epitélio genital (Diniz *et al.*, 2005). A cópula em gatos, fisiologicamente traumática para fêmeas em função da presença das espículas do pênis do macho (Johnston *et al.*, 2001), pode permitir a penetração do parasito na mucosa vulvo-vaginal, se presente na superfície genital

do macho. Silva e cols (2014) observaram cães infectados por *L. infantum* com sêmen contendo o parasito, em detrimento do esmegma positivo para o DNA deste protozoário. A transmissão venérea da fêmea para o macho ainda não foi demonstrada em nenhuma das espécies.

A superfície de mucosa de cólon, assim como a superfície mucosa genital, apesar de nunca ter sido relatada como fonte de diagnóstico para a parasitose, demonstrou uma associação significativa quando comparada com o padrão ouro, apresentando uma positividade de 23% no presente estudo. Em caso de cães a diarreia frequentemente tem sido relatada como sinal clínico comum na leishmaniose (Solano-Gallego *et al.* 2016; Sykes *et al.* 2013; Solano-Gallego and Baneth 2010, Solano-Gallego *et al.* 2009) sendo demonstrado em 2011 por Pinto e cols que o exsudato celular crônico era composto de macrófagos contendo formas amastigotas de *L. infantum*, que também foram frequentemente encontrados na lâmina própria da mucosa e submucosa intestinal de cães afetados, independente de apresentarem sinais clínicos. Já em 2014 Figueiredo e colaboradores demonstraram a partir de exames de histopatologia e imunohistoquímica, que formas amastigotas de *L. infantum* eram mais numerosas no cólon e no ceco. Desta forma e com base nos nossos resultados, pode-se considerar e sugerir que esta superfície mucosa seja uma amostra a ser utilizada para o diagnóstico da doença.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou a presença da *L. infantum* em gatos na região metropolitana de Belo Horizonte e possibilitou a produção de conhecimento sobre a LFV, indicando que a coleta de swabs pode ser prática no dia a dia das clínicas veterinárias, principalmente quando se trata da superfície mucosa oral, sendo uma técnica menos invasiva quando comparada com as demais. Além disso a infecção em gatos juntamente com a falta de sinais clínicos tem forte indicativo que esses animais sejam portadores assintomáticos deste protozoário. No entanto, cabe destacar que ainda existem pontos da doença e da infecção que merecem ser elucidados em estudos futuros.

7 REFERÊNCIAS

- Abramo F, Albanese F, Gattuso S, Randone A, Fileccia I, Dedola C, Ibba F, Ottaianoo P, Brianti E (2021) Skin lesions in Feline leishmaniosis: a systematic review. *Pathogens* 10:472. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040472>
- Akhtardanesh B, Sharifi I, Mohammadi A, Mostafavi M, Hakimmipour M, Pourafshar NG. Leishmaniose visceral felina em Kerman, sudeste do Irã: estudo sorológico e molecular. *J Vector Borne Dis* (2017); 54(1): 96-102.
- Andrade ARO, Nunes VLB, Galati EAB, Arruda CCP, Santos MFC, Rocca MEG, et al. Estudo epidemiológico das leishmanioses em área de turismo ambiental e ecoturismo, Mato Grosso do Sul, 2006-2007. *Rev Soc Bras Med Trop* (2009); 42(5): 488-493. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000500003>.
- Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH (2019) Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis. A systematic review with meta-analysis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 25:1–10. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0012>.
- Asgari Q, Mohammadpour I, Bozorg-Ghalati F, Motazedian MH, Kalantari M, Hosseini S (2020) Alarming: high prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from southern Iran based on molecular and serological methods. *Ann Parasitol* 66:143–156. <https://doi.org/10.17420/ap6602.249>
- Ayala I, Bernal LJ, Garcia-Martinez JD, Gomez MA, Navarro JA, Bernabe A. An Atypical Case of Leishmaniasis Associated with Chronic Duodenitis in a Dog. *J Am Anim Hosp Assoc*; 53(2):101-106 (2017)
- Baneth G, Nachum-Biala Y, Zuberi A, Zipori-Barki N, Orshan L, Kleinerman G, Shmueli-Goldin A, Bellaiche M, LeszkowiczMazuz M, Salant H, Yasur-Landau D (2020) *Leishmania* infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. *Parasit Vectors* 13:4–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3989-3>
- Baneth G, Solano-Gallego L. Leishmaniasis. In: GREENE CE (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. 4.ed. St. Louis: Elsevier Saunders; (2012). p.734-749.
- Batista JF, Neto FDCRM, Lopes, KSPDP, Sato MO, Costa CHN, Mendonça I L. (2020) Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. *Rev Bras Parasitol Vet* 29:1–11. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020099>

Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS (2017) Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol* 177:93–97. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.004>.

Benites AP, Fernander CE, Brum KB, Abdo MAGS. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.1, 2011

Bertolo MEBAMC, Da Costa RRME, Jacintho APP, Cipriano RS, Moreira PRR, Ferreira MA, Machado GF, Vasconcelos RO. Influence of serum progesterone levels on the inflammatory response of female dogs with visceral leishmaniasis, *Vet. Parasitol*, Volume 302, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109658>.

Boechat VC, Junior AAVM, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, Rodrigues FCC, Oliveira VC, Oliveira RVC, Menezes RC. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitology Research*, v.155, n.6, p.2371-2379, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília; (2014).

Brianti E, Celi N, Napoli E, Arfuso AJM, F, Gagliolo G, Iatta R, Gian netto S, GramicciaM, Otranto D, (2019) Treatment and long-term follow-up of a cat with leishmaniasis. *Parasit Vectors* 12:121. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3388-9>

Camprigher VM, Matos AMRN, Ferreira FP, Batina PN, Costa SC, Navarro IT, Zanutto MS. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in felines in an endemic area of the State of São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.71, n.2, (2019).

Casanova MI, Martín S, Marco A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania* spp. Infection by Immunohistochemistry in Archived Biopsy Samples from Dogs with Colitis in an Area Endemic for Leishmaniasis. *J Comp Pathol* 167, 12–17 (2019).

Chatzis MK, Andreadou M, Leotides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF, RallisT, Ikononopoulos J, Saridomichelakis MN. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet Parasitol*, v.202, p.217-225, (2014).

Coelho WMD, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani KD. Molecular detection of

Leishmania sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. Vet. Parasitol, v.176 p.281–282, (2011).

Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, Marcondes M. Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.47, n.3, p.213-217, (2010).

Costa-Val AP, Coura FM, Barbieri JM, Diniz L, Sampaio A, Reis JKP, Bueno BL, Gontijo CMF. Estudo sorológico da leishmaniose felina e detecção molecular de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* em gatos (*Felis catus*). Braz J Vet Parasitol (2020); 29(2): e003520. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020023>

Coura FM, Passos SKP, Pelegrino MOF, Leme FOP, Paz GF, Gontijo CMF, Costa-Val AP (2018) Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 27:570574. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180052>

Da Silva DA, Bonatto NCM, Venturin GL, Melo LM, Oliveira PL, Costa LR, Bosculo MRM, Barros LD, Lima VMF, Almeida BFM (2021). Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in a vulnerable region in Brazil. Braz J of Vet Parasitol. ISSN 1984-2961

Da Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Michalick MSM. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Vet. Parasitol, v.174, n.1-2, (2010).

Dantas-Torres F. Leishmune vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. Vet. Parasitol, v. 141, n. 1–2, p. 1–8, (2006).

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. Vet. Pathol, v.42, p.650-658, (2005).

Faas M, Bouman A, Moesa H, Heineman MJ, De Leji L, Schuiling G. A resposta imune durante a fase lútea do ciclo ovariano: uma resposta do tipo Th2 Fértil. Estéril. 74,1008-1013, (2000).

Ferrer L, Juanola B, Ramos JA. Chronic Colitis Due to *Leishmania* infection in Two Dogs. Vet Pathol; 28: 342-343 (1991)

Figueiredo MM, Deoti B, Amorim IF, Pinto AJW, Moraes A, Carvalho CS, Da Silva SM, Assis ACB, Faria AMC, Tafuri WL. Expression of Regulatory T Cells in Jejunum, Colon, and Cervical and Mesenteric Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 82, 3704–3712 (2014).

Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Costa T, Batista C, Pacheco TMV, Amendoeira MRR, Madeira MF. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.42, n.2, p.141-145, (2009).

Freitas E, Melo MN, Da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*, v.137, p.159-167, (2006).

Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheur A, Tomilinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, Breitschwerdt EB. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med*, v.16, p.34-44, (2002).

Gomes, ACA. Avaliação do antígeno rKDDR-Plus para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina em abrigos de animais de Aracaju/SE. Dissertação (Mestrado). São Cristovão, (2020).

Griensven JV. Visceral Leishmaniasis Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infectious Diseases Clinics*. Elsevier, v. 33, n. 1, p. 79-99, (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>

Iatta R, Furlanello T, Colella V, Tarallo VD, Latrofa MS, Brianti E, Trerotoli P, Decaro N, Lorusso E, Schunack B, Mirò G, DantasTorres F, Otranto D (2019) A nationwide survey of *Leishmania infantum* infection in cats and associated risk factors in Italy. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007594. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007594>

IBGE, 2020. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/belo-horizonte/panorama>> Acessado em: 01 Jun 2022.

IBGE, 2021. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/belo-horizonte/panorama>> Acessado em: 01 Jun 2022.

Johnston SD, Kustritz MVR., Olson PNS. (Ed) Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W. B. Saunders, (2001).

Karkamo V, Kaistinen A, Nareaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgrén G, Tuoresmaki N, Anttila M. The first report of autochthonous nonvector-borne transmission of canine leishmaniasis in the Nordic countries. *Acta Vet Scand*, v.56, p.84, (2014).

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J of Clin Microbio*, v. 40, n. 1, p. 210–215, (2002).

Lemos LD, Viana AG, Cunha JLR, Cardoso MS, Mendes TAO, Pinheiro GRG, Siqueira WF, Lobo FP, Teles LF, Bueno LL, Guimarães-Carvalho SF, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Plos One*. (2019).

Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Braz J Vet Res Anim Sci*; 46(3): 181-187, (2009) . <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26765>.

Magro AG, Assis VP, Silva LC, Tafuri WL, Silva SO, Melo NM, Valle GR. *Leishmania infantum* is present in vaginal secretions of naturally infected bitches at lower levels in oestrogenized bitches than in non-oestrogenized bitches. *Acta Parasitologica*, v.62, n.3, p.625-629, (2017).

Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Infecção por *Leishmania felina* numa região endémica de leishmaniose canina, Portugal. *Vet Parasitol*; 174(3-4): 336-340, (2010). <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.030>.

Marcos R, Santos M, Malhão F, Pereira R, Fernandes AC, Montenegro L, Roccabianca Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infecção por *Leishmania infantum* em gatos: estudo epidemiológico na Espanha. *Vet Parasitol*; 145(3-4): 267-273, (2007). <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.005>.

Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do género *Leishmania*. *Brasil Médico*, v.54, p.180, (1940).

Mendonça IL, Batista JF, Lopes KSPP, Magalhães-Neto FCR, Alcântara DS, Meriguetti YFFB, Costa CHN (2020) Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 280:109058. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109058>

Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, Canorea I, Marino V, Montoya A (2014) Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniasis? *Parasit Vectors* 7:112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-112>

Miyaura, H, Iwata, M. Inibição direta e indireta do desenvolvimento de Th1 por progesterona e glicocorticóides. *J. Immunol.* 168, 1087–1094, (2002)

Mohebbali M, Malmasi A, Khodabakhsh M, Zarei Z, Akhoundi B, Hajjarian H, Azarm A. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Northwest Iran: The role of cats in endemic areas of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* (2017); 9: 13-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.03.010> .

Nascimento LFJ, Cirilo TM, Gomes DS, Gomes ACA, Lima VFS, Scher R, Jain S, Fujiwara RT, Dolabella SS. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. *Parasitology Research*, (2021). <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07372-9>

Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniasis. *J Comp Pathol*, v.143, p.297-302, (2010).

Noe P, Domingos SL, Oshiro ET, Lima RB, Pirmez C, Pedroso TC. Detecção de *Leishmania chagasi* em gatos (*Felis catus*) de área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. *Ciênc Anim*; 25(4): 3-14, (2015).

Oliveira TMF, Pereira VF, Benvenga GU, Martin MF, Benassi JC, Da Silva DT, Starke-Buzetti WA. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Braz J Vet Parasitol*, v.24, p.220-222, (2015).

Oliveira TS, Miranda FG, Ribeiro VM, Santos, R.L. Análise de métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral canina a partir de levantamento de casos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Belo Horizonte, MG. *Medvet - Rev Cient de Med Vet*, v.9, p.692-696, (2011).

OPAS (2021) Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas: Organização Pan-Americana, nº10. 15/12/2021. Acessado 10 Set 2022.

OPAS (2022) Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas: Organização Pan-Americana, nº10. 15/12/2021. Acessado 5 Jan 2023.

Otranto D, Napoli E, Latrofa MS, Annoscia G, Tarallo VD, Greco G, Lorusso E, Gulotta L, Falsone L, Basano FS, Pennisi MG, Deuster K, Capelli G, Dantas-Torres F, Brianti E. Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet Parasitol*; 236: 144-151, (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.019>.

Marcos R, Santos M, Malhão F, Pereira Rui, Fernandes AC, Montenegro L, Roccabianca P. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*, v.38, p.201-205, (2009).

Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Mecanismos imunes cutâneos na leishmaniose canina por *Leishmania infantum*. *Imunologia Veterinária e Imunopatologia*, 163, 94-102, (2015). doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.011

Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felix domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.91, p.19-20, (1996).

Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasit Vectors*, v.8, p.302, (2015).

Pennisi MG, Persichetti MF (2018) Feline leishmaniosis: is the cat a small dog? *Vet Parasitol* 251:131–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>

Pennisi MG, Cardoso L, Bourdeau, P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasit & Vectors*, v.8, n.302, (2015).

Persichetti MF, Pennisi MG, Vullo A, Masucci M, Migliazzo A, Solano-Gallego L. Avaliação clínica de gatos expostos a ectoparasitas e risco associado de infecções transmitidas por vetores no sul da Itália. *Parasit Vectors* (2018); 11(1): 136. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-2725-8>.

Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL .

Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand* 53, 67–67 (2011).

Ross, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. *British Medical Journal*, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, (1903).

Rossi, M., e Fasel, N. Como dominar o sistema imunológico do hospedeiro? Os parasitas *Leishmania* têm as soluções! *Int. imunol.* 30, 103–111, (2017). doi: 10.1093/intimm/dxx075

Savani ESMM, Oliveira-Camargo MCG, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Áuria SRN, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 120:229–233, (2004).

Schimming BC, Pinto e Silva, Carvalho, JR. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*.– Número 19 – julho de 2012 – Periódicos Semestral. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/140317>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira AS, Madeira MF, SANTOS IB, Andrade MV, Cuzzi T, Marzochi MC, Schubach A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.98, p.165-167, (2004).

Sergent ED, Sergent ET, Lombard J, Quilichini M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull Soc Pathol Exot*, v.5, p.93-98, (1912).

Sherry K, Miró G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C, Ribas F, Furlanello T, Solano-Gallego L. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*; 11(3): 239-245, (2011). <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0251>

Silva MS. Leishmaniose visceral felina. *Cad Téc Vet Zootec*, v.65, p.104-113, (2012).

Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Michalick MSM. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* 174:150–154, (2010). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.005>

Silva LC, Assis VP, Ribeiro VM, Tafuri WL, Júnior JCT, Silva SO, Melo MN, Rachid MA, Valle GR. Detection of *Leishmania infantum* in the smegma of infected dogs. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.66, n.3, (2014).

Silva FL, Oliveira. RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol, v.160, n.1-2, (2009).

Silva FL, Rodrigues AAM, Rego IOP, Santos RLH, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Parasitol, v.151, p.86-90, (2008).

Soares CSA, Duarte SC, Sousa SR. O que sabemos sobre a leishmaniose felina? J Feline Med Surg 2016; 18(6): 435-442. <http://dx.doi.org/10.1177/1098612X15589358> . PMID: 26116620.

Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, Lima VM, Perri SHV, Generoso D, Langoni D, Leutenegger C, Biondo AW, Laurenti MD, Marcondes M. Coninfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. Vet Parasitol; 187(1-2): 302-306, (2012).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.010>

Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portús M, Alberola J. Pesquisa sorológica transversal da leishmaniose felina em ecorregiões ao redor do noroeste do Mediterrâneo. Am J Trop Med Hyg; 76(4): 676-680, (2007).
<http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.676>

Sousa, GMS, Freitas JLS, Marques MVO, Melo LM, Bevilaqua CML, Santos HD. Detecção molecular de *Leishmania infantum* em felinos: Investigando o papel do gato na transmissão do calazar. Conexão UNIFAMETRO 2021, XVII Semana Acadêmica. (2021)

Souza AI, Barros SEM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. Vet Parasitol, v.128, p.41-45, (2005).

Spada E, Proverbio D, Migliazzo A, Della Pepa A, Perego R, De Giorgi GB. Avaliação sorológica e molecular da infecção por *Leishmania infantum* em gatos vadios em uma área não endêmica no norte da Itália. ISRN Parasitol; 2013: 916376. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/916376>.

Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K, Tajima T, Inaba M, Torii R., Hatoya S, Wijewardana V, Kumagai D, Tamada H, Sawada T, Ikehara S, Inaba T. Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Imunobiologia*, 209, 619-627, (2004). doi: 10.1016/j.imbio.2004.09.003

Trevisan DAC, Lonardoni MVC, Demarchi IG. Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. *An Bras Dermatol* 90:868–872, (2015). <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153716>

Urbani L, Tirolo A, Salvatore D, Tumbarello M, Segatore S, Battilani M, Balboni A, Dondi F (2020) Serological, molecular and clinico- pathological findings associated with *Leishmania infantum* infection in cats in Northern Italy. *J Feline Med Surg* 22:935–943. <https://doi.org/10.1177/1098612X19895067>

Ward, PM, McLauchlan G, Millins C, Mullen D, McBrearty AR. Leishmaniosis causing chronic diarrhea in a dog. *Vet Rec Case Reports* 7, e000768 (2019).

WHO (2016) Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. Geneva: World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record* 91:285–296. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9122>. Accessed 12 Set 2022

WHO (2020) Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. Geneva: World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record* 25:265–280. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>. Accessed 14 Set 2022

8 ANEXO – Parecer do CEUA



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Pró-reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA PUC Minas

PARECER DA CEUA PUC MINAS

Protocolo no. 022/2018

Título: "Pesquisa de *Leishmania sp.* em órgãos genitais de gatos da região metropolitana de Belo Horizonte com Leishmaniose Visceral"

Responsável: Prof. Guilherme Ribeiro Valle

Curso de Origem: Medicina Veterinária

Parecer da CEUA PUC MINAS: APROVADO

Data da Reunião: 05/09/2018

Belo Horizonte, 05 de setembro de 2018.

Profa. Dra. Gisele Pires de Mendonça Dantas
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- PUC Minas

Observação: Os pesquisadores deverão responder as questões levantadas pela CEUA PUC MINAS em prazo máximo de 60 dias a partir da expedição deste parecer.