



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**MARIA FERNANDA ALVES MARTIN**

**Detecção de Tripanosomatídeos em Gatos Domésticos  
de Região Endêmica para Leishmaniose Visceral por  
Técnicas Parasitológicas, Sorológicas e Moleculares**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Baldini Lucheis

**Botucatu  
2017**

MARIA FERNANDA ALVES MARTIN

**Deteccção de Tripanosomatídeos em Gatos Domésticos de  
Região Endêmica para Leishmaniose Visceral por Técnicas  
Parasitológicas, Sorológicas e Moleculares**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Simone Baldini Lucheis

Botucatu  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Alves-Martin, Maria Fernanda.

Detecção de tripanosomatídeos em gatos domésticos de região endêmica para leishmaniose visceral por técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares / Maria Fernanda Alves-Martin. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis  
Capes: 50502042

1. Gato - Doenças. 2. Leishmaniose visceral - Diagnóstico. 3. Tripanosomatídeos. 4. Leishmania.

Palavras-chave: Leishmaniose Felina; diagnóstico; gato doméstico; tripanosomatídeos.

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a todos os animais, em especial, aos gatos desse estudo,  
que viveram apenas para amar, sem nada a esperar.*

*“Os sábios reconhecem que o único modo de ajudar a si mesmo é ajudando os  
outros”.*

*(Abraham Lincoln)*

*“A humildade é a parte mais bela da sabedoria”.*

*(Autor desconhecido)*

*“Gatos amam mais as pessoas do que elas permitiriam. Mas eles têm  
sabedoria suficiente para manter isso em segredo”.*

*(Mary Wilkins)*



## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À Família,*

*O maior e mais precioso bem que recebemos de Deus...*

*Obrigada pai e mãe (Pedro e Diva) pelo lar de amor, alicerce, educação,  
incentivo, confiança e orações que me permitiram chegar até aqui.  
A força e o exemplo de vida de vocês foram de grande importância para que  
eu pudesse concluir mais esta etapa em minha vida.*

*Ter alguém para amar é ter uma família...*

*Obrigada meus irmãos (Naldo e Ninha),  
pela verdadeira amizade que existe entre nós;  
Pelo carinho, confiança e presença de vocês em minha vida!*

*A família unida é a verdadeira base na construção da felicidade...*

*Obrigada meu esposo e meu filho (Roger e Miguel),  
Por me apresentarem o amor incondicional, pela amizade, cumplicidade,  
carinho e força que me sustentaram nessa caminhada;  
Pela paciência, abraços, sorrisos e por orações que me fortaleceram dia após  
dia... mesmo que ainda não o conheça, meu filho, já amo-te com o amor mais  
puro e verdadeiro.*

*Amo vocês para sempre!*

*“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior  
destes é o Amor”.  
(1 Coríntios 13:13).*

## AGRADECIMENTOS

*A DEUS, pela saúde, por fortalecer minha fé e esperança, por guiar-me em todos os momentos de minha vida e permitir a realização dos desejos do meu coração.*

*A minha família, meu esposo Roger e meu filho Miguel, que ainda não o tenho em meus braços, mas que já me faz sentir o maior amor do mundo, obrigada por estarem em minha vida.*

*Aos meus pais (Pedro e Diva) e irmãos (Naldo e Ninha), pelo carinho, amor incondicional e confiança.*

*Aos meus sogros “pais de coração”, Abimael e Marilaine, pelo carinho, atenção, apoio e orações.*

*Aos meus cunhados “irmãos de coração”, Kátia, Abner, Jéssica, Wainer e Larissa, pela amizade e carinho e a minha sobrinha Isabellá, por me apresentar o amor de tia.*

*Aos meus “avós de coração” (Tina e Martin, Tonha e Eraldo), tios e tias, pelas orações, atenção e carinho;*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Baldini Lucheis, pela confiança depositada e por me orientar (incentivar) desde o mestrado, pela agradável convivência de sete anos, dos quais compartilhamos momentos com experiências profissionais e pessoais, pelas demonstrações de carinho, preocupações, exemplos e principalmente de confiança. Muito obrigada!*

*Ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado e Doutorado.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho, bem como pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP: 2014/15807-0).*

*Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-Bauru), em especial à médica veterinária Cláudia Gomieri por ter gentilmente autorizado a utilização dos animais para o estudo, e a todos os funcionários, que direta ou indiretamente colaboraram com o nosso trabalho.*

*Ao LASAB- Laboratório da Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios -APTA/SAA, pela permissão da realização do projeto de Doutorado.*

*Ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz de Bauru, em especial à pesquisadora Dr<sup>a</sup> Virgínia, pela imensa colaboração científica, paciência e confiança, e por ceder o laboratório para a execução da parte molecular do projeto, assim como suas orientadas (Débora, Bárbara, Fran, Naty, Agatha e Kat) pela disposição e auxílio.*

*Ao Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira*

*-FEIS-UNESP, em especial a Profª Drª Wilma A. Starke Buzetti pela disponibilidade do uso de seu laboratório, além da amizade e companheirismo em todas as viagens a congressos, pelas conversas, conselhos e experiência de vida, me orientando em todos os aspectos da vida. Muito obrigada!*

*Ao Profº Drº Willian M. Dourado Coelho, docente da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina -FEA, pela colaboração e encorajamento na fase inicial do trabalho.*

*À Profª Drª Rosicleire Veríssimo e sua orientada Cristiane Bashiyo, do Laboratório de Ictiologia Neotropical da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira -FEIS-UNESP.*

*À Profª Drª Lídia Raquel de Carvalho docente da Universidade Estadual Paulista-UNESP, pela assessoria estatística.*

*À APTA e seus pesquisadores (Cecília, Ju, Bel, Raquel, Cidinha, Rose, Zezé, Elisângela, Ivan, Luiz, Marcos, Paulo) e funcionários (Luizão, Jeremias, Mirian, Sílmaria e Simone), pelos anos de convivência e troca de experiências, pelas festinhas dos aniversariantes, pipoca, pão de queijo e café das tardes de trabalho e pelos churrascos de todos os finais de ano. Sentirei saudades da amizade de cada um de vocês.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca pela paciência, atenção e serviços prestados.*

*Meus sinceros agradecimentos à Drª Virgínia Bodelão Richini Pereira e Drª Rita de Cássia, pela contribuição na banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.*

*Aos amigos que a Pós-Graduação me deu, Michely Tenório “Tia Michely”, pela amizade e pela apresentação a esse mundo da pesquisa, ao Diogo (Firmezza) pelo seu esforço e dedicação desde os primórdios da iniciação científica, sempre disposto a ajudar, independente do dia ou horário; a Maria Luana (Ninha), irmã e amiga, pela disposição e sorrisos, pelo compromisso e dedicação (Sete horas!!!); Serei eternamente grata a vocês!*

*Aos doutorandos e mestrandos do LASAB, pelos incríveis anos de convivência, cumplicidade e amizade, dedicados aos nossos estudos e projetos. Amigos de laboratório que se tornaram amigos para a vida toda, dos quais levarei um pedacinho de cada um em meu coração... A doce Livia, com a sua maneira “livianês” de falar e ajudar as pessoas, o Lord Wesley, com o seu ‘nerdismo’ ao executar todas as tarefas, fazer etiquetas e formatar teses com perfeição; à peruana Gabriela, com sua capacidade de estar em todos os lugares e executar as tarefas com exatidão; ao Fábio e sua paciência exemplar; a Dannni e sua brutalidade delicada; a “novata” Amanda e suas histórias, ao “novato” Marcelo e sua espontaneidade.... Já estou com saudades...*

*Às amigas do Laboratório de Doenças Tropicais, Francilene “Fran”, pela alegria contagiante, sorrisos e carinhos compartilhados, Mariana, Taty, Drica, Karen, agradeço pelas trocas de informações e experiências.*

*Às amigas eternas Tatiane “Tati”, Luanda “Lu”, Michele “Mi”, Mariana, Mayna, Michely, “MiNinaNandaNana” Kênia, Priscila “Pri”, Keila, Cinthia, Cristiane “Cris”, Sirlene “Sir”, Camila “Milla” e Kelly, que mesmo distantes, se fizeram presentes.*

*Aos meus “filhos de coração” Guilherme, Sofia e Livia, pela inocência e pureza compartilhadas... amo vocês!*

*À minha amiga/irmã/comadre/co-pilota/tia do Miguel, Mirian Paixão, pela amizade, companheirismo, carinho e paciência, por todos os favores, conselhos, pela companhia nos feriados e fins de semana no laboratório, pelas conversas, histórias e desabafos iniciadas com “você não sabe o que aconteceu”, pelas viagens e congressos, que foram únicas por você estar sempre ao meu lado... muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e por estar comigo durante todos esses anos e acredito que por muitos outros que virão.... Presente de Deus.*

*À minha amiga Tamiris (Tyrollll), por toda amizade, dedicação, carinho, preocupações e favores, histórias e conselhos..... amizade para a vida toda.*

*A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!*

## RESUMO

**ALVES-MARTIN, M.F.** Detecção de Tripanosomatídeos em Gatos Domésticos de Região Endêmica para Leishmaniose Visceral por Técnicas Parasitológicas, Sorológicas e Moleculares, 122p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2017.

A família Trypanosomatidae inclui protozoários flagelados com dois gêneros de importância médica e veterinária: *Leishmania*, causador das leishmanioses e *Trypanosoma*, responsáveis pelas tripanossomíases de relevância epidemiológica, ambos com o envolvimento de hospedeiros mamíferos e vetores em seu ciclo de vida. O gato doméstico passou a ser considerado um hospedeiro reservatório de Leishmanias, após comprovação por xenodiagnóstico, da transmissibilidade de formas promastigotas de *Leishmania infantum* para o vetor flebotomíneo. Devido a inespecificidade dos achados clínicos na Leishmaniose Felina (LF), à semelhança dos aspectos clínicos dessa enfermidade com outras comuns em gatos, e à provável resistência felina a infecção, é possível que, dentro de uma área endêmica para leishmaniose ocorra um percentual elevado de indivíduos infectados, mas sem apresentarem sinais clínicos, e a falta de diagnóstico precoce da LF nessas áreas pode implicar com que o animal continue a representar risco potencial de transmissão de leishmanias aos vetores. Assim sendo, pretendeu-se investigar possíveis associações entre sorologia positiva para *L. infantum*, com o parasitismo tecidual em sangue, órgãos e células conjuntivais de gatos de região endêmica para LV. Foram incluídos neste estudo 36 gatos adultos, cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru - São Paulo, com 31 animais apresentando pelo menos um tipo de alteração clínica. A partir dos diagnósticos sorológicos, verificou-se a positividade em 26 animais, sendo que (66,7%) (24/36) foram reagentes à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), (61,1%) (22/36) animais reagentes ao ELISA e 10 animais não foram reagentes ( $K=0,64$ ). A observação de formas sugestivas de amastigotas se deu em 12 animais (33,3%), quatro animais (11,1%) e 12 animais (33,3%), a partir das técnicas parasitológicas de esfregaço sanguíneo, imprint de órgãos e histoquímica, respectivamente. O diagnóstico molecular foi realizado com a utilização dos *primers* ITS-1, ITS-2 e HSP70, cuja detecção molecular pela PCR de sangue se deu em 15 animais (41,6%), pela PCR de tecidos em oito animais (22,2%) e pela PCR de suabes em quatro animais (11,1%). A quantificação da carga parasitária pela qPCR de sangue se deu em nove animais (25%) e pela qPCR de tecidos em dois animais (5,5%). Após o sequenciamento genético,

foram identificadas três amostras com *Trypanosoma theileri*, cinco com *Leishmania donovani* e uma amostra com *Leishmania braziliensis*. Dessa forma, verificamos que os gatos avaliados, sorologicamente negativos e positivos apresentaram sinais clínicos, presença do parasito em células e DNA parasitário em sangue e/ou tecidos, atuando como reservatórios de Leishmanias na região estudada. A detecção de tripanosomatídeos em amostras biológicas dos gatos do estudo sugere sua participação na manutenção do parasito no ambiente urbano.

**Palavras-chave:** Leishmaniose felina; tripanosomatídeos; gato doméstico; diagnóstico.

## ABSTRACT

**ALVES-MARTIN, M.F.,** Detection of Trypanosomatids in Domestic Cats of Endemic Region for Visceral Leishmaniasis by Parasitological, Serological and Molecular Techniques. 122p. Thesis (Doctorate). Botucatu Medical School, São Paulo State University, 2017.

Trypanosomatidae family includes flagellate protozoa of two genera of medical and veterinary importance: *Leishmania*, the causative agent of leishmaniasis and *Trypanosoma*, responsible for trypanosomiasis of epidemiological relevance, with the involvement of mammalian hosts and vectors in their life cycle. Nowadays, the domestic cat is considered a host reservoir of leishmaniasis, after proving by xenodiagnosis, the transmissibility of promastigotes of *Leishmania infantum* to the phlebotomine vector. Due to the lack of specificity of the clinical findings in Feline Leishmaniasis (FL), similar to the clinical aspects of this disease with other common ones in cats, and to the probable feline resistance to infection, it is possible that, within an endemic area for leishmaniasis, a high percentage of individuals with no clinical signs, and lack of early diagnosis of FL in these areas may imply that the animal continues to pose a potential risk of transmission of leishmaniasis to the vectors. Thus, it was intended to investigate possible associations between positive serology for *L.infantum*, with tissue parasitism in blood, organs and conjunctival cells of cats from endemic region to visceral leishmaniasis. Thirty-six adult cats, assigned by the Zoonoses Control Center (ZCC) of Bauru-SP, with 31 animals presenting at least one type of clinical alteration, were included in this study. From the serological diagnoses, the positivity was verified in 26 animals, and (66.7%) (24/36) were reactive to the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), (61.1%) (22/36) animals reactives to ELISA test and 10 animals were non-reactive ( $K = 0.64$ ). The observation of suggestive forms of amastigotes occurred in 12 animals (33.3%), four animals (11.1%) and 12 animals (33.3%), by the parasitological techniques of blood smear, imprint of organs and histochemistry, respectively. Molecular diagnosis was performed using the ITS-1, ITS-2 and HSP70 primers, whose molecular detection by blood PCR was done in 15 animals (41.6%), by tissue PCR in eight animals (22.2 %) and by PCR of conjunctival swabs in four animals (11.1%). Quantification of the parasitic load by blood qPCR occurred in nine animals (25%) and in the qPCR of tissues in two animals (5.5%). After the genetic sequencing, three samples were identified as *Trypanosoma theileri*, five as *Leishmania donovani* and one as *Leishmania braziliensis*. In this way, we verified that the evaluated cats, serologically negative and positive, presented

clinical signs, presence of the parasite in cells and parasitic DNA in blood and / or tissues, possibly acting as reservoirs of leishmaniasis in the studied region. The detection of trypanosomatids in biological samples of the studied cats suggests their participation in the maintenance of the parasite in the urban environment.

**Key words:** Feline Leishmaniasis; Trypanosomatids; Domestic cat; Diagnosis.

## SUMÁRIO

|                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                    | <b>16</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                                     | <b>26</b> |
| 2.1. Objetivo geral .....                                                                                     | 26        |
| 2.2. Objetivos específicos.....                                                                               | 26        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                             | <b>28</b> |
| 3.1. Organograma experimental .....                                                                           | 28        |
| 3.2. Aspectos éticos .....                                                                                    | 29        |
| 3.3. Animais .....                                                                                            | 29        |
| 3.4. Coleta e preparação do material para análise .....                                                       | 29        |
| 3.4.1. Soro e sangue .....                                                                                    | 29        |
| 3.4.2. Esfregaço por extensão.....                                                                            | 30        |
| 3.4.3. Coleta de secreções oculares, nasal e oral .....                                                       | 30        |
| 3.5. Exames sorológicos.....                                                                                  | 31        |
| 3.5.1. Antígenos de <i>L. infantum</i> .....                                                                  | 31        |
| 3.5.2. Técnica de Imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i> .....                            | 31        |
| 3.5.3. Técnica de ELISA indireto para <i>L. infantum</i> .....                                                | 31        |
| 3.6. Eutanásia .....                                                                                          | 32        |
| 3.6.1. Coleta dos órgãos de interesse .....                                                                   | 32        |
| 3.7. Exames parasitológicos – Pesquisa de amastigotas .....                                                   | 33        |
| 3.7.1. Imprint de órgãos .....                                                                                | 33        |
| 3.7.2. Histologia .....                                                                                       | 33        |
| 3.8. Exames Moleculares (PCR e q-PCR).....                                                                    | 34        |
| 3.8.1. Extração de DNA .....                                                                                  | 34        |
| 3.8.1.1. Extração do DNA para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. em sangue.....                               | 34        |
| 3.8.1.2. Extração do DNA para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. em tecidos .....                             | 34        |
| 3.8.1.3. Extração do DNA para pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. em suabes conjuntivais, orais e nasais. .... | 35        |
| 3.8.1.4. Quantificação das amostras de DNA.....                                                               | 35        |
| 3.8.1.5. Avaliação da inibição da PCR e integridade do DNA extraído .....                                     | 35        |
| 3.8.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de sangue, tecidos e suabes para <i>Leishmania</i> spp. ....    | 36        |
| 3.8.3. Eletroforese em gel de agarose.....                                                                    | 38        |
| 3.8.4. PCR em Tempo Real (Sangue, Tecidos e Suabes).....                                                      | 38        |
| 3.9. Sequenciamento Genético .....                                                                            | 39        |
| <b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>                                                                           | <b>39</b> |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                                                                                     | <b>42</b> |
| 5.1. Avaliação clínica .....                                                                                  | 42        |
| 5.2. Diagnósticos sorológicos.....                                                                            | 43        |
| 5.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....                                                     | 43        |
| 5.2.2. ELISA indireto .....                                                                                   | 44        |

|                                                                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3. Diagnósticos parasitológicos.....                                                                                       | 45         |
| 5.3.1. Esfregaço sanguíneo.....                                                                                              | 45         |
| 5.3.2. Imprint.....                                                                                                          | 46         |
| 5.3.3. Histoquímica .....                                                                                                    | 47         |
| 5.4. Diagnóstico molecular.....                                                                                              | 50         |
| 5.4.1. Quantificação do DNA de sangue e tecidos.....                                                                         | 50         |
| 5.4.2. PCR .....                                                                                                             | 50         |
| 5.4.2.1. PCR de cepas controles positivos (LIT5R/L5-8S e LITSV/L5-8SR) .....                                                 | 50         |
| 5.4.2.2. PCR de sangue total (LIT5R/L5-8S, LITSV/L5-8SR e HSP70).....                                                        | 52         |
| 5.4.2.3. PCR de tecidos (LIT5R/L5-8S, LITSV/L5-8SR e HSP70).....                                                             | 53         |
| 5.4.2.4. PCR de suabes conjuntival, oral e nasal (ITS-1 e HSP70).....                                                        | 55         |
| 5.4.3. PCR em Tempo Real (HSP70).....                                                                                        | 57         |
| 5.4.3.1. PCR em Tempo Real de sangue total .....                                                                             | 57         |
| 5.4.3.2. PCR em Tempo Real de tecidos.....                                                                                   | 57         |
| 5.4.3.3. PCR em Tempo Real de suabes conjuntival, oral e nasal .....                                                         | 58         |
| 5.5. Sequenciamento genético de DNA das amostras positivas aos testes moleculares de PCR .....                               | 58         |
| 5.6. Avaliação dos diagnósticos parasitológicos, sorológicos e moleculares com os resultados do sequenciamento genético..... | 59         |
| 5.7. Resultados parasitológicos e moleculares dos gatos não reagentes às provas sorológicas .....                            | 61         |
| 5.8. Resultados parasitológicos e moleculares de gatos reagentes às provas sorológicas.....                                  | 62         |
| 5.9- Concordância das técnicas diagnósticas parasitológicas e moleculares em comparação aos exames sorológicos .....         | 63         |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                    | <b>66</b>  |
| 6.1. Sinais clínicos.....                                                                                                    | 66         |
| 6.2. Diagnósticos sorológicos.....                                                                                           | 67         |
| 6.3. Diagnósticos parasitológicos.....                                                                                       | 69         |
| 6.4. Diagnósticos moleculares.....                                                                                           | 71         |
| 6.5. Sequenciamento genético.....                                                                                            | 75         |
| 6.6. Animais sorologicamente reagentes e não reagentes e relação com as provas parasitológicas e moleculares .....           | 77         |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                    | <b>81</b>  |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                   | <b>83</b>  |
| <b>9. ANEXOS .....</b>                                                                                                       | <b>97</b>  |
| <b>10. APÊNDICES.....</b>                                                                                                    | <b>114</b> |

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae, pertencente a ordem Kinetoplastida, que inclui protozoários flagelados caracterizados pela presença do cinetoplasto (estrutura que contém DNA extracelular de forma condensada). Distribuídos em nove gêneros, os protozoários dessa família parasitam plantas (*Phytomonas*), insetos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*), répteis (*Sauroleishmania*) e mamíferos (*Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania*) (1, 2).

Dois gêneros de Trypanosomatidae contém espécies com importância médica e veterinária: *Leishmania*, causador das leishmanioses e *Trypanosoma*, causador da tripanossomíase, e ambos possuem ciclo de vida complexo envolvendo hospedeiros vertebrados e insetos vetores (3, 4).

Protozoários do gênero *Trypanosoma*, são responsáveis por ocasionar doenças em humanos e animais e, dentre as mais de 150 espécies descritas parasitando todas as classes de vertebrados, temos duas que são as mais estudadas: *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, que ocorre nas Américas e *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, o qual ocorre na África, e ambos são parasitos do homem, animais domésticos e silvestres (3).

Na América do Sul existem espécies de tripanosomas que parasitam animais domésticos, de forma patogênica, dentre eles *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma equiperdum*, cujo vetores são insetos hematófagos tabanídeos e também carrapatos. Há também outra espécie menos patogênica, o *Trypanosoma theileri*, que acomete bovinos, ocasionando baixa produtividade nos animais (5, 6).

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*, que acometem o humano e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos, de forma crônica e com diversas manifestações clínicas, cuja endemicidade atinge 98 países ao redor do mundo e com estimativa de 60000 mortes por ano, classificando-a em terceiro lugar das enfermidades transmitidas por vetores (7, 3). *Leishmania infantum*, do complexo *Leishmania donovani*, é o agente causador da Leishmaniose Visceral (LV) na África, Ásia, Europa e Américas, com regiões endêmicas que se estendem desde o Sul dos Estados Unidos para o norte da Argentina, incluindo o Brasil (8, 3).

Os casos humanos de LV estão presentes em 12 países, sendo que 96% dos casos são relatados no Brasil. Atualmente, a nível regional, a LV está classificada em três cenários epidemiológicos de acordo com o tipo de transmissão: países com transmissão e expansão (Argentina, Brasil e Uruguai), países com transmissão estável (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México). Em 2015, foi reportado nas Américas um total de 3456 casos de LV, distribuídos em oito países, sendo que dentre estes, 95,1% ocorreram no Brasil (9).

Canídeos, tanto domésticos como selvagens são os hospedeiros mais importantes da LV (10, 11), mas outras espécies de animais podem ser infectadas, incluindo roedores silvestres, marsupiais e gatos (12, 13, 14). O vetor da doença são espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, e a principal espécie transmissora no Brasil é *Lutzomyia longipalpis*, que possui ampla distribuição geográfica, incluindo áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas, sendo sempre encontrado em áreas onde há casos de transmissão da doença (3). Assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania* (15).

No Brasil, a migração do meio rural para o urbano foi um fator que acelerou a expansão da LV especialmente no nordeste e sudeste do país (16, 17). Com a disseminação da enfermidade e o número progressivo de casos, a LV tornou-se para a Organização Mundial de Saúde, uma das prioridades dentre as doenças tropicais (18). Está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras e, segundo os dados epidemiológicos relatados em 2015, entre as regiões do referido país, a região nordeste representou 60,7% dos casos, seguida pelas regiões norte (15,7%), sudeste (18,1%), centro-oeste (5,3%) e sul (0,2%) (19).

No sudeste brasileiro foram registrados os primeiros casos caninos na região de Araçatuba em 1998, com casos humanos da doença na mesma região em 1999 (20, 21). Quase 10 anos mais tarde, em 2008, foi diagnosticado o primeiro caso de Leishmaniose Felina (LF) (22). Dados obtidos até 2014 demonstram o encontro do vetor *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) em 167 (25,9%) municípios do estado de São Paulo, dos quais 108 (16,7%) destes apresentaram transmissão canina e em 84 (13%) houveram notificações de casos humanos, sendo que Bauru foi classificado, de acordo com o Grupo de Vigilância epidemiológica (GVE), como município de transmissão canina e humana (23). No Estado de São Paulo, 2.630 casos humanos foram confirmados entre o período de 2000 até 2015, com

registros de 218 óbitos no mesmo período (19).

Com a grande urbanização da leishmaniose e o envolvimento de outras espécies domésticas na epidemiologia da LV tornou-se possível novos focos endêmicos (24). Casos de LF foram descritos em países da América do Sul (25, 26, 27, 28, 29, 30); Europa (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38) e Ásia (39, 40), relatando a infecção em gatos domésticos por diversas espécies de *Leishmania*, com a presença e ausência de sinais clínicos similares aos observados em outras enfermidades infecciosas comuns em gatos, causadas por vírus (Vírus da Leucemia Felina - FeLV e Vírus da Imunodeficiência Felina - FIV), bactérias fungos e outros protozoários, enfatizando a associação da LF com a presença de lesões dermatológicas em gatos doentes de região endêmica para LV (34, 41, 42).

Desde a primeira evidência da transmissibilidade de formas promastigotas de *L. infantum* de um felino doméstico para flebotomíneos pelo xenodiagnóstico, descrito por Marolli et al. (33) na Itália, bem como em outro relato de Silva et al. (43), em Belo Horizonte, o gato passou a ser considerado um hospedeiro reservatório da doença em zonas endêmicas. Desta forma, surge a necessidade de estudos adicionais, para se determinar a importância do gato doméstico no ciclo da LV, já que esses felinos possuem algumas características comportamentais próprias, como caça predatória noturna e trânsito de até 1,5 Km de distância de suas residências, co-habitando áreas silvestres e domésticas, favorecendo a infecção e disseminação do parasito por essa espécie (44, 45).

É possível que, dentro de uma área endêmica para leishmaniose ocorra um percentual elevado de indivíduos infectados pelo parasito, mas sem apresentarem sinais clínicos, considerando que a baixa prevalência da LF em áreas endêmicas poderia ser devido à resistência felina natural à infecção (46). A falta de diagnóstico precoce da LF nessas áreas pode implicar com que o animal continue a representar risco potencial de transmissão de leishmanias aos vetores, pois estudos demonstram que a infecção em gatos pode permanecer por longos períodos, mantendo o risco de infecciosidade aos flebotomíneos (14).

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é mais prevalente do que a LV em humanos, o que torna a situação crítica do ponto de vista epidemiológico, pois o grande número de animais infectados com alto parasitismo cutâneo, atuam como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, pela manutenção do ciclo no ambiente doméstico (3). Além disso, trabalhos demonstram que além do cão, a possível atuação dos

gatos domésticos na manutenção de *Leishmania* spp., com relatos de isolamento de diferentes espécies em gatos domésticos, dentre elas *L. braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* (47, 48, 41), podem indicar a possibilidade da participação destes animais como reservatórios da doença no meio urbano.

Devido ao desenvolvimento da medicina felina, um número crescente de relatos de LF têm sido descritos nas últimas décadas, porém ainda há poucas informações sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos dessa infecção em gatos domésticos (42). Estudos em outros países do Velho Mundo vêm demonstrando a ocorrência da LF em regiões endêmicas para LVC, com uma ocorrência por técnicas sorológicas de 0 a 68% e por técnicas moleculares de 0 a 60,7% (42). A prevalência da LF em regiões endêmicas no Brasil, apresentou um aumento significativo nos últimos anos, enfatizando a importância de mais estudos sobre essa espécie no ciclo das leishmanioses (49).

Diante disso, temos alguns relatos de casos descritos no Brasil, tais como em Cotia, município do estado de São Paulo, tendo-se diagnosticado um gato com LF, que apresentava lesão nodular nasal e linfadenomegalia. À Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), apresentou título 80 para *Leishmania* spp., sendo encontradas formas amastigotas ao esfregaço sanguíneo, bem como a identificação de *L. infantum* a partir de fragmentos do baço pela técnica de PCR (13). A infecção por *L. braziliensis* foi relatada em dois gatos, ambos apresentavam lesões na região nasal e face (47), sinais clínicos semelhantes aos encontrados em um gato no Mato Grosso do Sul, com uma lesão nodular no focinho e outros nódulos irregulares sobre as orelhas, tendo observado formas amastigotas em esfregaço sanguíneo e detectado *L. amazonensis* a partir de anticorpos monoclonais (48).

Em gatos, além de descrições de casos, há também trabalhos realizados com felinos domésticos de cidades endêmicas do interior de São Paulo, que vêm evidenciando a presença de LF nessa região. Em Araçatuba, região endêmica para LVC, Bresciani et al. (50), evidenciaram a positividade de 0,7% (2/283) de gatos domésticos ao exame parasitológico direto de imprint de linfonodo, assim como os estudos de Rossi (51), obteve a prevalência de 6,5% de felinos positivos a partir de diagnósticos parasitológico e sorológicos (RIFI e ELISA). Na mesma cidade, Costa et al. (52) demonstraram uma prevalência de infecção em 14,5% (31/200) dos animais, sendo 4% (8/200) por diagnóstico parasitológico e 11,5% (23/200) por sorologia. Vides et al. (41) estudando gatos com lesões dermatológicas, dessa mesma região, encontraram amastigotas em linfonodos de 37% dos gatos, sorologia de 51,9%

por RIFI, 22,2% por ELISA e identificaram 33,3% gatos positivos pela imunohistoquímica. Silveira-Neto et al. (27), testando ELISA com antígenos recombinantes e solúvel bruto, também em gatos de Araçatuba, detectaram anticorpos anti-*Leishmania* em 15,0% e 21,2% dos animais, respectivamente, e na mesma região, porém na cidade de Andradina, Coelho et al. (26), detectaram *Leishmania* spp. em 5,7% dos felinos testados por meio de detecção molecular.

As variabilidades de prevalências entre as regiões estudadas podem ser justificadas devido à aplicação de diferentes protocolos e pontos de corte nos estudos, características da população ou níveis de endemicidade (42). Nessa situação, torna-se importante ressaltar que a resposta imune dos gatos frente à infecção torna-os menos susceptíveis à LF e que esses animais possuem uma certa resistência natural, sendo esses um dos motivos que limitam o diagnóstico. Além disso, não se pode descartar que a LF pode ser promovida por co-infecções imunossupressoras, tais como FIV e FeLV, sugerindo-se mais estudos para melhor avaliar a imunidade de gatos infectados com LF (29, 49, 53).

O diagnóstico efetivo da LV pode ser realizado por meio de testes parasitológicos, pela pesquisa do parasito em sangue e/ou tecidos infectados, pelo diagnóstico imunológico, determinando-se a presença de anticorpos contra *Leishmania* e pelo diagnóstico molecular, com a detecção do DNA do parasito em amostras biológicas, associando-se com os dados epidemiológicos.

Nos testes parasitológicos (esfregaço sanguíneo, imprint de órgãos e histoquímica), a positividade é demonstrada pelo encontro das formas amastigotas nos tecidos infectados, tornando esses testes mais específicos e sensíveis; mas para isso, é necessário que a observação das lâminas seja realizada por profissionais experientes e habilitados, para que torne o diagnóstico menos subjetivo. Assim sendo, faz-se necessária a utilização de outras técnicas confirmatórias (50, 52).

A sorologia é um método indireto capaz de detectar a infecção, porém não medindo o grau de parasitismo, a presença da doença ou ainda o potencial de transmissão que o animal apresente para o vetor. Os métodos diagnósticos sorológicos para LVC são considerados altamente sensíveis e específicos, porém eles devem ser interpretados com cautela, pois podem falhar na não detecção de animais imunocomprometidos e co-infectados (54).

A RIFI é o método que vem sendo mais utilizado em trabalhos de LF e possui facilidade em sua execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo, detectando anticorpos contra *Leishmania* produzidos desde o início da infecção (55, 56, 57). Entretanto, há desvantagens, como identificar animais falso-positivos devido a possibilidade de apresentar reação cruzada com outras enfermidades, tais como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), doença de Chagas ou, ainda, com outros tripanosomatídeos (58). A ocorrência de reações cruzadas pela utilização da RIFI, foi fator crucial para sua exclusão no diagnóstico de triagem da LVC, pois segundo nota técnica emitida pelo Ministério da Saúde em 2011, houve a substituição do protocolo de diagnóstico da LVC, passando a ser utilizado o teste imunocromatográfico com antígenos recombinantes como triagem (Dual Path Platform – DPP) e o teste de ELISA como confirmatório (59). Ainda são poucos os estudos que analisam a eficácia da utilização dessa técnica em gatos, sugerindo a necessidade de mais estudos sorológicos nesse grupo de animais.

Outro diagnóstico sorológico é o teste de ELISA, que também vem sendo amplamente utilizado para o diagnóstico da LF e foi considerado mais sensível do que a RIFI (25, 60). O antígeno mais utilizado é o total bruto lisado, que embora sensível é limitado quando se trata de especificidade, por apresentar reações cruzadas não somente com tripanosomatídeos, mas também com organismos filogeneticamente distantes (61). As técnicas sorológicas estão sujeitas a ocorrência de reações cruzadas, porém, apesar disso continua sendo a ferramenta de maior disponibilidade e aplicabilidade em inquéritos epidemiológicos e indispensáveis em pesquisas de LF, até que se comprove sua ineficácia.

Testes moleculares como a PCR é considerada altamente sensível e específica e possui a capacidade de detectar fragmentos do DNA do parasito, não necessitando estar presente inteiro na circulação (62). Vem sendo considerado o diagnóstico mais sensível do que os métodos sorológicos para a detecção de LF (37). Porém, geralmente para a colheita de sangue em felinos domésticos, há a necessidade da utilização de anestésicos para a contenção química, fato que torna o procedimento além de trabalhoso, invasivo ao animal. Dessa maneira, surge a necessidade de testes rápidos e práticos, tais como o uso de PCR de suabe conjuntival, o qual fornece resultados confiáveis por meio de uma técnica rápida e pouco invasiva (63, 64, 65).

A utilização da técnica de PCR em tempo real (qPCR) possui vantagens em relação a PCR convencional, pois não apresentam os vários passos de manipulação pós

amplificação requeridos pela técnica convencional, minimiza os riscos de contaminação do material, além de ser mais sensível e permitir de forma simultânea a detecção, medida e comparação do número de parasitos em diferentes amostras (37, 66, 67).

A maioria dos trabalhos relata que a LF vem sendo diagnosticada por PCR seguida de sequenciamento genético, facilitando a identificação da espécie da *Leishmania* (49). Com este tipo de diagnóstico foi possível analisar que os gatos domésticos estão susceptíveis à infecção por diversas espécies de *Leishmania*, que podem ser encontradas em outros animais e humanos (42).

Diante dessas informações, há a necessidade de mais estudos pela busca de métodos diagnósticos menos invasivos e mais sensíveis em gatos que vivem em regiões endêmicas para LVC e que apresentem ou não manifestações clínicas, com o objetivo de facilitar a realização de inquéritos epidemiológicos e o melhor entendimento da LF, principalmente quando se diz respeito a resposta imune desses animais.

A cidade de Bauru-SP (22°18'53"S; 49°03'38"O) é endêmica para LV e com casos esporádicos de LT em diversas espécies animais (68, 69, 70, 71) e no ser humano (72). A LV é atualmente um importante problema de saúde pública na cidade, que por conta de ações antrópicas em suas áreas florestais, levou ao desequilíbrio ambiental e fez com que diversas espécies de flebotomíneos se adaptassem ao ambiente urbano, encontrando novas fontes de alimento e aumentando a diversidade de animais reservatórios para essa zoonose. Além disso, com a devastação ambiental, animais silvestres passaram a frequentar o ambiente urbano, aumentando o risco de infecção dos animais domésticos e humanos.

A partir de 2002 foram registrados os primeiros casos da forma visceral da doença em cães e, em 2003, foi encontrado o primeiro caso humano, que seguiu com o aumento para 65 casos e quatro óbitos em 2006 (73). Em um estudo epidemiológico realizado entre 2004 e 2012, obteve-se a notificação de 381 casos de LV em humanos, distribuídos em 100/ 28,6% bairros da zona urbana de Bauru, tendo uma taxa de 9,2% de coinfeção com HIV, resultando no óbito de 8,1% dos casos (74). Nos anos seguintes a estudo anterior, os casos de LV humana continuaram constantes, resultando de 24 casos em 2013, 25 casos em 2014, 14 casos em 2015 e até novembro de 2016 foram notificados mais oito casos com um registro de óbito, e o mesmo vem ocorrendo com os casos caninos, que com base nos dados emitidos do período janeiro 2014 a dezembro de 2016, foram notificados 1484 casos de LV canina em

toda a cidade (Fonte: CCZ de Bauru - SP, Dados não publicados).

O controle desta zoonose se faz necessário, pois estudos recentes não descartam a participação do gato no ciclo desta zoonose (29). No entanto, surge a necessidade de estudos adicionais da leishmaniose em felinos, para que se possam adotar medidas eficazes de diagnóstico, controle e prevenção dessa enfermidade. Embora tenha sido aprovado pelo Ministério da Agricultura um único medicamento para o tratamento da LVC (Milteforan<sup>TM</sup>), temos que considerar que tal procedimento não promove a erradicação do parasito no organismo do animal, grande parte dos proprietários não têm acesso ao tratamento, e a eutanásia dos cães não leva à eliminação efetiva e duradoura do ciclo de transmissão (75). Diante desses fatos, sugere-se a participação de outros animais reservatórios no ciclo dessa zoonose na cidade de Bauru.

Os trabalhos até então realizados com gatos domésticos não são totalmente conclusivos, uma vez que revelam somente uma descrição parcial da resposta sorológica da infecção felina, e outras vezes o diagnóstico molecular com o encontro do parasito em tecidos cutâneos e/ou na corrente sanguínea, porém, não refletem necessariamente o que ocorre nos principais órgãos afetados (fígado, baço, linfonodo e pele), e pouco se sabe sobre a carga parasitária e a resposta imune e celular em órgãos de gatos naturalmente infectados.

A utilização de técnicas que permitam a monitorização da carga parasitária em diferentes órgãos de gatos sorologicamente positivos com a presença ou ausência de sinais clínicos também se faz necessária, já que o conhecimento quantitativo do grau de parasitismo nestes animais pode estar relacionado ao prognóstico da doença. Trabalho realizado por Chatziz et al. (76), descreve uma maior positividade pela PCR em gatos que apresentaram pelo menos um sinal clínico relacionado à leishmaniose.

Pouco se sabe se os gatos sorologicamente positivos apresentam parasitismo tecidual elevado e, desta forma, sejam potenciais fontes de infecção para flebotomíneos, bem como se estes animais manifestam alterações clínicas da enfermidade e positividade aos testes parasitológicos e moleculares. A determinação da presença de parasitos em diferentes tipos de tecidos e secreções de gatos sorologicamente positivos por *L. infantum* são pouco conhecidos, porém de grande valia (77, 65).

A conciliação de técnicas diagnósticas menos invasivas e rápidas seria de grande utilidade para a obtenção de resultados eficazes em menor tempo durante inquéritos

epidemiológicos. Desta forma, torna-se importante a realização de estudos mais detalhados da análise citológica e da quantificação da carga parasitária dos principais órgãos afetados em gatos domésticos sorologicamente positivos por *L. infantum*, assim como a tentativa de padronizar uma técnica menos invasiva para o diagnóstico da LF.

Pelos aspectos apresentados e pela relevância da LF como zoonose, pretende-se pesquisar em gatos domésticos (*Felis catus*) sorologicamente positivos para *L. infantum*, procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP, a realização de outras técnicas que possam complementar o diagnóstico e possibilitar a detecção desta zoonose de maneira mais eficaz e contribuir para um diagnóstico adequado desta enfermidade nestes animais, testando-se a utilização de técnicas menos invasivas como o uso de suabe conjuntival, oral e nasal, avaliar-se a eficácia de testes moleculares nestes animais e, a partir das amostras de sangue e diferentes tecidos, a identificação da carga parasitária dos animais e correlacionar a sorologia com o parasitismo tecidual. Portanto, desta forma, pretende-se discutir e avaliar a atuação destes animais como reservatórios no ciclo doméstico da leishmaniose e contribuir para o diagnóstico seguro e preciso da LF, zoonose de grande importância em saúde pública.

# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo geral*

- Avaliar possíveis associações entre sorologia positiva para *L. infantum*, com o parasitismo tecidual e presença de sinais clínicos, por técnicas parasitológicas e moleculares em gatos domiciliados de região endêmica.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- Estimar a prevalência da infecção em gatos sorologicamente positivos e negativos para *L. infantum* pelas técnicas parasitológicas (imprint, esfregaço sanguíneo e histologia) e moleculares (PCR e q-PCR);
- Avaliar a prevalência da infecção dos gatos do estudo a partir das técnicas sorológicas de RIFI e ELISA;
- Pesquisar amastigotas utilizando técnicas parasitológicas de esfregaço sanguíneo, histoquímica e imprint de órgãos (baço, fígado, linfonodo, rim e pele);
- Realizar a PCR de sangue, órgãos (baço, fígado, linfonodo, rim e pele) e células (conjuntivais, orais e nasais) em gatos sorologicamente positivos e negativos para *L. infantum*;
- Realizar a PCR em tempo real (q-PCR) para quantificar a carga parasitária de órgãos (baço, fígado, linfonodo, rim e pele) e de células (conjuntivais, orais e nasais) em gatos sorologicamente positivos e negativos para *L. infantum*;
- Avaliar a utilização da PCR de suabes (conjuntival, oral e nasal) para o diagnóstico da LF;

# MATERIAL E MÉTODOS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos laboratoriais sorológicos (RIFI e ELISA), parasitológicos (esfregaço e imprint) e moleculares (PCR) foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal - LASAB da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Unidade de Pesquisa de Bauru. O procedimento de histoquímica foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP de Ilha Solteira- FEIS/UNESP. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no Instituto Adolfo Lutz de Bauru – SP. O sequenciamento genético foi realizado pelo BPI - Biotecnologia Pesquisa e Inovação, pertencente ao grupo Genotyping Laboratório de Biotecnologia LTDA, Botucatu, SP.

#### 3.1. Organograma experimental

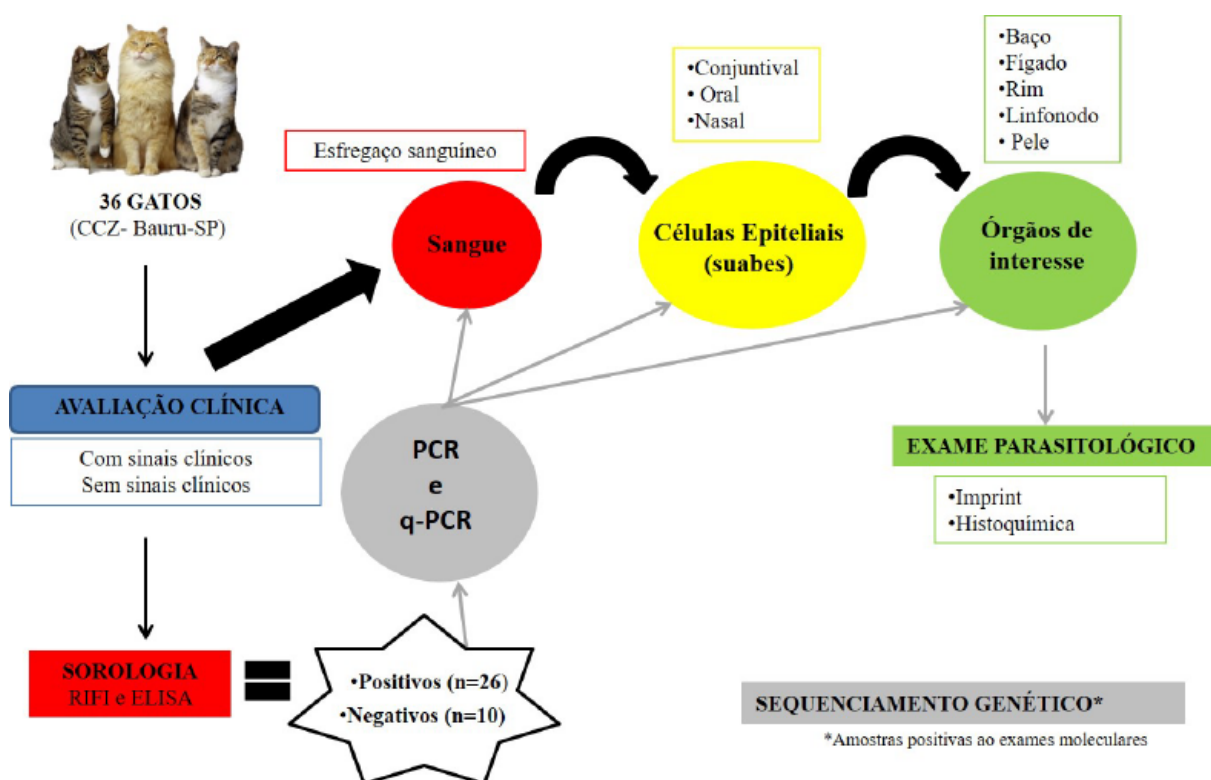


**Figura 1:** Organograma experimental do projeto de pesquisa.

### **3.2. Aspectos éticos**

O trabalho foi realizado mediante autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), protocolo 1096/2014 da Faculdade de Medicina de Botucatu –FMB/UNESP (Anexo 1).

### **3.3. Animais**

No total, neste estudo, foram incluídos 36 gatos adultos, domiciliados, 13 fêmeas e 23 machos, independente de raça, cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP, área endêmica para leishmaniose visceral. Estes eram indesejados pelos seus proprietários e foram encaminhados por eles ao CCZ para serem eutanasiados, além de animais atropelados em vias públicas e capturados pelo CCZ e que se apresentavam em estado terminal pela avaliação clínica.

Todos os animais cedidos, independente da presença ou não de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose, receberam avaliação clínica por médico veterinário. Todas as manifestações clínicas foram anotadas em uma ficha individual, contendo informações referentes à procedência, apresentação clínica, sexo, raça, idade e autorização do proprietário para eutanásia (Anexo 2).

Para a divisão dos grupos de animais, as amostras de soro foram submetidas aos testes diagnósticos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA para a confirmação da infecção natural por *L. infantum* e os mesmos foram divididos em:

Um grupo formado por 10 gatos com sorologia negativa para *L. infantum*, clinicamente normais ou com sinais clínicos;

Um segundo grupo formado por 26 gatos sorologicamente positivos, clinicamente normais ou com sinais clínicos.

### **3.4. Coleta e preparação do material para análise**

#### **3.4.1. Soro e sangue**

Após a avaliação clínica, os animais foram previamente anestesiados com

cloridrato de xilazina (1mg/kg) (Vetbrands®, Brasil), cloridrato de cetamina (10mg/kg) (Agener®, Brasil) e Diazepam (1mg/kg) (Hipolabor®, Brasil) por via intramuscular. De cada gato, foi colhido uma amostra de 5 ml de sangue pela veia jugular. Este material biológico foi fracionado em duas partes: a primeira em tubos secos para a obtenção do soro para a realização da triagem dos animais pelos testes sorológicos de RIFI e ELISA e a segunda parte em tubos com EDTA para a obtenção de sangue total para a realização das técnicas de PCR convencional e PCR em Tempo Real. As amostras foram acondicionadas em caixas de isopor sob refrigeração até a chegada ao laboratório e então mantidas a -20°C até o momento da realização dos testes.

#### 3.4.2. Esfregaço por extensão

Após a coleta, uma gota de sangue, foi depositada em lâminas de vidro, para realização de esfregaço por extensão e posteriormente foram coradas pela técnica de Giemsa. A leitura foi realizada sob microscopia óptica em objetiva de imersão (100X).

#### 3.4.3. Coleta de secreções oculares, nasal e oral

Para posterior realização de exames moleculares (PCR e qPCR), foram utilizados suabes estéreis para a coleta de células epiteliais das conjuntivas, secreção nasal e da mucosa oral (Figura 2). Os mesmos foram armazenados em microtubos estéreis e mantidos sob refrigeração a -20°C até o momento de uso.

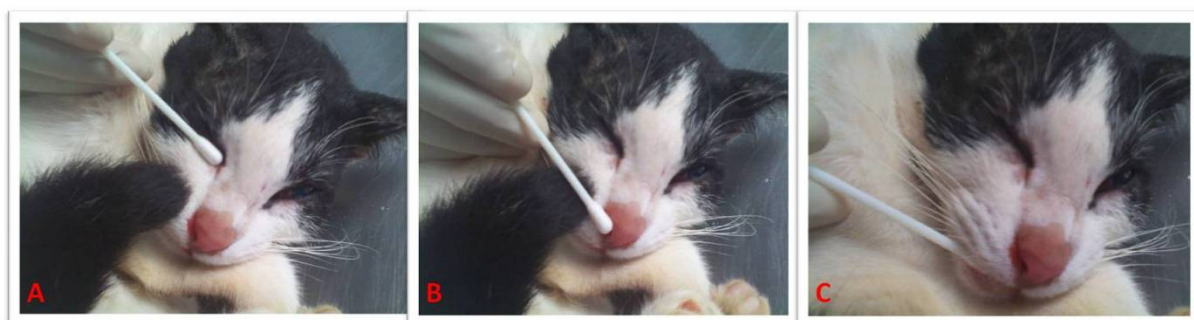


**Figura 2:** Coleta de células conjuntivais (A), nasal (B) e oral (C) de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.5. Exames sorológicos**

#### **3.5.1. Antígenos de *L. infantum***

Os antígenos para a sensibilização das lâminas de RIFI e placas de ELISA foram produzidos a partir de formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/IOC/2906) mantidas rotineiramente em estufa BOD a 26°C, em meio de cultura LIT e NNN (Anexos 3 e 4). A manutenção dos antígenos (Anexo 5), assim como sua obtenção para a confecção das lâminas para a técnica de RIFI (Anexo 6) e do antígeno bruto para a técnica de ELISA (Anexo 7), foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal – LASAB- da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Unidade de Pesquisa de Bauru.

#### **3.5.2. Técnica de Imunofluorescência indireta (RIFI) para *L. infantum***

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (78). Depois da leitura dos controles, procedeu-se a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se positivos as amostras de soro com título igual a 40. Os soros reagentes à diluição 1:40 foram avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em gatos (Anexo 8).

#### **3.5.3. Técnica de ELISA indireto para *L. infantum***

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Lima et al. (79) e adaptado por Costa et al. (52) para *Leishmania* spp. (Anexo 9).

Os valores da D.O dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove) como descrito por Machado et al. (80). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros NE foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (81).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de

referência negativos e positivos de acordo com a seguinte equação:

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}{\text{Absorbância média da amostra do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média da amostra do soro de referência negativo}}$$

### 3.6. Eutanásia

Após os exames sorológicos iniciais para determinação dos dois grupos, procedeu-se à eutanásia dos animais no CCZ. Assim, os gatos foram pré anestesiados e eutanasiados por aplicação intra-venosa de Tiopental Sódico (Laboratório Cristália®, Brasil) diluído a 2,5%, em quantidade suficiente para a obtenção de parada cardíaca e respiratória.

#### 3.6.1. Coleta dos órgãos de interesse

Após a eutanásia, foram colhidos fragmentos de baço, fígado, rim, linfonodo e pele (Figura 3). A partir dos fragmentos desses órgãos, foi realizada a técnica de imprint; outra parte foi mantida em RNA Later® Solution (Life Technologies®) para posteriores diagnósticos de PCR convencional e PCR em Tempo Real e outra parte fixada em formalina tamponada para as técnicas de histoquímica (Apêndice 1). Todos os materiais destinados ao diagnóstico molecular foram estocados em freezer a -20°C até a realização dos procedimentos.



**Figura 3:** (A) Realização da necropsia após a eutanásia dos animais procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru. (B) Coleta dos órgãos de interesse (linfonodo) para a realização dos diagnósticos. Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.7. Exames parasitológicos – Pesquisa de amastigotas**

#### **3.7.1. Imprint de órgãos**

Para a realização dos imprints, os fragmentos dos órgãos, após a coleta, foram pressionados contra lâminas de vidro previamente limpas, secas e desengorduradas. Em seguida, as lâminas foram coradas pelo método de Giemsa e visualizadas em microscopia óptica em objetiva de imersão (100X) (Apêndice 2).

#### **3.7.2. Histologia**

Após a eutanásia dos gatos, os fragmentos de 1 a 2 cm dos órgãos (pele de orelha, baço, fígado, linfonodo e rim) foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada 10% por até 24 horas. Os tecidos foram lavados em álcool 70% e desidratados por meios de passagens sucessivas em álcool 80%, 90% e 100%. Posteriormente, os tecidos foram submetidos ao processo de diafanização com xilol e pela impregnação com parafina para a confecção dos blocos histológicos, que foram armazenados à -20°C, até o momento do corte em micrótomo (Apêndice 3). Os processos de desidratação, diafanização e impregnação dos tecidos estão caracterizados no anexo 10.

Após a inclusão dos tecidos em parafina, os blocos foram submetidos à secção de cortes em micrótomo (LEICA RM2145®) com corte de 5 µm para montagem das lâminas histológicas, etapa realizada no Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP de Ilha Solteira. Cada fragmento cortado foi hidratado em água mantida a 40°C em uma malha para hidratação do corte e posteriormente fixados em lâminas microscópicas seladas com Poly-L-lysina (Poly-L-lysine solution P8920-SIGMA-ALDRICH®). As lâminas foram submetidas à técnica padrão de histologia e coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), para a investigação tecidual.

Os fragmentos de órgãos coletados durante o exame necroscópico passaram pelo seguinte processo para inclusão em parafina histológica: Os cortes fixados em lâminas foram hidratados, diafanizados, submetidos aos HE e desidratados. Após esses procedimentos, montou-se a lâmina com lamínula fixando-a com Bálsamo do Canadá (Anexo 11). A pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada sob microscopia óptica (40X), em três secções do tecido, realizada em duplicata, a partir de cada uma das amostras (Figura 4).



**Figura 4:** Preparação das lâminas de histoquímica para realização das leituras. (A) Corte dos blocos de parafina em micrótomo; (B) Captura dos cortes dos tecidos em parafina para lâminas; (C) Cortes em lâminas submetidos à coloração em H.E.; (D) Lâminas coradas e fixadas em Bálsamo do Canadá; (E) Observação das lâminas em microscopia óptica. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.8. Exames Moleculares (PCR e q-PCR)

#### 3.8.1. Extração de DNA

##### 3.8.1.1. Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em sangue

A purificação do DNA do sangue foi realizada com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®), seguindo recomendações do fabricante (Anexo 12). Os DNAs extraídos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

##### 3.8.1.2. Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em tecidos

Os fragmentos armazenados após a eutanásia, em microtubos estéreis contendo RNA Later®, foram posteriormente macerados em cadinho de porcelana em solução de PBS pH 7,4 (Figura 5). Após a maceração, foi realizada a extração do DNA desse conteúdo com o Kit comercial Illustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin (Ge Healthcare®), seguindo recomendações do fabricante (Anexo 13). Os DNAs extraídos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

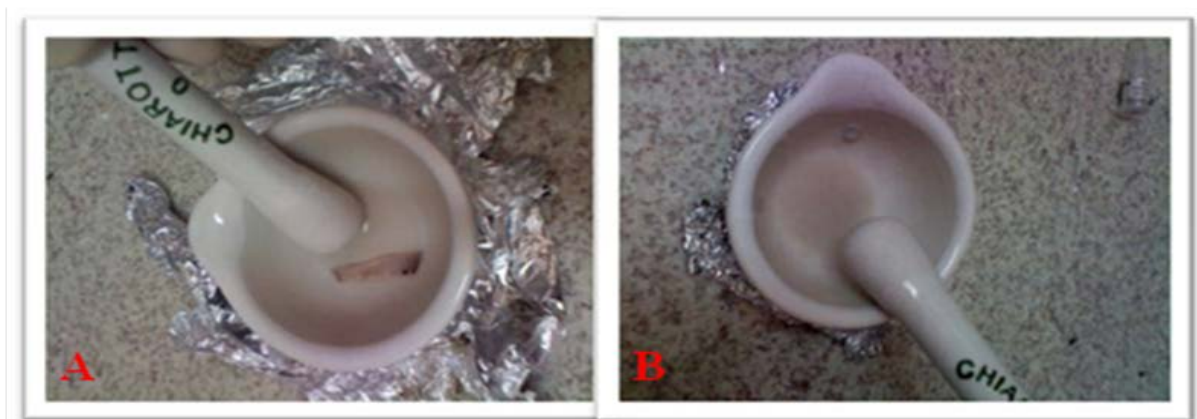


**Figura 5:** Maceração de órgãos de gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP, em cadinho de porcelana com solução de PBS estéril. Em (A) antes, (B) depois. Fonte: Arquivo pessoal.

#### 3.8.1.3. Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em suabes conjuntivais, orais e nasais.

As células epiteliais das conjuntivas, cavidade oral e nasal coletadas com o auxílio de suabes estéreis, foram armazenados em microtubos estéreis em refrigeração até o momento da extração. A extração de DNA dos suabes foi realizado de acordo com Lahiri & Nurnberger (82) adaptado por Oliveira et al. (65). (Anexo 14).

#### 3.8.1.4. Quantificação das amostras de DNA

A quantificação de todas as amostras foi realizada após a extração de DNA, com a utilização do quantificador (Nanovue, GE Healthcare Bio-Sciences®/UK). Após a calibração do aparelho, adicionou-se 2 µL de cada amostra de DNA extraído e acionou-se a leitura pelo Software para a obtenção dos resultados.

#### 3.8.1.5. Avaliação da inibição da PCR e integridade do DNA extraído

Para verificar a integridade das amostras utilizadas, foi realizada uma PCR para detectar a presença de inibidores da reação em todas as amostras de DNA dos animais. Para isso, foram utilizados *primers* específicos para amplificação do gene constitutivo, que trata-se do gene da enzima que participa do processo de glicólise das células em mamíferos, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), GAPDHF 5' AGGCTGAGAACGGGAACTT3'; GAPDHR 5' ATTAAGTTGGGGCAGGGACT3'.

As reações PCR-MIX (em duplicatas) foram realizadas com o kit comercial Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) com as seguintes concentrações, preparadas em cada tubo de reação de 0,2 mL: 8,3 µL de água ultrapura (MIX-PCR), tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer* (10 µM), 1U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 1 µL da amostra testada. Dessa forma, cada microtubo recebeu 11 µL do MIX-PCR e 1 µL da amostra de DNA.

A amplificação consistiu em um ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 minutos (83).

### **3.8.2. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de sangue, tecidos e suabes para *Leishmania* spp.**

As reações PCR-MIX (em duplicatas) foram realizadas com o kit comercial Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) com as seguintes concentrações, preparadas em cada tubo de reação de 0,2 mL: 8,3 µL de água ultrapura (MIX-PCR), tampão de PCR (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer* (10 pMol), 1U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 1 µL da amostra testada. Dessa forma, cada microtubo recebeu 11 µL do MIX-PCR e 1 µL da amostra de DNA. As condições de amplificação foram realizadas em termociclador (EPPENDORF Martercyclers Pro®).

Foram utilizados dois diferentes pares de *primers*, ITS-1 e ITS-2 (ITS- Internal Transcribed Spacers), que amplificam regiões variáveis do DNA ribossomal, os quais estão entre as regiões conservadas (SSU- Subunidade menor/ LSU- Subunidade maior) e ambos são referentes à detecção de DNA de tripanosomatídeos, com a detecção das regiões ITS específicas em fragmentos de DNA de *Leishmania*:

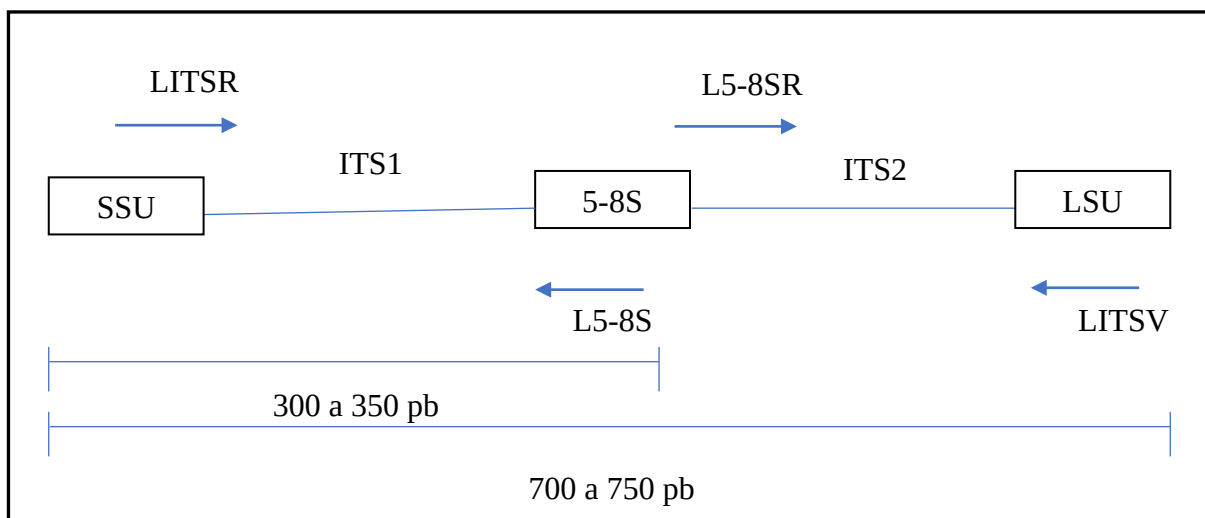


**Figura 6:** Representação do espaço de transcrição interno (ITS-1 e ITS-2) da região ribossomal. Adaptado de El Tai et al. (84).

Inicialmente utilizaram-se os *primers* ITS1- LITSR 5'CTGGATCATTTCCTCGATG3'; L5-8S 5' TGATACCACTTATCGCACTT3', os quais amplificam sequências da família Trypanosomatidae, cujos produtos resultantes de 300 a 350 pares de base (pb) de comprimento, correspondem às espécies de *Leishmania*. Também foi utilizado os *primers* ITS2- LITSV 5'ACACTCAGGTCTGTAAAC3'; L5-8SR 5'AAGTGCGATAAGTGGTA3', que também amplificam sequências da família Trypanosomatidae, sendo que a região correspondente ao gênero *Leishmania* está entre 700 a 750 pb. Ambos foram descritos por El Tai et al. (84) e possuem o seguinte perfil de ciclagem: desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e uma extensão final de 72°C durante 6 minutos.

Outro par de *primers* utilizado neste trabalho foi originalmente desenhado para sua utilização na técnica de HRM (High-Resolution Melting) (85). Existem outros trabalhos que o utilizam na PCR convencional, e ele foi desenvolvido a partir de estudos de moléculas presentes no parasito, como a proteína de choque térmico – Heat Shock Proteins 70 - (HSP70), a qual é de importância vital para as leishmanias, e que são altamente expressadas durante sua passagem do vetor para o reservatório vertebrado (86). Além disso, esses *primers* possuem alta capacidade de multiplicação de cópias do genoma de *Leishmania*, aumentando a sensibilidade da técnica.

A amplificação com os *primers* (HSP70): HSP70F: 5'AGGTGAAGGCGACGAACG3'; HSP70R: 5'CGCTTGTCCATCTTTGCGTC3',

consistiu em um ciclo inicial de 94 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 61 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido de uma extensão final a 70 °C por 10 minutos, segundo Hernández et al. (85).

Foram utilizadas cepas de *L. infantum* (MHOM/BR/IOC/2906) como controle positivo da reação e água ultrapura como controle negativo.

### 3.8.3. Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2µL da solução tampão de corrida com azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X. O gel para eletroforese foi preparado com 1,5g de agarose pura em 50mL de tampão Tris-EDTA-Borato (TBE) 0,5X. A agarose foi dissolvida em TBE previamente aquecido, e foi adicionado 5µL do SYBER Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) na concentração de 0,1µL/mL para a coloração dos fragmentos de DNA. A corrida foi realizada em 100 volts por 50 minutos (Electrophoresis Power Supply EPS 301). Ao final, as bandas foram visualizadas em transiluminador ultraviolet (MS Major Science® UVDI). DNA extraídos de cepas de *L. infantum* (MHOM/BR/IOC/2906) mantidas em meio NNN-LIT foram os controles positivos e a água ultrapura, o controle negativo. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder (LowRanger 100bp DNA Ladder /NORGEN). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta (296 nm), sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo.

### 3.8.4. PCR em Tempo Real (Sangue, Tecidos e Suabes)

O procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz, Regional Bauru, São Paulo. Para a determinação da carga parasitária do sangue, órgãos coletados (pele, baço, rins, fígado e linfonodo) e suabes (conjuntival, oral e nasal), foi utilizado o sistema SYBR®Green Applied, por meio do equipamento StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems®) e para a amplificação do gene codificador da

proteína de choque térmico (HSP70) foram utilizados os seguintes *primers*: HSP70F 5'AGGTGAAGGCGACGAACG3'; HSP70R 5'CGCTTGTCCATCTTTGCGTC3', segundo Hernández et al. (85). As reações foram realizadas em placas de 96 poços (MicroAmp®Optica 96- Well Reaction Plate with Barcode – Applied Biosystems by LifeTechnologies, EUA), lacradas com adesivos ópticos (Optical Adhesive Covers – Applied biosystems, EUA). Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de cepas de leishmanias procedentes da Coleção de leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC FIOCRUZ – RJ, nas concentrações decrescentes de  $10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0$  parasitas/ml. O número de parasitas por grama de tecido foi obtido pela fórmula  $(FN \times 1000)/80$ , tendo-se o fator de normalização (FN) obtido por:

$$\text{Fator de Normalização (FN)} = \frac{\text{Concentração de DNA da curva-padrão}}{\text{Concentração de DNA da amostra}} \times \text{Nº de amplicons}$$

### 3.9. Sequenciamento Genético

Os amplicons foram avaliadas em gel de agarose 1% e purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). Posteriormente foi realizada a quantificação dos produtos purificados em um quantificador de DNA (NanoDrop™ Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific).

A reação de sequenciamento automático foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI35000- Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizada com a utilização do EMBOSS/Merger, Chromas Lite, MultAlin e programa Clustal W do software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0 do Windows® (87), NCBI (National Center for Biotechnology Information) e submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), comparados com as sequências depositadas nos bancos de dados GenBank.

## 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram construídas tabelas de contigência e calculados o coeficiente Kappa e seu respective intervalo de confiança de 95% (88), para verificar a concordância dos resultados de

RIFI e ELISA com as demais técnicas diagnósticas (parasitológicas e moleculares), além da presença e ausência de sinais clínicos. Com os dados obtidos, foram calculados a acurácia dos testes e seu respectivo intervalo de confiança. Para estas avaliações, foi utilizado o programa SPSS Windows versão 21.

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação Clínica

Durante o exame físico dos animais (Figura 7), foi observada e anotada em fichas individuais quaisquer alterações, e as mesmas foram divididas em categorias de acordo com a intensidade:

- Sem sinais clínicos: 5 (cinco) animais (5/36 - 13,9%);
- Com sinais clínicos: 31 animais (31/36 - 86,1%) com uma ou mais apresentações clínicas.



**Figura 7:** Apresentação clínica em gatos domésticos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Verificam-se alterações cutâneas, com descamações e presença de úlceras, principalmente em região de face (orelhas e focinho). Fonte: Arquivo pessoal.

As alterações clínicas foram classificadas de forma quantitativa e separadas de acordo com a quantidade encontrada em cada animal (Figura 8).

### AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS GATOS DOMÉSTICOS

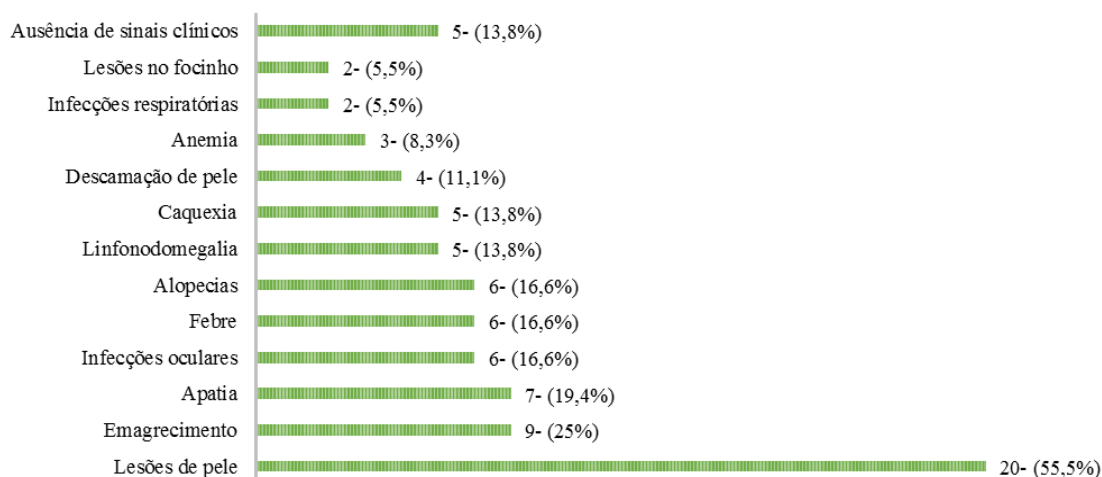


**Figura 8:** Alterações clínicas avaliadas em gatos domésticos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

## 5.2. Diagnósticos Sorológicos

### 5.2.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Dos 36 soros dos animais submetidos à triagem, 24 foram reagentes à RIFI (24/36- 66,7%), com 17 (17/24 - 70,8%) animais com título 40, seis (6/24 - 25%) com título 80 e um (1/24 - 4,2%) animal com título igual a 160 (Figura 9).

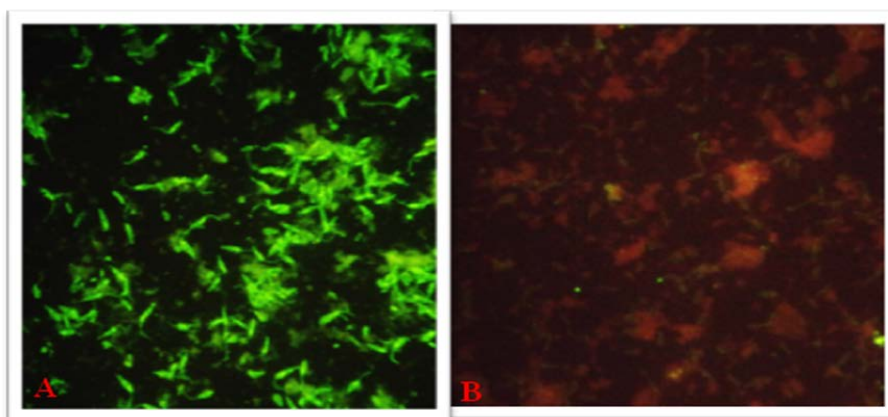


**Figura 9:** Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva (A) e negativa (B) de gatos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Aumento de 40X. Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.2.2. ELISA indireto

A partir da triagem realizada pelo ELISA, 22 soros de animais foram reagentes à técnica (22/36- 61,1%), tendo-se um (01) animal com N.E= 3, três (03) animais com N.E=4, quatro (04) animais com N.E=5, dez (10) animais com N.E=6, dois (02) animais com N.E= 7, um (01) animal com N.E= 8 e um (01) animal com N.E=9, como pode ser verificado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Níveis ELISA obtidos a partir de soros de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

| Nível ELISA (N.E) | Nº de animais |
|-------------------|---------------|
| 1                 | 14            |
| 2                 | -             |
| 3                 | 1             |
| 4                 | 3             |
| 5                 | 4             |
| 6                 | 10            |
| 7                 | 2             |
| 8                 | 1             |
| 9                 | 1             |

Ponto de corte:  $N.E \geq 2$  Voller et al., (81)

Os resultados dos testes sorológicos de RIFI e ELISA apresentaram boa concordância e acurácia entre si ( $K = 0,64$ ). Houve discordância em apenas quatro amostras positivas somente à RIFI e de duas amostras positivas somente ao ELISA (Apêndice 4 e Figura 10).

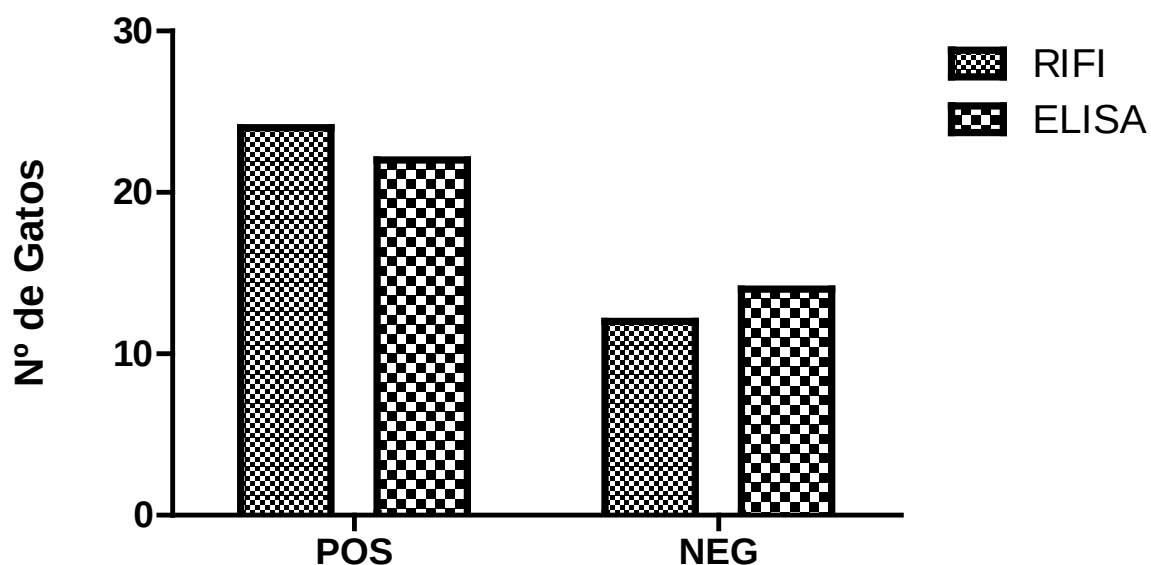


**Figura 10:** Apresentação dos resultados das técnicas sorológicas de RIFI e ELISA realizadas a partir dos soros de gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP

Foi observada a ocorrência de sorologia positiva tanto em animais com sinais clínicos (21/31), quanto em animais sem sinais clínicos (5/5), assim como a sorologia negativa em gatos com sinais clínicos (10/31) (Tabela 2). Houve fraca concordância entre resultados sorológicos e presença ou ausência de sinais clínicos ( $K = -0,21$ ).

**Tabela 2:** Associação entre resultados sorológicos e sinais clínicos em gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

|                           | Sorologia Positiva | Sorologia Negativa |
|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Gatos com Sinais Clínicos | 21                 | 10                 |
| Gatos sem Sinais Clínicos | 5                  | 0                  |

### 5.3. Diagnósticos parasitológicos

#### 5.3.1. Esfregaço sanguíneo

Das lâminas de esfregaços sanguíneos, em duplicata, dos 36 animais, verificou-se formas sugestivas de amastigotas em 12 lâminas (12/36- 33,3%). (Figura 11).

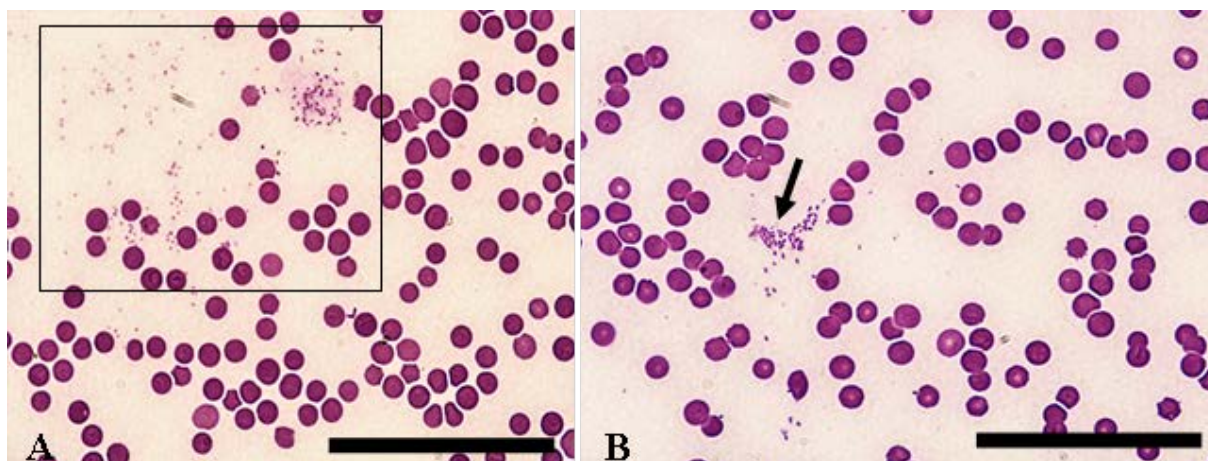


**Figura 11:** Esfregaço sanguíneo em gato procedente do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Em A, destaque de inúmeras formas sugestivas de amastigotas (aumento de 100X), e em B aglomerado de formas suspeitas de amastigotas (aumento de 100X). Coloração de Giemsa. Microscopia óptica. Escala 50µm. Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.3.2. Imprint

A partir da observação, em duplicata, das lâminas de imprint de órgãos, dos 36 animais, foi possível identificar a presença de formas sugestivas de amastigotas em órgãos de quatro (04) animais (11,1%) (Figura 12), tendo-se verificado em dois (02) animais a partir do imprint de linfonodo, em um (01) animal em imprint de baço e em um (01) animal em imprint de pele de orelha.

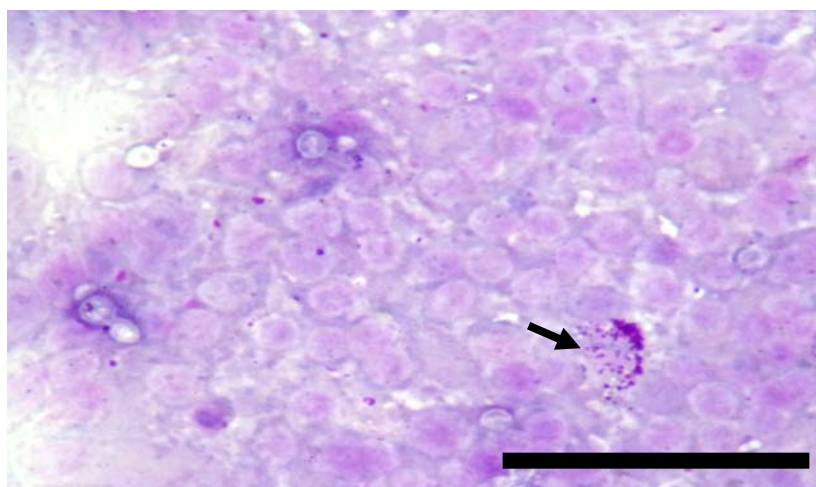


**Figura 12:** Formas sugestivas de amastigotas observadas pela técnica parasitológica direta de imprint a partir de fragmentos de linfonodo de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Coloração de Giemsa. Microscopia óptica aumento de 100X. Escala 50µm. Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.3.3. Histoquímica

Da observação das lâminas de histoquímica dos tecidos de pele, baço, fígado, rim e linfonodo dos 36 gatos, realizada em triplicata, foram encontradas formas amastigotas em 14 diferentes tecidos, procedentes de 12 animais (12/36- 33,3%). A maior sensibilidade se deu pela observação da pele (8/12-66,6%), seguida do baço (4/15-26,7%) e linfonodo (2/15-13,3%). Não houve positividade pelo rim e fígado. As formas amastigotas encontradas nos tecidos de linfonodo e pele podem ver visualizadas nas figuras 13 e 14.

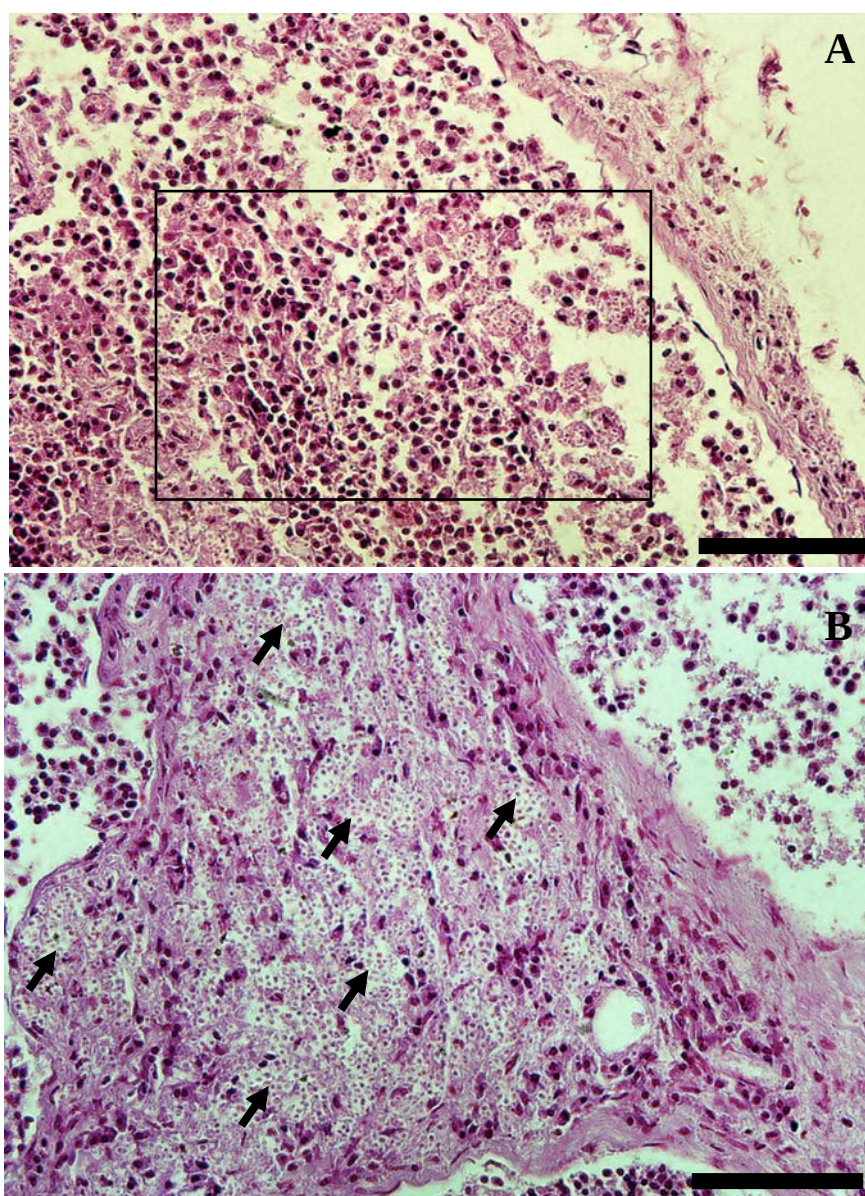


**Figura 13:** Histoquímica a partir de fragmentos de linfonodo de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Em A, o quadro destaca inúmeras formas amastigotas no tecido. Em B, setas indicam ninhos de amastigotas dispersos no tecido. Coloração H.E. Microscopia óptica- aumento de 40X. Escala 50µm. Fonte: Arquivo pessoal.

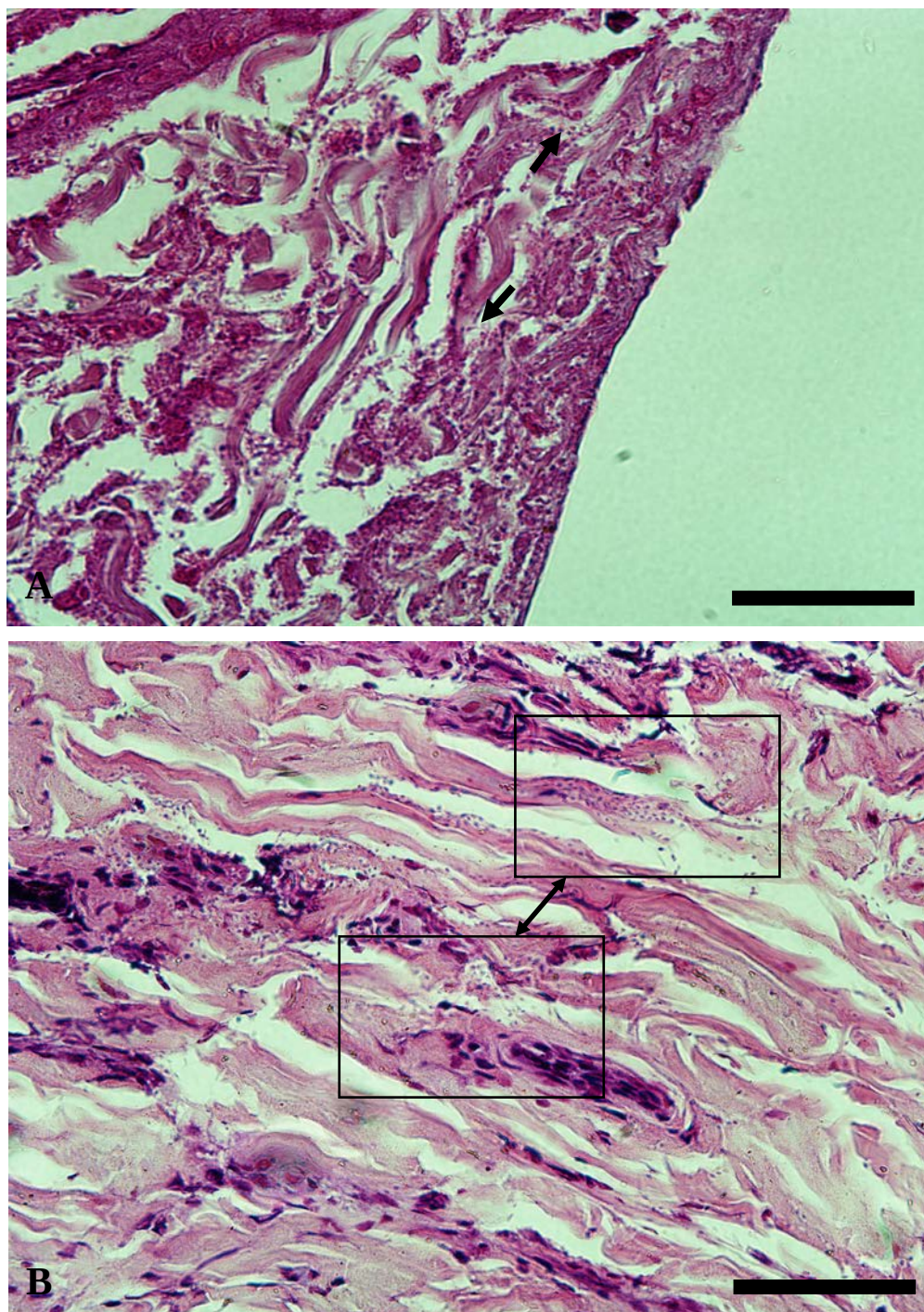


**Figura 14:** Histoquímica a partir de fragmentos de pele de orelha de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Em A nota-se formas amastigotas disseminadas por todo o tecido. Em B, os quadros destacam a disseminação de amastigotas. Coloração H.E. Microscopia óptica - aumento de 40X. Escala 50µm. Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados gerais dos três diagnósticos parasitológicos (esfregaço, imprint e histoquímica) podem ser visualizados na Tabela 3. As técnicas de histoquímica e esfregaço apresentaram a mesma positividade (12/36- 33,3%), seguida do imprint (4/36- 11,1%) (Figura 15). A tabela com os resultados parasitológicos de cada animal encontra-se no Apêndice 5.

## Técnicas parasitológicas

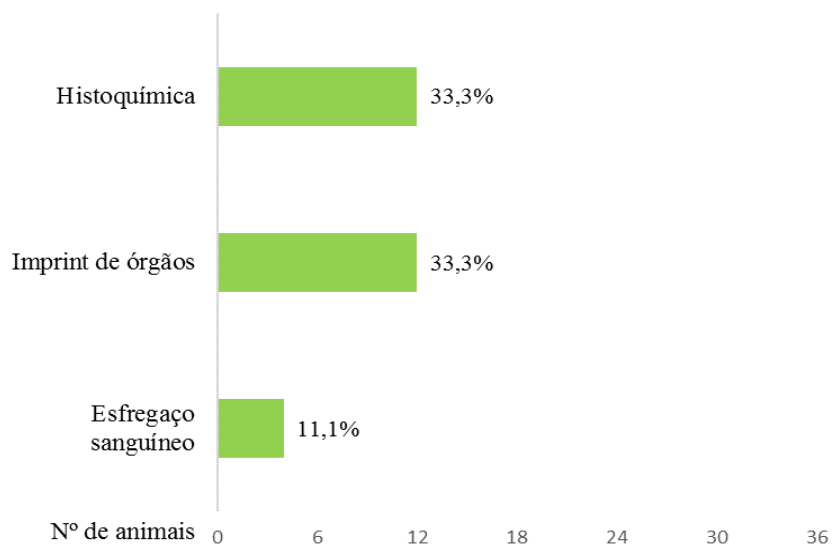


**Figura 15:** Apresentação geral dos resultados positivos dos testes diagnósticos de esfregaço, imprint e histoquímica dos gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

**Tabela 3:** Esfregaço, imprint de órgãos e histoquímica a partir de tecidos dos gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

| Técnicas Parasitológicas |        |                   |        |                      |     |           |              |        |                      |     |           |
|--------------------------|--------|-------------------|--------|----------------------|-----|-----------|--------------|--------|----------------------|-----|-----------|
| Esfregaço                |        | Imprint de órgãos |        |                      |     |           | Histoquímica |        |                      |     |           |
| Gato                     | Sangue | Baço              | Fígado | Pele<br>de<br>orelha | Rim | Linfonodo | Baço         | Fígado | Pele<br>de<br>Orelha | Rim | Linfonodo |
| 1                        | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | P                    | -   | -         |
| 2                        | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 3                        | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | P                    | -   | -         |
| 4                        | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | P                    | -   | -         |
| 5                        | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 6                        | -      | S                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 7                        | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | P                    | -   | -         |
| 9                        | S      | -                 | -      | S                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 10                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | P                    | -   | -         |
| 13                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | P            | -      | P                    | -   | -         |
| 14                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | P            | -      | -                    | -   | -         |
| 15                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | P                    | -   | -         |
| 16                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | S         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 17                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | S         | -            | -      | -                    | -   | P         |
| 19                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 20                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | P            | -      | P                    | -   | -         |
| 21                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 24                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 26                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | P         |
| 27                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 30                       | S      | -                 | -      | -                    | -   | -         | -            | -      | -                    | -   | -         |
| 31                       | -      | -                 | -      | -                    | -   | -         | P            | -      | -                    | -   | -         |

Legenda: P: Positivo; -: Negativo; S: Suspeito; Gatos 8, 11, 12, 18, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36: Negativos a todas as provas parasitológicas.

A partir dos resultados dos diagnósticos parasitológicos, observamos formas sugestivas de amastigotas no tecido e/ou sangue tanto em animais reagentes quanto em animais não reagentes às técnicas sorológicas de RIFI e ELISA, porém a concordância entre os testes sorológicos e a positividade entre os testes parasitológicos foi fraca ( $K = 0.03$ ). (Apêndice 6). Tais resultados podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Apresentação geral dos resultados sorológicos e parasitológicos de gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP.

| Nº de Animais | Resultado Sorológico | Resultado Parasitológico |             |           |                |
|---------------|----------------------|--------------------------|-------------|-----------|----------------|
|               |                      | RIFI/ELISA               | Esfregaço + | Imprint + | Histoquimica + |
| 26            | Reagente             | 8                        | 3           | 8         | 19             |
| 10            | Não Reagente         | 4                        | 1           | 4         | 9              |
| Kappa         |                      | 0,00                     | 0,03        | 0,03      | Fraca (<0,20)  |

+: Exame positivo

#### 5.4. Diagnóstico Molecular

##### 5.4.1. Quantificação do DNA de sangue e tecidos

A quantificação das amostras de sangue e tecidos dos gatos do CCZ de Bauru foi realizada após a extração do DNA (Apêndice 7).

##### 5.4.2. PCR

###### 5.4.2.1. PCR de cepas controles positivos (LIT5R/L5-8S e LITSV/L5-8SR)

Os *primers* utilizados LITSR/ L5-8S da região ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1) e LITSV/ L5-8SR da região ITS-2, amplificam sequência de fragmentos de gêneros da Família Trypanosomatidae (84). Tendo isso em vista, foi realizado uma PCR com as 13 diferentes cepas de *Leishmania*, que são mantidas em laboratório em estufa B.O.D a 25°C em meio de NNN acrescido de LIT. Utilizou-se água ultrapura como controle negativo. Notar que os produtos amplificados variaram de 300 a 400 pb com o primer ITS-1 e 700 a 800 pb com o

ITS-2, de acordo com a espécie de *Leishmania*. (Figura 16 e 17).

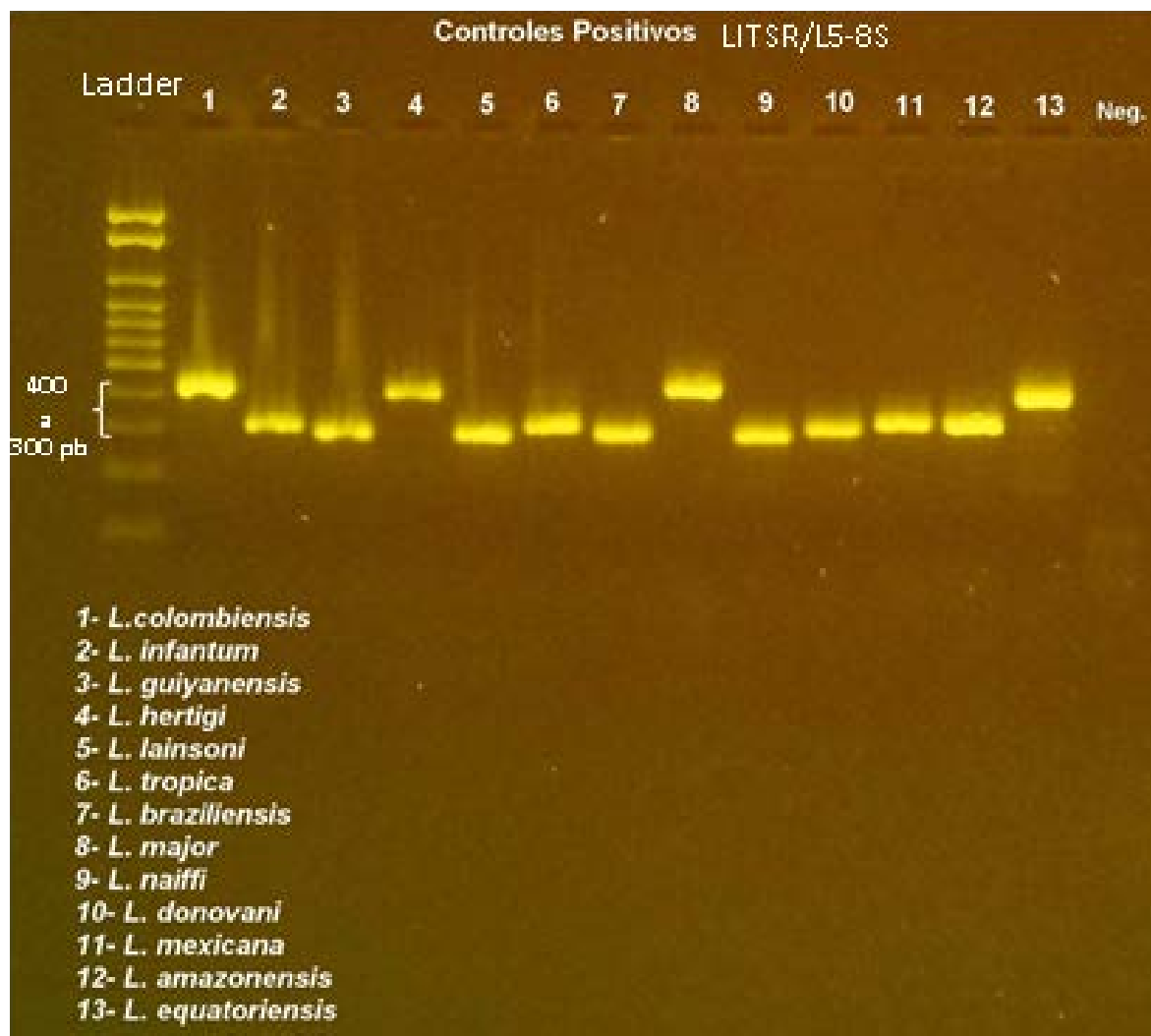


**Figura 16:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-1) para 13 espécies de *Leishmania* mantidas em meio de cultura. Notar que houve uma variação dos pares de base de acordo com a espécie de leishmania (300 a 400 pb). Utilizou-se água ultrapura como controle negativo. Fonte: Arquivo pessoal.

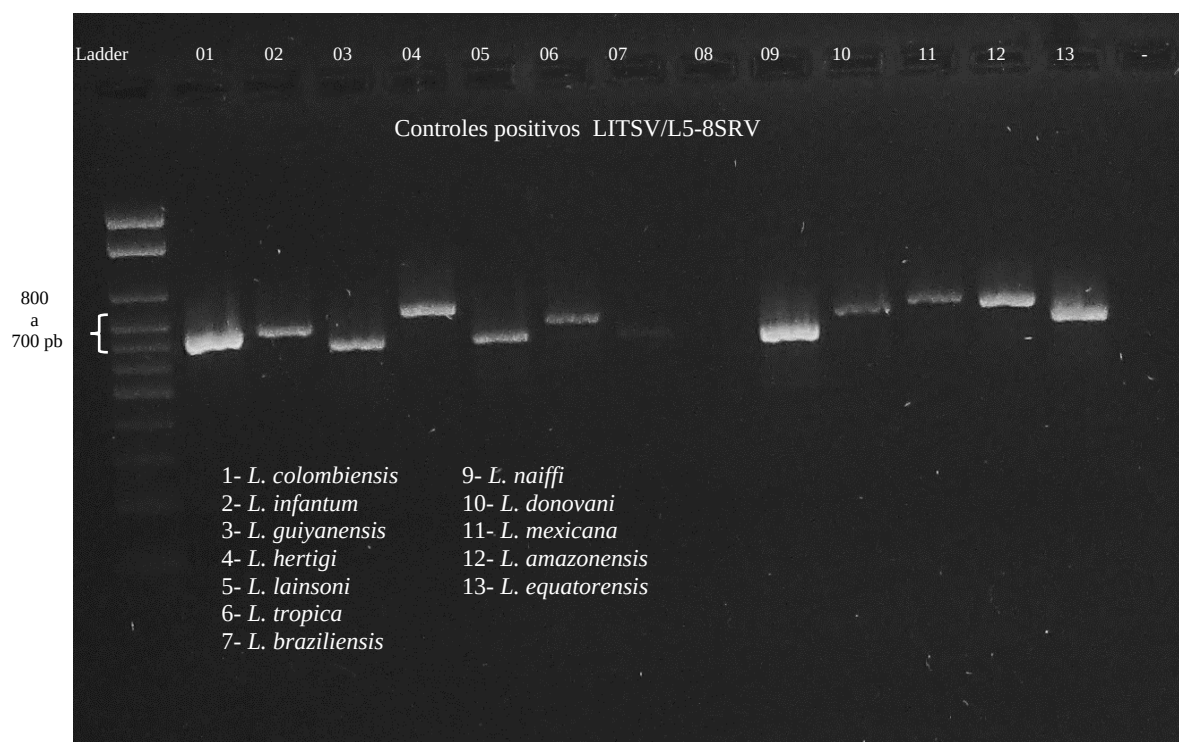


**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-2) para 12 espécies de *Leishmania* mantidas em meio de cultura. Notar que houve uma variação dos pares de base de acordo com a espécie de *Leishmania* (700 a 800 pb). Utilizou-se água ultrapura como controle negativo. Fonte: Arquivo pessoal.

#### 5.4.2.2. PCR de sangue total (LIT5R/L5-8S, LITSV/L5-8SR e HSP70)

Pelo diagnóstico molecular com a utilização dos três pares de *primers* (LIT5R/L5-8S, LITSV/L5-8SR e HSP70), foi possível identificar amplificações de fragmentos de DNA em sangue de 13 animais (36,1%) com o primer ITS e de 15 animais (41,6%) com o primer ITS-2. A concordância entre os diagnósticos sorológicos com a PCR de sangue foi fraca ( $K=0,07$ ). Nas figuras 18 e 19 podem ser observadas as amplificações do DNA de 13 e 15 animais com fragmentos de cerca de 250 e 650 pb, respectivamente (Tabela 5).

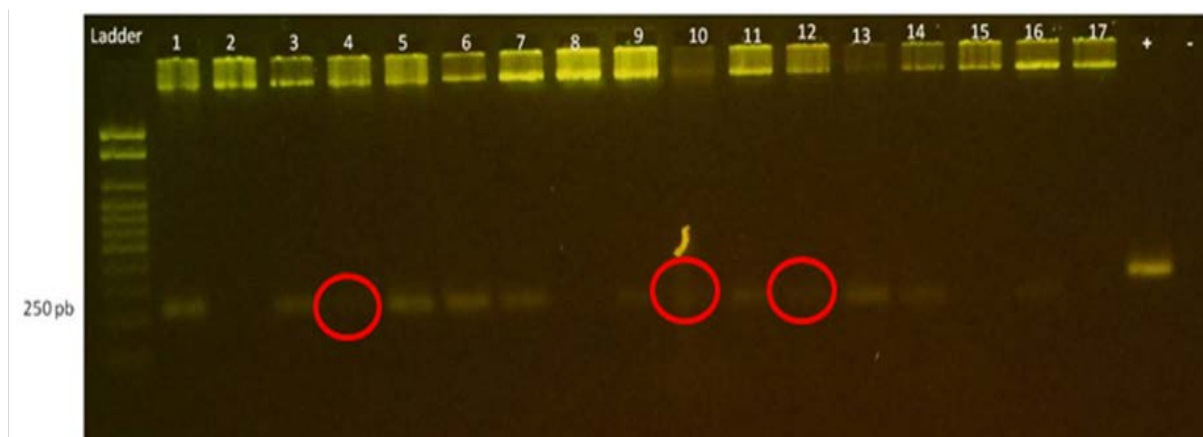


**Figura 18:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-1) para *Leishmania* spp. em amostras de sangue total de 13 gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). + (controle positivo: *L. infantum*), - (controle negativo: água ultrapura). As amostras 4, 10 e 12 (destacadas) apresentam bandas fracamente positivas. Fonte: Arquivo pessoal.

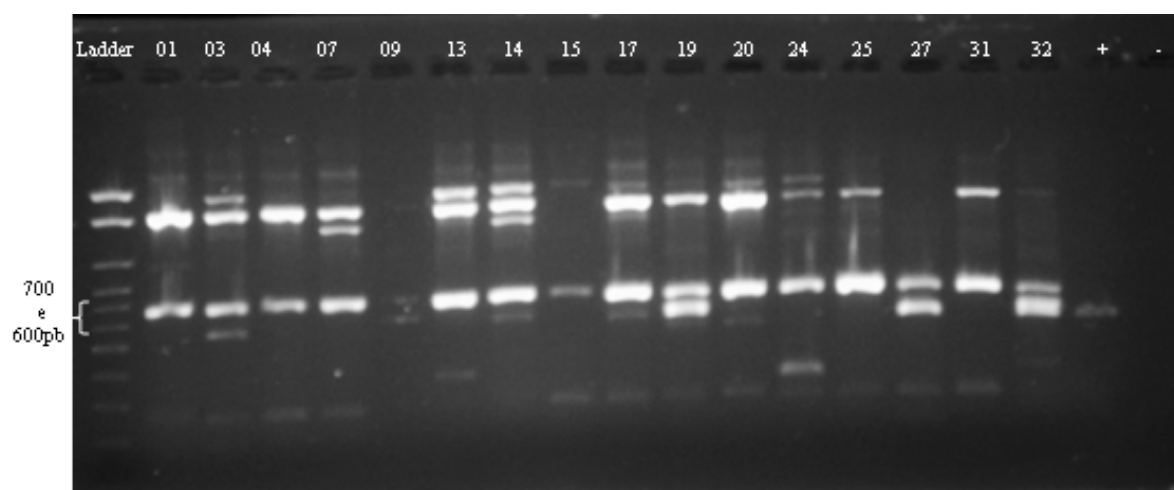


**Figura 19:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-2) para *Leishmania* spp. em amostras de sangue total de 15 gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). + (controle positivo: *L. infantum*), - (controle negativo: água ultrapura). Fonte: Arquivo pessoal.

#### 5.4.2.3. PCR de tecidos (LIT5R/L5-8S, LITSV/L5-8SR e HSP70)

A partir da PCR dos tecidos (baço, rim, fígado, linfonodo e pele de orelha), foi possível observar amplificações em sete animais (7/36- 19,4%). Houve a detecção a partir de fragmentos de baço de seis animais (16,7%) e de pele de orelha de dois animais (5,5%)

(Tabela 5). Na Figura 20, pode-se observar a amplificação de 330 pares de bases do DNA a partir de baço de quatro animais. Na Figura 21, pode-se visualizar a amplificação de quatros das seis amostras positivas de baço, com a utilização dos primers HSP70 e na Figura 22, a amplificação das duas amostras de pele com os *primers* ITS-2. A concordância entre os testes sorológicos e PCR de baço e pele foi fraca, com índice Kappa=0,09 e -0,02, respectivamente.

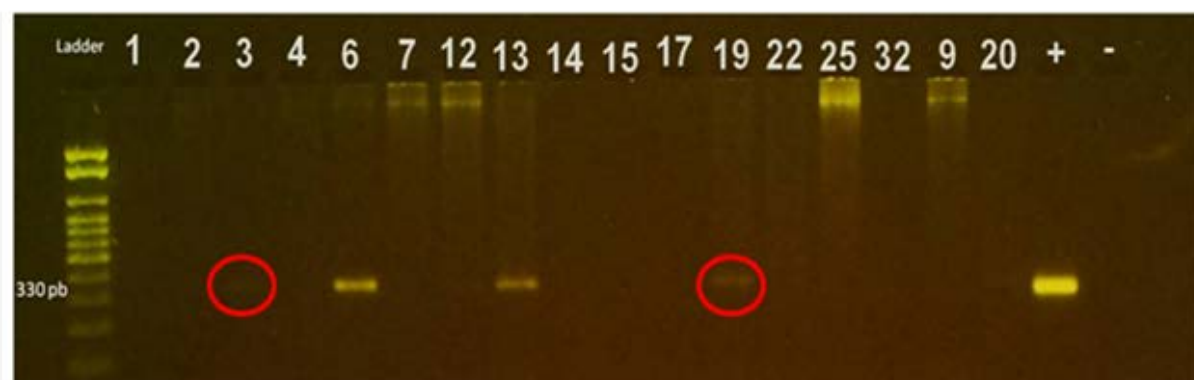


**Figura 20:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-1) para *Leishmania* spp. em amostras de fragmentos de baço de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). + (controle positivo: *L. infantum*), - (controle negativo: água ultrapura). As amostras 3 e 6 (destacadas) apresentam bandas fracamente positivas. Fonte: Arquivo pessoal.

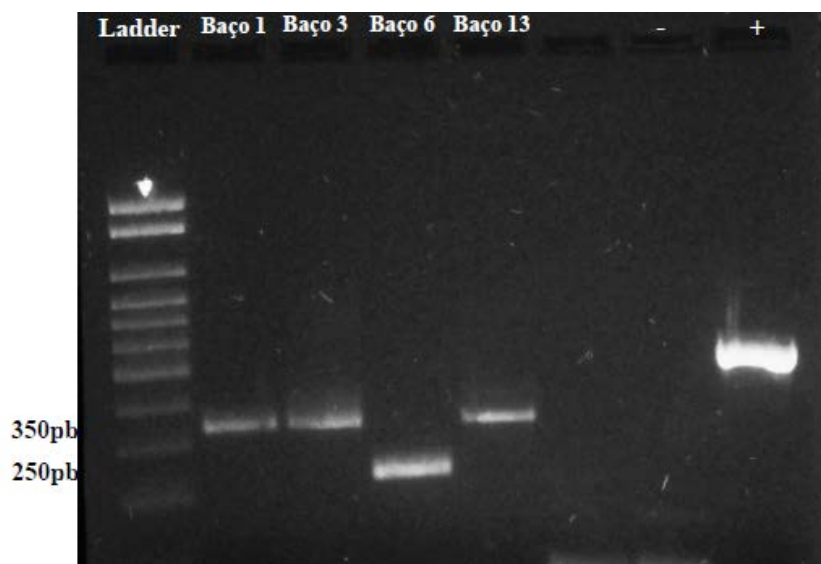


**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (HSP70) para *Leishmania* spp. em amostras de fragmentos de quatro dos seis baços positivos de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). + (controle positivo: *L. infantum*), - (controle negativo: água ultrapura). Fonte: arquivo pessoal.

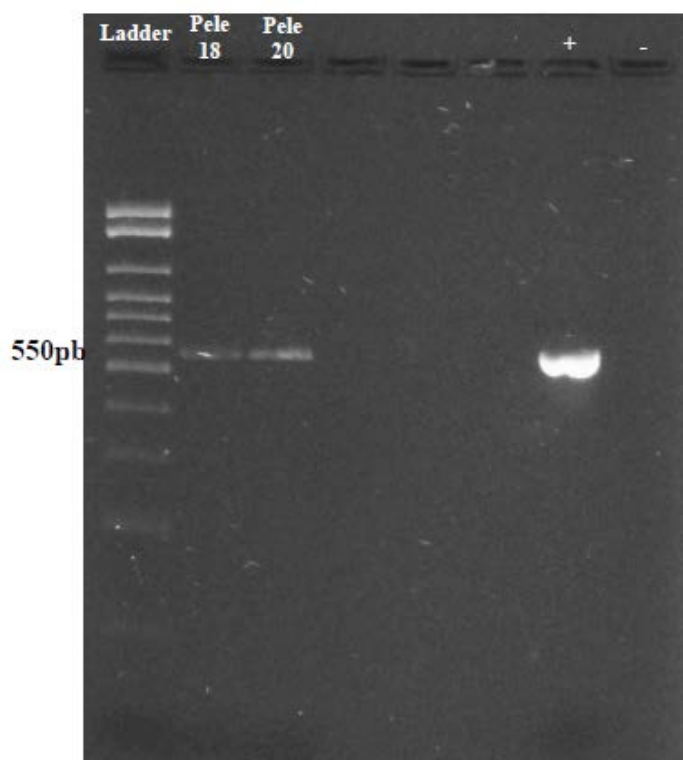


**Figura 22:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-2) para *Leishmania* spp. em amostras de fragmentos de pele de orelha de dois gatos positivos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). + (controle positivo: *L. infantum*), - (controle negativo: água ultrapura). Fonte: Arquivo pessoal.

#### 5.4.2.4. PCR de suabes conjuntival, oral e nasal (ITS-1 e HSP70)

A partir da detecção molecular de células epiteliais colhidas por meio de suabes da conjuntiva, da cavidade oral e nasal, foi possível obter a positividade em amostras de DNA de quatro animais (4/36- 11,1%) a partir de suabes conjuntivais, sendo uma amostra de células epiteliais do olho direito e três amostras de olho esquerdo (Figura 23). A concordância entre os testes sorológicos e PCR de suabes foi pobre ( $K = 0,09$ ). Não houve positividade a partir dos suabes de epitélios orais e nasais (Tabela 6).

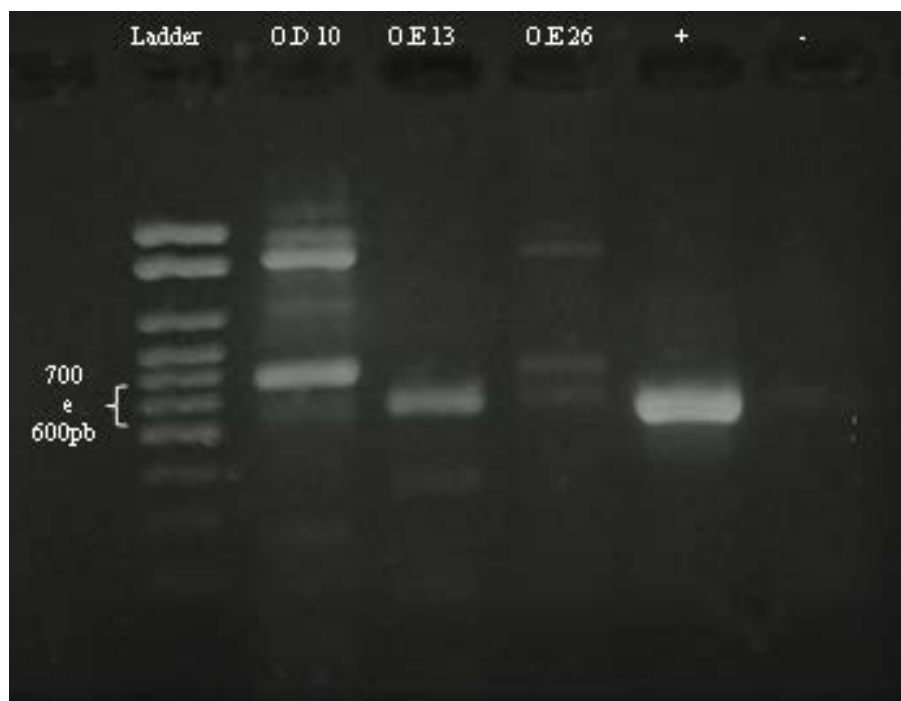


**Figura 23:** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores (ITS-2) para *Leishmania* spp. em amostras de suabes conjuntivais de três dos quatro gatos positivos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). + (controle positivo: *L. infantum*), - (controle negativo: água ultrapura). Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados dos exames moleculares a partir do DNA de todos os animais podem ser visualizados no Apêndice 8.

**Tabela 5:** Resultados moleculares de PCR a partir de amostras de sangue, tecidos e suabes de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

| <b>Diagnóstico Molecular pela técnica de PCR em gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP</b> |                 |      |        |           |                |     |                 |                 |      |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------|--------|-----------|----------------|-----|-----------------|-----------------|------|-------|
| Gato                                                                                     | PCR dos tecidos |      |        |           |                |     | PCR dos suabes  |                 |      |       |
|                                                                                          | Sangue          | Baço | Fígado | Linfonodo | Pele de orelha | Rim | Conjuntiva O.D. | Conjuntiva O.E. | Oral | Nasal |
| 1                                                                                        | P               | P    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 3                                                                                        | P               | P    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 4                                                                                        | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 6                                                                                        | N               | P    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 7                                                                                        | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 10                                                                                       | N               | N    | N      | N         | N              | N   | P               | N               | N    | N     |
| 13                                                                                       | P               | P    | N      | N         | N              | N   | N               | P               | N    | N     |
| 14                                                                                       | P               | P    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 15                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | P               | N    | N     |
| 17                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 18                                                                                       | N               | N    | N      | N         | P              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 19                                                                                       | P               | P    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 20                                                                                       | P               | N    | N      | N         | P              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 24                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 25                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 26                                                                                       | N               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | P               | N    | N     |
| 27                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 31                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 32                                                                                       | P               | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |

Legenda: P: Positivo; N: Negativo; Gatos 2, 5, 8, 9, 11, 12, 16, 21, 22, 23, 28, 29, 30, 33, 34, 35 e 36 foram negativos para a PCR.

### 5.4.3. PCR em Tempo Real (HSP70)

#### 5.4.3.1. PCR em Tempo Real de sangue total

A partir do DNA do sangue dos animais, foi possível quantificar a carga parasitária em nove animais (9/36- 25%).

#### 5.4.3.2. PCR em Tempo Real de tecidos

Foi possível realizar a detecção da carga parasitária nos tecidos de pele de orelha de dois animais (2/36- 5,5%). Não houve quantificação de DNA parasitário em amostras dos outros tecidos (baço, rim, fígado e linfonodo).

#### 5.4.3.3. PCR em Tempo Real de suabes conjuntival, oral e nasal

Não houve detecção e quantificação de DNA parasitário em amostras de DNA de suabes conjuntivais, orais e nasais.

O resultado das quantificações das 11 (11/36- 30,5%) amostras positivas podem ser visualizadas na Figura 24 e no Apêndice 9.

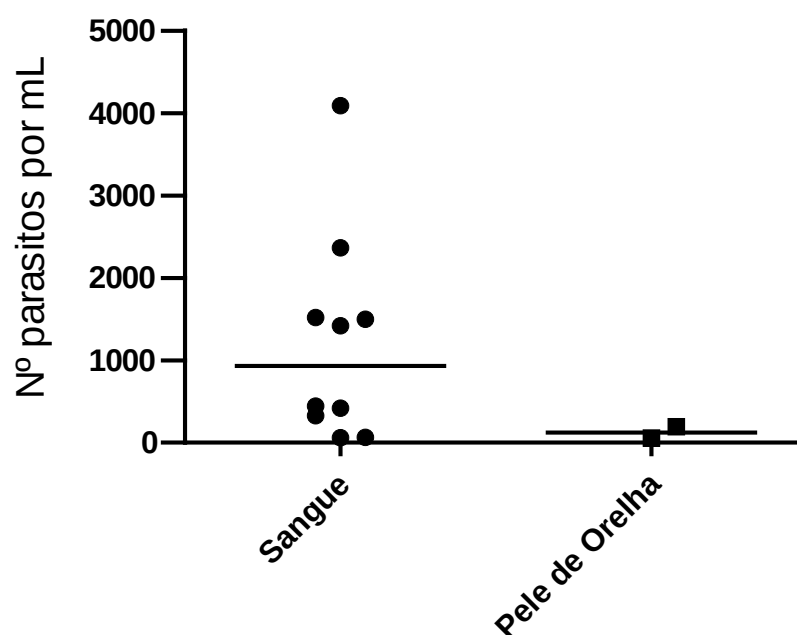


**Figura 24:** Comparação das cargas parasitárias obtidas a partir da q-PCR de sangue e pele de orelha. O gráfico apresenta a média em relação a todas as amostras.

#### 5.5. Sequenciamento genético de DNA das amostras positivas aos testes moleculares de PCR

A partir do sequenciamento genético foi possível identificar as espécies dos parasitos em 10 amostras das 27 positivas pela PCR. Podemos observar que houve a detecção de Tripanosomatídeos em amostras de sangue, pele, baço e suabe conjuntival. (Tabela 7). Não foi possível a realização do sequenciamento genético em 17 amostras (Apêndice 10).

**Tabela 7:** Resultados do sequenciamento genético das amostras positivas ao diagnóstico molecular de PCR.

| <b>Amostra</b>           | <b>Espécie e (%) de similaridade</b> | <b>Nº Acesso (Blast)</b> |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| Gato 18 (Pele de orelha) | <i>L. donovani</i> (97%)             | JQ780821.1               |
| Gato 20 (Pele de orelha) | <i>T. theileri</i> (90%)             | AB569250.1               |
| Gato 13 (Baço)           | <i>T. theileri</i> (95%)             | KP208743.1               |
| Gato 13 (Suabe)          | <i>L. donovani</i> (99%)             | JQ780821.1               |
| Gato 15 (Suabe)          | <i>T. theileri</i> (90%)             | AB569250.1               |
| Gato 26 (Suabe)          | <i>L. donovani</i> (96%)             | JQ780821.1               |
| Gato 03 (Sangue)         | <i>L. donovani</i> (98%)             | JQ780821.1               |
| Gato 04 (Sangue)         | <i>L. donovani</i> (96%)             | JQ780821.1               |
| Gato 13 (Sangue)         | <i>L. donovani</i> (97%)             | JQ029056.1               |
| Gato 14 (Sangue)         | <i>L. braziliensis</i> (98%)         | JQ061322.1               |

#### **5.6. Avaliação dos diagnósticos parasitológicos, sorológicos e moleculares com os resultados do sequenciamento genético.**

Na tabela 8 podemos avaliar as amostras dos animais cujo DNA parasitário sequenciado foi e compará-las em relação aos outros diagnósticos realizados.

**Tabela 8:** Sequenciamento genético e resultados gerais dos diagnósticos em gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) - Bauru.

| Amostra                  | Espécie                | Sorologias              | Parasitológicos                         | Moleculares                                | Sinais clínicos                                                                                          |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gato 18 (Pele de orelha) | <i>L. donovani</i>     | ELISA (4)               | Negativos                               | PCR (pele)<br>q-PCR (pele)                 | Anemia e lesões de pele                                                                                  |
| Gato 20 (Pele de orelha) | <i>T. theileri</i>     | RIFI (80)<br>ELISA (4)  | Esfregaço<br>Histoquímica (baço e pele) | PCR (pele e sangue)<br>q-PCR (pele)        | Lesões de pele                                                                                           |
| Gato 13 (Baço)           | <i>T. theileri</i>     | RIFI (80)<br>ELISA (8)  | Histoquímica (baço e pele)              | PCR (sangue, baço e suabe)<br>q-PCR sangue | Emagrecimento, caquexia, febre, apatia, lesões de pele, alopecias, infecções oculares e linfonodomegalia |
| Gato 13 (Suabe e sangue) | <i>L. donovani</i>     | RIFI (80)<br>ELISA (8)  | Histoquímica (baço e pele)              | PCR (sangue, baço e suabe)<br>q-PCR sangue | Emagrecimento, caquexia, febre, apatia, lesões de pele, alopecias, infecções oculares e linfonodomegalia |
| Gato 15 (Suabe)          | <i>T. theileri</i>     | RIFI (40)<br>ELISA (5)  | Histoquímica (pele)                     | PCR (sangue e suabe)<br>q-PCR              | Ausente                                                                                                  |
| Gato 26 (Suabe)          | <i>L. donovani</i>     | RIFI (80)<br>ELISA (5)  | Histoquímica (linfonodo)                | PCR (suabe)                                | Emagrecimento, descamação, lesões de pele e alopecias                                                    |
| Gato 03 (Sangue)         | <i>L. donovani</i>     | RIFI (160)<br>ELISA (6) | Esfregaço<br>Histoquímica (pele)        | PCR (sangue e baço)                        | Emagrecimento, febre, apatia, lesões de pele, alopecias e infecções                                      |
| Gato 04 (Sangue)         | <i>L. donovani</i>     | RIFI (40)<br>ELISA (6)  | Esfregaço<br>Histoquímica (pele)        | PCR (sangue)                               | Lesões de pele, infecções oculares                                                                       |
| Gato 14 (Sangue)         | <i>L. braziliensis</i> | RIFI (80)<br>ELISA (6)  | Histoquímica (baço)                     | PCR (sangue e baço)                        | Emagrecimento, caquexia, febre, apatia, lesões de pele e alopecias                                       |

### 5.7. Resultados parasitológicos e moleculares dos gatos não reagentes às provas sorológicas

A partir da análise dos resultados dos diagnósticos realizados com o grupo de gatos não reagentes (n=10), pode-se observar a presença ao menos um tipo de sinal clínico em todos eles, mesmo porque todos os gatos do estudo foram submetidos à eutanásia por motivo de alguma doença ou agravo. Do total de 10 animais, somente um (10%) (Gato 2), não apresentou positividade a nenhum dos testes diagnósticos, embora tenha apresentado dois tipos de sinais clínicos.

Alguns dos animais (3/10- 30%) apresentaram positividade somente a partir do teste parasitológico (Gato 8, Gato16 e Gato 21), dois (20%) somente pelo diagnóstico molecular de PCR e qPCR (Gato 24 e 25) e quatro animais (40%) apresentaram positividade por ambas as técnicas – parasitológicas e moleculares- (Gato 1, gato10, gato 27 e gato 31), como pode ser observado no Quadro 1.

**Quadro 1:** Análise comparativa dos resultados dos testes diagnósticos parasitológicos e moleculares em gatos do grupo não reagente às provas sorológicas para *Leishmania* spp.

| Técnicas diagnósticas- Gatos sorologicamente negativos |             |       |                 |                  |              |               |                |               |                     |                      |                     |
|--------------------------------------------------------|-------------|-------|-----------------|------------------|--------------|---------------|----------------|---------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Gato<br>(Quantidade<br>de sinais<br>clínicos)          | Sorológicas |       | Parasitológicas |                  |              | Moleculares   |                |               |                     |                      |                     |
|                                                        | RIFI        | ELISA | Esfregaço       | Imprint          | Histoquímica | PCR<br>sangue | PCR<br>tecidos | PCR<br>suabes | q-<br>PCR<br>sangue | q-<br>PCR<br>tecidos | q-<br>PCR<br>suabes |
| 1 (1)                                                  | -           | -     | S               | -                | P (pele)     | P             | P<br>(baço)    | -             | P                   | -                    | -                   |
| 2 (2)                                                  | -           | -     | -               | -                | -            | -             | -              | -             | -                   | -                    | -                   |
| 8 (5)                                                  | -           | -     | -               | -                | P (pele)     | -             | -              | -             | -                   | -                    | -                   |
| 10 (1)                                                 | -           | -     | S               | -                | -            | -             | -              | P             | -                   | -                    | -                   |
| 16 (1)                                                 | -           | -     | -               | S<br>(linfonodo) | -            | -             | -              | -             | -                   | -                    | -                   |
| 21 (3)                                                 | -           | -     | S               | -                | -            | -             | -              | -             | -                   | -                    | -                   |
| 24 (1)                                                 | -           | -     | -               | -                | -            | P             | -              | -             | P                   | -                    | -                   |
| 25 (2)                                                 | -           | -     | -               | -                | -            | P             | -              | -             | P                   | -                    | -                   |
| 27 (2)                                                 | -           | -     | S               | -                | -            | P             | -              | -             | -                   | -                    | -                   |
| 31 (5)                                                 | -           | -     | -               | -                | P (baço)     | P             | -              | -             | -                   | -                    | -                   |

Legenda: P: Positivo; -: Negativo; S: Suspeito

### 5.8. Resultados parasitológicos e moleculares de gatos reagentes às provas sorológicas

No grupo dos gatos sorologicamente positivos (n=26), apenas cinco animais (19,3%) não apresentaram alguma alteração clínica (gato 11, gato 12, gato 15, gato 19 e gato 33). Desse grupo, oito animais (30,7%) não apresentaram positividade a nenhuma técnica parasitológica e molecular (gato 11, gato 22, gato 23, gato 28, gato 29, gato 34, gato 35 e gato 36).

Foi observada positividade somente pelo diagnóstico parasitológico em dois animais (7,7%) (gato 9 e gato 30); pelo método molecular foi verificado positividade em cinco animais (19,3%) (gato 7, gato 18, gato 32, gato 33 e gato 34) e, em ambas as técnicas - parasitológicas e moleculares - foram observadas positividade em 11 animais (42,3%) (gato 3, gato 4, gato 5, gato 6, gato 13, gato 14, gato 15, gato 17, gato 19, gato 20 e gato 26), como pode ser observado no Quadro 2.

**Quadro 2:** Análise comparativa dos resultados dos testes diagnósticos parasitológicos e moleculares em gatos do grupo reagentes às provas sorológicas para *Leishmania* spp.

| Técnicas diagnósticas- Gatos sorologicamente positivos |            |       |                 |                  |                    |               |                |               |                 |                  |                 |
|--------------------------------------------------------|------------|-------|-----------------|------------------|--------------------|---------------|----------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Gato<br>(sinais<br>clínicos)                           | Sorologias |       | Parasitológicos |                  |                    | Moleculares   |                |               |                 |                  |                 |
|                                                        | RIFI       | ELISA | Esfregaço       | Imprint          | Histoquímica       | PCR<br>sangue | PCR<br>tecidos | PCR<br>suabes | q-PCR<br>sangue | q-PCR<br>tecidos | q-PCR<br>suabes |
| 3 (6)                                                  | P          | P     | S               | -                | P (pele)           | P             | P<br>(baço)    | -             | P               | -                | -               |
| 4 (2)                                                  | P          | P     | S               | -                | P (pele)           | P             | -              | -             | -               | -                | -               |
| 5 (1)                                                  | P          | P     | S               | S (baço)         | P<br>(linfonodo)   | -             | -              | -             | P               | -                | -               |
| 6 (1)                                                  | P          | P     | -               | S (baço)         | -                  | -             | P<br>(baço)    | -             | -               | -                | -               |
| 7 (1)                                                  | P          | P     | -               | -                | -                  | P             | -              | -             | P               | -                | -               |
| 9 (7)                                                  | P          | P     | S               | S (pele)         | -                  | -             | -              | -             | -               | -                | -               |
| 11 (0)                                                 | P          | -     | -               | -                | -                  | -             | -              | -             | -               | -                | -               |
| 12 (0)                                                 | P          | P     | -               | -                | -                  | -             | -              | -             | -               | -                | -               |
| 13 (8)                                                 | P          | P     | -               | -                | P (baço e<br>pele) | P             | P<br>(baço)    | P             | P               | -                | -               |
| 14 (6)                                                 | P          | P     | -               | -                | P (baço)           | P             | P<br>(baço)    | -             | -               | -                | -               |
| 15 (0)                                                 | P          | P     | -               | -                | P (pele)           | P             | -              | P             | P               | -                | -               |
| 17 (3)                                                 | P          | -     | S               | S<br>(linfonodo) | P<br>(linfonodo)   | P             | P<br>(baço)    | -             | P               | -                | -               |
| 18 (2)                                                 | -          | P     | -               | -                | -                  | -             | P<br>(pele)    | -             | -               | P<br>(pele)      | -               |
| 19 (0)                                                 | P          | P     | S               | -                |                    | -             | P<br>(baço)    |               |                 |                  |                 |

|        |   |   |   |   |                 |   |   |   |   |          |   |
|--------|---|---|---|---|-----------------|---|---|---|---|----------|---|
| 20 (1) | P | P | S | - | P (baço e pele) | P | - | - | - | P (pele) | - |
| 22 (2) | P | - | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 23 (7) | P | P | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 26 (4) | P | P | - | - | P (linfonodo)   | - | - | P | - | -        | - |
| 28 (1) | P | P | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 29 (3) | P | P | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 30 (1) | P | P | S | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 32 (1) | P | P | - | - | -               | P | - | - | P | -        | - |
| 33 (0) | P | P | - | - | -               | - | - | - | P | -        | - |
| 34 (2) | P | - | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 35 (3) | - | P | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |
| 36 (2) | P | P | - | - | -               | - | - | - | - | -        | - |

P: Positivo; -: Negativo; S: Suspeito

### **5.9- Concordância das técnicas diagnósticas parasitológicas e moleculares em comparação aos exames sorológicos**

Foi avaliada a concordância entre os testes diagnósticos sorológicos (RIFIxELISA) com os testes parasitológicos (esfregaço, imprint, histoquímica) e moleculares (PCR sangue, PCR tecidos e PCR de suabes) e (q-PCR (qPCR sangue, qPCR tecidos e qPCR de suabes) Para as análises de concordância entre os testes, foram calculados o coeficiente Kappa e seu respectivo intervalo de confiança de 95% (88), para verificar a concordância dos resultados de RIFI e ELISA com as demais técnicas diagnósticas (parasitológicas e moleculares), além da presença e ausência de sinais clínicos. (Tabela 9).

**Tabela 9:** Concordância das técnicas diagnósticas parasitológicas e moleculares em comparação aos exames sorológicos.

| DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO (RIFI e ELISA) K= 0,64 |                     |                 |          |
|-----------------------------------------------|---------------------|-----------------|----------|
| AVALIAÇÃO CLÍNICA                             | SINAIS CLÍNICOS     | Kappa (95% IC)* | ACURÁCIA |
|                                               |                     | -0,24           | 0,53     |
| DIAGNÓSTICO<br>PARASITOLÓGICO                 | Esfregaço sanguíneo | 0,03            | 0,44     |
|                                               | Imprint             | 0,03            | 0,39     |
|                                               | Histoquímica        | 0,03            | 0,44     |
| DIAGNÓSTICO<br>MOLECULAR                      | (PCR de sangue)     | 0,07            | 0,50     |
|                                               | (PCR de tecidos)    | 0,09            | 0,50     |
|                                               | (PCR de suabes)     | 0,09            | 0,42     |
|                                               | (qPCR de sangue)    | 0,09            | 0,47     |
|                                               | (qPCR de tecidos)   | -0,03           | 0,33     |
|                                               | (qPCR de suabes)    | -               | 0,33     |

IC: Intervalo de Confiança\*(Altman 1996); Concordância: Kappa <0,20: Fraca; 0,21-0,40: Razoável; 0,41-0,60: Moderada; 0,61-0,80: Boa; 0,81-1,00: Muito Boa; Acurácia: Proporção de acertos.

A partir da análise das técnicas sorológicas de RIFI e ELISA, obteve-se valor de K=0,64, apresentando boa concordância entre os testes. Avaliando os testes parasitológicos, os valores de K=0,03, para todos os diagnósticos, apresentaram concordância fraca entre os métodos em relação às sorologias. Pela análise dos testes moleculares de PCR e qPCR de sangue, tecidos e suabes, verificou-se valores de K=<0,20 em todas as técnicas, demonstrando concordância fraca com os diagnósticos de RIFI e ELISA.

# DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Sinais clínicos

Embora a LF esteja cada vez mais reconhecida como uma doença de gatos em regiões endêmicas, são poucos os trabalhos que relatam sobre as manifestações clínicas encontradas em gatos diagnosticados com *Leishmania* spp., fato que dificulta a associação da presença dessas alterações clínicas com o possível diagnóstico positivo para leishmaniose (89). Dentre alguns estudos, as presenças de alterações de pele foram consideradas um dos sinais clínicos mais comuns em gatos diagnosticados com LF, principalmente lesões na cabeça, orelhas, focinho e região periocular, fato que pode ser devido à área de maior contato com o vetor (41, 90). Em nosso trabalho, a presença de lesões de pele, também foi a alteração mais comum entre os felinos, ocorrendo em 25 animais (25/36- 69,4%), seguidos de outras manifestações clínicas, tais como alopecia (19,4%) e infecções oculares (16,6%), assim como o trabalho com gatos da Sicília realizado por Otranto et al. (89), que apresentaram 41% de gatos com lesões de pele e 8,9% com infecções oculares.

Objetivando-se elucidar a resposta de um felino diante da infecção por *Leishmania*, foi realizado um estudo experimental no Brasil, com inoculação de *L. braziliensis* em um gato doméstico, no qual, duas semanas após o procedimento, os gatos apresentaram manifestações clínicas da doença tendo sua regressão somente após nove meses, com sorologia positiva por 20 semanas (90). Outros trabalhos relatam que, além das lesões cutâneas e linfadenomegalia, há gatos que apresentaram um conjunto de manifestações sistêmicas, bem como sinais inespecíficos, como perda de peso, desidratação, letargia, hepatomegalia, icterícia, caquexia, febre, vômitos, diarreia, secreção nasal, dispneia, aborto e hipotermia (31, 32, 33, 42, 47, 53, 77, 91, 92, 93).

Outros sinais clínicos, considerados inespecíficos, também foram observados em nosso trabalho, tais como emagrecimento (25% - 9/36), apatia (25% - 9/36), febre (19,4% - 7/36) e linfonodomegalia (13,9% - 5/36), alterações semelhantes foram encontradas por Metzdorf et al. (94) em gatos detectados para *L. infantum* por técnicas moleculares. Dessa forma, a sorologia positiva somada com a presença de sinais clínicos, sugerem maior atenção para o diagnóstico da LF nesses animais, porém, não se descarta a possibilidade de estes estarem co-infectados com outras enfermidades infecciosas, já que estudos indicam que a LF pode ser desencadeada por infecções imunossupressoras, tais como FIV e FeLV (53, 29). O reconhecimento de gatos como hospedeiros de diversos patógenos e sua transmissão ser

realizada por diferentes vetores, é de grande importância para uma melhor gestão destas doenças tanto em animais como em seres humanos, pois estudos mostram a capacidade de pulgas e carrapatos infectarem gatos domésticos com patógenos de preocupação zoonótica, dentre elas leishmanias, e a falta de cuidados com esses animais e a negligência quanto à compreensão das suas manifestações clínicas dificultam a prevenção dessas zoonoses (89, 95).

A presença de alterações clínicas em animais sorologicamente negativos, tais como verificados neste trabalho, pode-se considerar que sejam decorrentes de outras infecções, ou até mesmo, que o animal estivesse em estado de imunossupressão intensa, o qual não permitiu o diagnóstico da LF a partir dos métodos sorológicos, mas que ainda assim sejam capazes de manter o ciclo da doença no meio urbano. E a investigação de sinais clínicos em gatos tem grande importância para o diagnóstico da LF, principalmente dos animais de região endêmica, que abriguem ectoparasitas e que apresentem sintomatologia mais comuns e compatíveis com os casos relatados na literatura.

Trabalho realizado por Chatziz et al. (76), demonstraram maior positividade pela PCR de sangue de gatos que apresentaram pelo menos um sinal clínico. Já em nosso estudo, dois dos cinco gatos (2/5) que não demonstraram nenhum sinal clínico, apresentaram a PCR positiva. Mesmo que o diagnóstico sorológico, utilizado como triagem, não indique a LF, e ainda que o animal apresente sinais compatíveis com a doença, existe a possibilidade do mesmo estar co-infectado por outra enfermidade imunossupressora, possivelmente mascarando o seu verdadeiro diagnóstico. Assim sendo, a associação da presença de sinais clínicos deve ser considerada para auxiliar o diagnóstico, mesmo porque a maioria dos animais que chegam às clínicas veterinárias apresentam alterações clínicas comuns a diferentes doenças, assim como observado em nosso estudo.

## **6.2. Diagnósticos sorológicos**

O diagnóstico sorológico por RIFI e ELISA para leishmaniose em felinos tem sido comumente relatado (25, 27, 29, 38, 45, 52, 57, 90, 96, 97, 98). Sabe-se que, devido à resposta imune celular, os gatos domésticos costumam ser mais resistentes à LF e, embora o seu período de incubação ainda não tenha sido estabelecido, é sabido que esses animais podem manter baixos títulos de anticorpos durante meses após a exposição ao agente

infeccioso (99). Alguns autores denominam esse comportamento como um equilíbrio entre o parasito e o animal hospedeiro, a partir da resposta imune celular (100).

Em nosso estudo a prevalência de gatos positivos pela RIFI foi de 66,7%, pelo ELISA de 61,1% e por ambas as técnicas de 55,5%. Tais resultados foram maiores do que os observados em outros trabalhos realizados no Brasil com gatos de área endêmica, como os de Spada et al. (36), os quais obtiveram a prevalência de 25,3% de positividade de seus gatos a partir da RIFI; Costa et al. (52), que encontraram 11,5% de gatos positivos a partir da técnica de ELISA e Silveira-Neto et al. (27) com a positividade de 23% pelo ELISA, 13,3% FML-ELISA e 15,9% pelo rK39, concluindo a utilização do ELISA como teste de triagem e ELISA rk39 como confirmatório. Outros trabalhos também avaliaram os gatos por RIFI e ELISA, e numa comparação de técnicas Sobrinho et al. (29) obtiveram 48,5% gatos positivos somente ao ELISA, 10,6% positivos somente pela RIFI e encontraram 10,6% de animais positivos em ambas as técnicas. Outro trabalho concordante foi o de Alves-Martin (101), que obteve a positividade à RIFI e ao ELISA de 62,7% e 72,5% respectivamente.

Trabalhos realizados com gatos de regiões endêmicas da Europa também apresentaram variações na prevalência, como Chatzis et al. (97), que pelas técnicas de RIFI e ELISA com gatos da Grécia, obtiveram 10% e 1% respectivamente, não encontrando concordância entre os testes e os inutilizando como triagem populacional. Diferentemente do trabalho realizado na Itália por Pennisi et al. (102) que verificaram 68,5% de positividade pela RIFI, e de 60% de soropositividade encontrada pela mesma sorologia detectada por Martin-Sanchés et al. (34).

Em trabalho recente realizado com gatos de rua, na Turquia, verificou-se que as sorologias de RIFI e ELISA resultaram na positividade de 15,2% e 10,8% respectivamente e, em ambas as técnicas, a prevalência foi de 11,1% (38). Também há estudos onde não houve positividade a partir dos testes sorológicos, mesmo tratando-se de animais de região endêmica (41, 50, 103).

A prevalência sorológica difere entre os estudos publicados, variando de 0 a 68,5%, fato que deve-se às características da população de estudo, endemicidade dos animais e/ou diferenças dos métodos diagnósticos (42). Além disso, a resistência natural dos felinos pode justificar as diferentes taxas de prevalência de infecção nesta espécie, o que há a necessidade de mais estudos para melhor avaliar a resposta imune dos gatos infectados com

*Leishmania* (49, 99).

A principal questão em relação a infecção em gatos fica baseada no fato de que eles poderiam ser menos susceptíveis à doença ou poderiam ser mais resistentes à infecção. Estudos mostram que a susceptibilidade aumenta com o tempo de vida do animal, pressupondo-se que o tempo de exposição está relacionado com a chances de infecção (100). Em trabalho realizado por Alves-Martin, (101), os gatos do estudo viviam em uma associação protetora de animais, juntamente com cães sabidamente positivos para LVC, e a susceptibilidade provavelmente contribuiu para a alta prevalência da infecção dos gatos estudados. Essa situação pode se repetir com felinos que vivem em regiões endêmicas, assim como verificamos com os gatos desse estudo, os quais vivem em uma cidade endêmica para LVC. Desses animais, cinco gatos que não apresentaram manifestações clínicas foram reativos às técnicas sorológicas, assim como dez animais não foram reagentes às técnicas sorológicas, mas apresentaram sinais clínicos. Além disso, com elevado número de casos de LVC, a possível resistência felina deve ser mais estudada, já que, dos dez animais não reagentes, nove apresentaram positividade por outras técnicas testadas nesta pesquisa. Dessa forma, a capacidade de detecção de anticorpos contra o parasita em gatos, juntamente com a transmissibilidade de formas promastigotas para o vetor (43), já é o suficiente para reconhecermos o papel reservatório dos gatos no ciclo das leishmanioses, e se faz necessário mais estudos quanto ao comportamento dessa espécie frente a infecção e padronização de métodos diagnósticos sensíveis e específicos, porém de baixo custo, como os sorológicos de ELISA e RIFI, para que tornem-se úteis para a prevenção e controle da doença e também em futuras investigações epidemiológicas.

### **6.3. Diagnósticos parasitológicos**

O diagnóstico parasitológico para o encontro de amastigotas em diferentes tecidos de gatos domésticos tem sido relatado em alguns estudos de caso (13, 22, 31, 32, 41, 91). Porém, o uso de técnicas parasitológicas para a pesquisa de amastigotas a nível epidemiológico, pode implicar em resultados discordantes com a verdadeira prevalência da doença na população, quando comparada a testes mais sensíveis e específicos, tais como sorológicos e moleculares (26, 29, 50, 52, 76, 94).

Em nosso estudo, foram visualizadas formas sugestivas de amastigotas a partir de

três técnicas parasitológicas distintas: esfregaço sanguíneo, imprint de órgãos e histoquímica, com a prevalência de 33,3%, 11,1% e 33,3%, respectivamente. A baixa carga parasitária e as estruturas não muito bem definidas das formas amastigotas (sem visualização completa de núcleo, citoplasma e cinetoplasto) dificultaram o diagnóstico parasitológico, principalmente pelas técnicas de imprint e esfregaço sanguíneo, sendo, portanto, necessária uma combinação de testes diagnósticos.

A histoquímica apresentou maior positividade entre os testes parasitológicos, principalmente pela avaliação de pele de orelha (8/12- 66,6%), representando um maior parasitismo cutâneo, como também ocorreu no trabalho de Vides et al. (41), avaliando-se, por meio da imunohistoquímica, um alto parasitismo na pele de gatos domésticos, técnica sugerida por estudos, além da histoquímica, para a confirmação do diagnóstico (77).

Outros trabalhos também relatam a importância da investigação histopatológica em gatos de regiões endêmicas e sugerem alta associação de presença de lesões dermatológicas e LF, como em Vides et al. (41), os quais encontraram 51,9% dos gatos sororreativos ao ELISA e 18,5% ao parasitológico; Sobrinho et al. (29) obtiveram 50% de positividade ao ELISA e nenhum positivo ao parasitológico. Costa et al. (52) estudaram uma população de 200 gatos a partir da técnica parasitológica, encontrando 4% (8/200) de positividade, assim como trabalho realizado por Metzdorf et al., (94), identificaram amastigotas a partir da citologia de sangue, medula óssea e aspirado de linfonodo em 4% dos gatos estudados em Campo Grande.

Há trabalhos que relatam a associação entre presença de alterações clínicas e visualização de amastigotas, com lesões tanto na pele (13, 77), focinho e orelhas com a observação de amastigotas em esfregaço sanguíneo (48), em aspirado de linfonodo (52, 91, 104), em nódulos da conjuntiva (93), em esfregaço sanguíneo (104, 105) e também alterações viscerais em exames post mortem, com encontro de amastigotas em baço, nódulos linfáticos, estômago, fígado e intestino (31, 53, 106).

Entretanto, a visualização de formas amastigotas nem sempre ocorre, como verificado no trabalho de Chatzis et al. (76), em estudo com gatos sem e com sinais clínicos, não havendo a observação de formas amastigotas pela citologia em nenhum dos gatos pesquisados. Na Sicília, foram realizados exames citológicos e histológicos em 120 gatos necropsiados de área endêmica e nenhum foi positivo (107). Na Ásia, 65 gatos estudados

apresentaram positividade de 6% ao teste sorológico de DAT (Teste de Aglutinação Direta) e negativos ao cultivo em cultura e PCR (108).

A inespecificidade do diagnóstico parasitológico pode ser atribuída a diversos fatores, desde a manipulação e preparação do material biológico (principalmente órgãos), até a experiência do observador durante a visualização das lâminas, além da carga parasitária do animal avaliado. Vale ressaltar que, apesar da inespecificidade do diagnóstico e da baixa carga parasitária nessa espécie, a presença de formas sugestivas de amastigotas foi observada em seis dos 10 gatos sorologicamente negativos e em 12 dos 26 sorologicamente positivos, fato que demonstra que sorologia negativa para LF não indica que o animal não esteja infectado. Dados que corroboram com o trabalho realizado com um gato de Campo Grande, tendo-se identificado formas amastigotas a partir de esfregaço sanguíneo e aspirado de linfonodo, seguido de PCR de linfonodo positivo para *Leishmania infantum*, sugerindo que animais sem manifestações clínicas evidentes da doença podem ter a LF confirmada por estes diagnósticos (104). Dessa forma, torna-se necessária a complementação do diagnóstico parasitológico na LF, considerando o estado clínico e origem do animal, além da associação com outra técnica, sorológica ou molecular, para a emissão de resultados confiáveis.

#### **6.4. Diagnósticos moleculares**

Alguns autores consideram os testes moleculares, como a PCR, mais específicas quando comparadas às sorológicas na LF (34, 96). No entanto, deve-se levar em consideração o estágio da doença e o grau de parasitemia do animal, o que poderá ser necessário a realização da PCR a partir de órgãos linfoides ou da pele, ao invés do sangue (49).

A escolha correta dos iniciadores e de sua região genômica é um dos fatores essenciais na sensibilidade da técnica de PCR (109). Utilizamos em nosso trabalho, os iniciadores L5-8S/LITSR da região ITS-1 (Internal Transcribed Spacer 1) L5-8SR/LITSV da região ITS-2 (Internal Transcribed Spacer 2), que amplificam sequências de tripanosomatídeos da família Trypanosomatidae, os quais podem ter variações entre os pares de bases, dependendo da espécie do parasito amplificada. De acordo com El Tai et al. (84), esses *primers*, em especial o ITS-2 são ideais para o diagnóstico de leishmaniose, sendo possível a detecção de espécies a nível de gênero. Tal afirmação foi analisada por Koltas et al. (109), tendo em vista que, após análises com enzimas de restrição, verificou-se que os *primers*

(ITS-2) não discriminam espécies de *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum*, porém eles recomendam a utilização do ITS1-PCR-RFLR como alternativa para a detecção de espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, sem a necessidade de cultivos em culturas. Em nosso trabalho, os *primers* ITS-1 e ITS-2 detectaram tripanosomatídeos nas mesmas quantidades de amostras de tecidos (Baços 1, 3, 6, 13, 14 e 19; pele de orelha 18 e 20; e suabes conjuntivais 10, 13, 15 e 26). Somente nas amostras de sangue, que o ITS-2 amplificaram duas amostras a mais quando comparadas com o ITS-1. Esses dados corroboram com o trabalho de Koltas et al. (109), onde avaliaram a eficácia de seis pares de *primers*, incluindo o ITS-1 e ITS2, para o diagnóstico de LV e LC em humanos, e detectaram a positividade de 47,2% (34/72) e 40,3% (29/72) para LC; e 22,9% (11/48) e 18,7% (9/48) para LV com os *primers* ITS-2 e ITS-1, respectivamente.

Em nosso trabalho utilizamos também os *primers* HSP70 (Heat Shock Proteins), ou proteínas do choque térmico, que foram desenhados para a técnica de HRM- técnica utilizada para a discriminação de espécies de *Leishmanias* a partir da análise das suas curvas melting - porém adequamos os *primers* para a PCR e q-PCR, pois esses permitem a detecção da variabilidade genética em moléculas que participam do processo imunológico (HSP70) e conferem alta probabilidade de serem detectadas devido a sua capacidade de replicação (85). As proteínas HSP70 são produzidas durante a passagem das formas promastigotas do vetor para o reservatório mamífero, e amplificam *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp, sendo capazes de discriminar espécies de *Leishmania* (109). Em nosso trabalho, os *primers* HSP70 amplificaram as mesmas amostras que os *primers* ITS-1, demonstrando eficazes na detecção e confirmação de tripanosomatídeos nas amostras dos gatos desse estudo.

Grande parte dos diagnósticos moleculares de LF são seguidos de sequenciamento e alinhamento genético, metodologia que auxilia na identificação do protozoário, o que vêm demonstrando comumente a infecção por *L. infantum* em gatos com alterações de pele (49).

O diagnóstico molecular a partir de sangue ou fragmentos de órgãos, é uma ferramenta de grande importância na definição do diagnóstico, sendo comumente utilizadas em outros trabalhos realizados em gatos domésticos (26, 38, 76, 96). Em nosso trabalho, identificamos o DNA de tripanosomatídeos a partir do sangue, baço e pele, de 13, 6 e 2 animais, respectivamente, a partir da utilização dos *primers* ITS-1 e HSP70 e com o ITS-2 houve a detecção de mais dois animais a partir das amostras de sangue.

Com a utilização do diagnóstico molecular, Savani et al. (13), encontraram positividade a partir dos fragmentos de baço de um gato doméstico com lesão nodular nasal e identificaram a presença de *L. infantum*. No trabalho de Chatzis et al. (76), verificaram-se a presença de *Leishmania* spp. em sangue total de 13% dos gatos estudados, e 18,2% à PCR de biópsia de pele, enfatizando a necessidade da realização da PCR em múltiplos órgãos, para assim evitar a ocorrência de animais falso-negativos. A eficácia da utilização dos iniciadores ITS-1 e HSP70 utilizados nesse trabalho foram comprovados pelo trabalho de Koltas et al. (109), que verificaram a sensibilidade de 96,6% e 90% com a utilização desses iniciadores para os diagnósticos de LT e LV, respectivamente.

Uma outra forma de identificação da espécie, sem a necessidade de sequenciamento, foi visto em um trabalho de LF realizado na Turquia por Can et al., (38), em que espécies de leishmanias foram definidas a partir da análise da posição dos pares de bases amplificadas no gel de agarose e, dessa forma, dos seis animais positivos à PCR, foi possível identificar dois animais com *L. tropica*, um animal co-infectado por *L. infantum* e mais uma banda desconhecida e as outras três amostras de animais que amplificaram numa posição de pares de bases desconhecida. Se fôssemos analisar nossos resultados a partir dessa metodologia, teríamos que, a partir dos resultados da PCR das amostras de sangue com os iniciadores ITS-1, que amplificaram cerca de 250 pb, poderíamos supor a amplificação equivalente à *L. braziliensis* e *L. donovani*, além do que trata-se de espécies comuns no Brasil. As amostras de baço, que amplificaram 330pb, seriam equivalentes à posição do controle da *L. equatorensis* (Figura 18). Essa metodologia de comparação da posição dos produtos amplificados, somente foi utilizada, até o momento, por Can et al., (38), que talvez utilizaram esse método devido as dificuldades encontradas para realizar o sequenciamento.

Além da PCR a partir de sangue e tecidos, outros tipos de amostras vêm sendo utilizadas como possibilidades para o diagnóstico da LVC, tais como células epiteliais da conjuntiva, coletadas por meio de suabes estéreis, já que as mucosas dos hospedeiros, além de possuírem constantes reposições celulares e células esfoliativas de fácil coleta, são regiões geralmente colonizadas pelo parasito e por isso são alvos propícios para a sua detecção (110).

A utilização de técnicas menos invasivas para coleta de material biológico, principalmente em gatos, pode ser uma nova alternativa para serviços epidemiológicos e diagnósticos menos invasivos, e alguns trabalhos recentes vêm usufruindo dessa técnica para o diagnóstico da LF, por se tratar de uma técnica que facilita a coleta em gatos, animais

normalmente mais agressivos.

Em nossa pesquisa, realizamos a PCR a partir de amostras de suabes conjuntivais, oral e nasal, e conseguiu-se detectar parasitos a partir dos suabes conjuntivais de quatro gatos (4/36- 11,1%). Resultados semelhantes foram observados em trabalho realizado com a coleta de suabes conjuntivais de 52 gatos, que se mostrou eficaz na detecção de gatos infectados por *Leishmania* spp. em 28,6% (02/07) e 11,1% (5/45) de gatos de Ilha Solteira – SP e Pirassununga- SP, respectivamente (65). Outro trabalho, realizado na Grécia, que também utilizou a PCR de suabes conjuntivais demonstrou uma positividade de 3,1% e enfatizou-se a importância da utilização de diferentes técnicas para o diagnóstico da LF (76).

Ainda não temos trabalhos que relatem o grau de parasitismo das mucosas em felinos, ou se a positividade da PCR de suabes está relacionada com o estado imunológico do animal. Porém, em nosso estudo, dos quatro animais que apresentaram positividade pelo método molecular a partir dos suabes conjuntivais, todos foram positivos ao menos a um teste parasitológico; três deles apresentaram positividade pelas técnicas sorológicas, dois deles foram positivos à PCR de sangue e dois foram positivos à q-PCR. Além disso, três dos quatro animais apresentavam manifestações clínicas (emagrecimento, caquexia, febre, apatia, lesões de pele, alopecias, infecções oculares e linfonodomegalia), tais constatações revelam que nem sempre o estado clínico do animal está relacionado com a presença do parasito em células da mucosa, e consequente detecção molecular.

Os animais sorologicamente negativos (n=10), apresentaram positividade pela PCR em seis animais (60%), após a avaliação dos resultados dos diagnósticos moleculares a partir de sangue, tecidos e suabes. Já, dentre os animais sorologicamente positivos (n=26), em 11 (42,3%) deles foi possível a detecção do parasito por algum tipo de amostra pela PCR. Esses dados assemelham-se aos achados de Chatzis et al., (76) que, ao analisarem dois grupos de gatos, sendo um de animais saudáveis e outro de animais doentes, detectaram o DNA parasitário em 41% e 40% dos respectivos grupos. Assim, esses resultados sugerem que a presença ou ausência de sinais clínicos, ou de anticorpos para a infecção, não determinam o grau de parasitismo encontrado nesses animais, e muito menos o grau de transmissibilidade desse parasito para o vetor da doença.

A técnica molecular de qPCR é capaz de quantificar os parasitos presentes nas amostras, pelo uso de sondas ou corantes fluorescentes que permitem o monitoramento em

tempo real do produto amplificado. É uma técnica mais vantajosa em relação à PCR por conta da rapidez na obtenção de resultados, pois dispensa a etapa da eletroforese em gel de agarose, além da reprodutibilidade e capacidade de quantificar as amostras, ou seja, o número de parasitos contidos na amostra de DNA.

A partir da qPCR, foi possível quantificar a carga parasitária em 11 animais – 30,5% (nove a partir de amostras de sangue e em dois animais, a partir de amostras de pele de orelha). Dos 13 animais positivos à PCR de sangue com os iniciadores ITS-1, ITS-2 e HSP-70, oito (61,5%) apresentaram sua quantificação realizada pela qPCR.

A ocorrência de detecção do parasito ser maior pela PCR quando comparada à qPCR também foi observada em trabalho realizado na Turquia, por Can et al. (38), tendo-se verificado que, dos 6 gatos positivos à Nested-PCR, apenas um foi positivo à q-PCR. Já em outro estudo realizado na Turquia, a partir de amostras de 147 gatos internados em clínicas veterinárias de três províncias, identificaram-se 13 gatos positivos, a partir da q-PCR utilizando-se HSP 70 e ITS1 que, após o sequenciamento, constatou-se que quatro eram da espécie *L. major* e nove *L. tropica*. (37). A detecção da carga parasitária depende do estado imunológico ou do tempo de infecção do animal. Se houver pouco tempo de infecção, a carga parasitária será alta, e sua detecção será melhor pelas técnicas de PCR e qPCR.

Seja por PCR ou qPCR, a detecção molecular e a identificação dos parasitos para diagnóstico em estudos epidemiológicos é importante, bem como para investigações taxonômicas e de genéticas de populações, assim como para decisões no tratamento das doenças.

### **6.5. Sequenciamento genético**

O DNA amplificado a partir de sangue e tecidos foram purificados e sequenciados a fim da definição da espécie do protozoário encontrado. Dessa forma obtivemos, pela primeira vez na literatura, a detecção de *T. theileri* em três amostras teciduais de gatos que foram sequenciadas (pele de orelha, baço e suabe conjuntival), já que a existência de estágios intracelulares de *T. theileri* em tecidos não havia sido reportada (6). Essa espécie pertence à família Trypanosomatidae e é comumente detectada em bovinos, causando perda da produtividade; acredita-se que, nas Américas, a transmissão vetorial seja mecânica, a partir de tabanídeos (*Tabanus* sp.) e outros dípteros hematófagos (*Stomoxys* sp.) (111, 112). Desta

forma, acredita-se que o contato desses gatos com esses vetores, seja por picada ou até por ingestão do inseto, tenha contribuído para a infecção desses felinos.

Não se sabe o grau de patogenia que *T. theileri* possui sobre os felídeos, ou seu caráter imunossupressor nessa espécie. No entanto, analisando os resultados dos testes diagnósticos, verificamos que os três animais apresentaram sorologias (RIFI e ELISA) positivos, houve detecção de formas amastigotas pelo diagnóstico parasitológico e quantificação da carga parasitária do animal pela q-PCR. Não podemos descartar a hipótese de reação cruzada nas sorologias, ou que os animais também mantiveram contato e produziram anticorpos contra *Leishmania*, ou até mesmo uma co-infecção entre os tripanosomatídeos. Além disso, os sinais clínicos apresentados em dois animais (lesões de pele, emagrecimento, caquexia, febre, alopecias, infecções oculares e linfonodomegalia) podem ser resultantes de uma infecção por tal parasito ou por outro agente infeccioso, devido ao estado imunossuprimido do animal. Portanto, é válido salientar que mais estudos são necessários para a elucidação do papel dos gatos também nos ciclos desses tripanosomas.

A detecção de *L. donovani* se deu em cinco animais, em seis diferentes amostras biológicas (pele de orelha (01/06), suabe conjuntival (02/06) e sangue (03/06). Essa espécie pertence ao subgênero *Leishmania* – *L. (Leishmania) donovani* e são parasitos do homem e outros mamíferos, causando a leishmaniose visceral em todo o mundo (3). Esses gatos apresentaram positividade pelas sorologias (06/06), exames parasitológicos (05/06) e sua carga parasitária foi quantificada pela q-PCR (02/06). A presença de alterações clínicas, comumente relatadas na LF, foram observadas nos cinco gatos. Analisando todos esses dados, podemos sugerir que a triagem a partir das sorologias, juntamente com o diagnóstico parasitológico e avaliação clínica, apresentou forte evidência da presença da zoonose nesses animais, sendo confirmada a partir do sequenciamento da espécie *L. donovani*, que tais características podem ser provenientes da LF.

Em uma amostra de sangue foi detectada a espécie *L. braziliensis*, pertencente ao subgênero *Viannia* – *Leishmania (Viannia) braziliensis*, parasita de humanos e outros mamíferos, responsável pela Leishmaniose Tegumentar (LT) na América tropical e subtropical (3). O animal apresentou positividade pelas provas sorológicas, parasitológicas e moleculares, apresentando alterações clínicas sugestivas para LF. Embora tenha apresentado formas amastigotas e PCR positiva em baço, não podemos descartar uma co-infecção com outra espécie de leishmania viscerotrópica ou até mesmo sugerir que tal espécie tegumentar

tenha se evadido dos órgãos, devido ao estado imunossuprimido do animal.

Em algumas amostras não foi possível realizar o sequenciamento genético devido a alguns fatores ocorridos que interferiram na aplicabilidade da técnica. Alguns amplicons apresentaram, provavelmente, a amplificações de mais de um organismo, com o mesmo tamanho de fragmento, e isso ocorre quando há a presença de mais de uma espécie no template da PCR e o par de *primers* se anela no DNA das espécies. Nesse caso, não foi possível distinguir a banda específica no gel de agarose para purificá-la e então o resultado visualizado após o sequenciamento foi a sobreposição de picos por toda a sequência obtida, fazendo-se necessário a utilização de outras técnicas mais avançadas para a tentativa de elucidação, como o sequenciamento de nova geração.

Assim sendo, a determinação das espécies dos tripanosomatídeos nos revela o papel do gato como hospedeiro reservatório no ciclo doméstico, tanto para leishmanias quanto para tripanosomas, porém, mais estudos devem ser direcionados quanto ao efeito da parasitemia nesses animais e a susceptibilidade de co-infecções entre os tripanosomatídeos, de caráter zoonótico ou não.

#### **6.6. Animais sorologicamente reagentes e não reagentes e relação com as provas parasitológicas e moleculares**

Avaliando os resultados de todos os diagnósticos e relacionando com o grupo de animais não reagentes (n=10), podemos observar que, apesar da não detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, a presença de sinais clínicos em todos eles são compatíveis à LF, mas não podemos descartar a hipótese de uma infecção por outros agentes etiológicos. Apenas um animal (1/10- 10%) não apresentou positividade a nenhuma técnica diagnóstica, o que pode revelar que os sinais clínicos (lesões de pele e infecções oculares) são possivelmente relacionados a outro tipo de enfermidade.

Dos gatos positivos somente aos testes parasitológicos (3/10- 30%), cabe entender que esses animais entraram em contato com o parasito recentemente e ainda não produziram anticorpos para combater a infecção, ou a não produção de anticorpos tenha ocorrido devido ao seu debilitado estado imunológico, assim como supostamente ocorreu com o gato (1/10- 10%) que apresentou o DNA do parasito somente detectado pela PCR, e quantificado pela qPCR. Já a metade dos gatos desse grupo, que apresentaram positividade por técnicas

parasitológicas e moleculares (5/10- 50%), indicativo de uma infecção recente, demonstra que animais imunossuprimidos podem manter uma carga parasitária e transmitir o parasito para flebotomíneos, atuando como reservatórios e sendo considerados não reagentes para a doença.

Analisando o grupo dos gatos sorologicamente positivos (n=26), somente cinco animais (5/26- 19,3%) não apresentaram sinais clínicos, circunstância esta que revela que o animal pode estar infectado, ou ter entrado em contato com o agente, porém, sem manifestações de sinais clínicos, como ocorre em alguns cães na LVC (cães assintomáticos). Desse grupo, oito animais (8/26- 30,7%) não apresentaram positividade por nenhuma técnica parasitológica e/ou molecular, o que indica que esses gatos entraram em contato com o agente etiológico e produziram anticorpos, porém não podemos afirmar se esses animais desenvolveram ou não a doença.

A positividade somente ao diagnóstico parasitológico foi evidenciada em dois animais (gato 9 e gato 30), o que demonstra uma possível reinfecção, pois tratando-se de animais de áreas endêmicas, isso possivelmente possa ter ocorrido, ou até mesmo uma reagudização, em que o parasito presente no animal tenha se multiplicado devido a um possível estado de imunossupressão. O mesmo pode ter ocorrido com os cinco animais (5/26- 19,3%), que apresentaram positividade somente pelo método molecular.

Os 11 animais (12/26- 42,3%) que foram positivos em ambas as técnicas - parasitológicas e moleculares - pode indicar que os mesmos entraram em contato com o agente, manifestando ou não a infecção, a presença do parasito pode ser devido à reagudização causada por uma possível imunossupressão, pela ocorrência de outra infecção, ou até mesmo devido à uma reinfecção. Portanto, devemos nos atentar à presença de sinais clínicos em gatos, associando-se sempre ao diagnóstico a epidemiologia, principalmente quando o animal é proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral.

Já foi observado que as manifestações clínicas comumente encontradas na LF podem confundir com as de outras enfermidades felinas. Apenas as provas sorológicas não são suficientes para concluir o diagnóstico, pois neste trabalho, 80% dos animais sorologicamente negativos apresentaram o parasito em sangue e/ou tecidos, enquanto que, os animais sorologicamente positivos apresentaram parasito no sangue/tecidos e outros apenas produziram anticorpos contra a infecção.

Dessa forma, animais não reagentes e reagentes podem atuar como reservatórios

da doença no ambiente urbano, juntamente com os cães, fato que necessita de um aprimoramento no protocolo de prevenção da Leishmaniose Visceral, tendo em vista que o encaminhamento dos animais sorologicamente positivos à eutanásia é ineficaz. Acreditamos que os programas de educação e conscientização da população quanto ao controle vetorial e cuidados veterinários com seus animais de estimação são fundamentais para o controle primário desta zoonose.

# CONCLUSÃO

## 7. CONCLUSÃO

- Tanto os gatos sorologicamente negativos quanto os positivos apresentaram sinais clínicos, presença do parasito em células e DNA parasitário em sangue e/ou tecidos, detectados a partir de técnicas parasitológicas e/ou moleculares;
- As sorologias de RIFI e ELISA mostraram a prevalência da infecção nos animais da região estudada, apresentaram boa concordância entre si e podem ser recomendadas para utilização em inquéritos epidemiológicos em regiões endêmicas para LV;
- Para o diagnóstico da LF, o exame parasitológico, embora considerado como teste confirmatório, deve ser acompanhado por métodos sorológicos e moleculares, assim como a avaliação clínica e epidemiológica dos animais;
- A PCR detectou DNA de tripanosomatídeos em amostras de sangue, órgãos e suabes conjuntivais, e mostrou-se uma boa ferramenta a ser utilizada no diagnóstico da LF;
- A PCR em tempo real quantificou a carga parasitária em sangue e tecidos (pele de orelha) dos animais;
- A utilização da PCR de suabes conjuntivais de gatos mostrou-se uma técnica de fácil aplicabilidade e que pode ser ajustada para a sua utilização como triagem em inquéritos epidemiológicos para diagnóstico de leishmaniose felina;
- Os gatos podem atuar como reservatórios de leishmanias e a detecção de tripanosomatídeos em amostras biológicas sugere sua participação na manutenção do parasito no ambiente urbano em região endêmica para LV.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

1. Barret M, Burchmore R, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiasis. Lancet. 2003; 362(9394):1469-80.
2. Vickerman K. Diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DS, editors. Biology of the Kinetoplastida. London: Academic Press; 1976.
- 3- Neves DP. Parasitologia humana. 12a ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
4. Tirlens AGM, Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. Parasitol Today. 1998; 14(7):265-71.
- 5- SILVA, R.A.M.S. et al. Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax: Biologia, Diagnóstico e controle. Corumbá : Embrapa Pantanal 2002. 141p.
- 6- Lee YF, Cheng CC, Chen JS, Lin NN, Hung YW, Wang JM, Tu WC, Tung KC, Chiu YT. Evidence of intracellular stages in Trypanosoma (Megatrypanum) theileri in non-phagocytic mammalian cells. Vet Parasitol. 2013; 191: 228-239.
- 7- World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. In: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis; Geneva; 2010. Geneva; 2010.
- 8- Kuhls AMZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5: 1155-71.
- 9- Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Organização Pan-Americana da Saúde, Washington, EUA, 2017 [citado 19 Maio 2017]. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754)

---

<sup>1</sup> Segundo normas Vancouver: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2009 [update 2009 May 12; cited 2009 Set 10]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

- 10- Curi NHA, Miranda I, Talamoni AS. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:99-101.
- 11- Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet Parasitol. 2008;55:146-51.
- 12- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AAA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: Isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) no estado do Pará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991;33(1):18-22.
- 13- Savani ESMM, Oliveira Camargo MCG, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Auria SRM, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;120(3):229-33.
- 14- Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of Zoonotic leishmaniasis? Trends Parasitol. 2011;27:341-4.
- 15- Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde. Vigilância epidemiológica - situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Brasília. Ministério da Saúde; 2011a.
- 16- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305-18.
- 17- Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. Rev Saúde Pública. 2006;3:537-41.
- 18- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004;7:338-49.
- 19- Ministério da Saúde (BR). Sistema de informação de Agravos de Notificação- SINAN.

Portal da Saúde, Brasil, 2015 [citado 22 Maio 2017]. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br>

20- Luvizotto MCR, Biazzone L, Eugenio FR, Andrade AL. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: Anais do 20º. Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999; Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Anclivepa; 1999. p. 24-5.

21- Galimberti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI, et al. Leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32:217-8.

22- Serrano ACM, Nunes CM, Savani ESMM, D'Áuria SRN, Bonello FL, Vasconcelos RO, Lima, VMF, Bresciani, KDS. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. Clín Vet. 2008;13(76):36-40.

23- Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral [Internet]. São Paulo; 2016 [acesso 2017 maio 22]. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.

24- Desjeux P. Urbanisation of the leishmaniasis Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum; Sevilla; 2002. Sevilla; 2002. p. 49-55.

25- Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, et al. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(2):141-5.

26- Coelho WM, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani KD. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2011;176(2-3):281-2.

27- Silveira-Neto L, Sobrinho LS, Martins CO, Machado RZ, Marcondes M, Lima VMF. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis*

*catus*. Vet Parasitol. 2011;177(3-4):374-7.

28- Rougeron V, Catzefflis F, Hide M, De Meeûs T, Bañuls AL. First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. Vet Parasitol. 2011;181(2-4):325-8.

29- Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, Lima VMF, et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2012;187(1-2):302-6.

30- Braga ARC, Langoni H, Lucheis SB. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2014;20(1):5.

31- Hervás J, Chacon-Manrique De Lara F, Sánchez-Isarria MA, Pelisser S, Carrasco L, Castillo JC, et al. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. J Feline Med Surg. 1999;1(2):101-5.

32- Rüfenacht S, Sager H, Muller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, et al. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. Vet Rec. 2005;156(17):542-5.

33- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol. 2007; 145 (3-4):357-60.

34- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. Vet Parasitol. 2007;145(3-4):267-73.

35- Ayllon T, Diniz PPV, Breitschwerdt EB, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A. Vector borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. Vector Borne Zoonot Dis. 2012;12(2):143-50.

- 36- Spada E, Proverbio D, Migliazzo A, Pepa AD, Perego R, De Giorgi GB. Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy. ISRN Parasitol. 2013;2013:1-6.
- 37- Paşa S, Vardarli AT, Erol N, Karakus M, Töz S, Atasoy A, et al. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. Vet Parasitol. 2015;212:389-92.
- 38- Can H, Doskaya M, Ozdemir HG, Sahar EA, Karakavuk M, Pektas B, et al. Soroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of Izmir, Turkey. Exp Parasitol. 2016;167:109-14.
- 39- Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. Vet Parasitol. 2008;158(4):364-9.
- 40- Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM, et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. Vector Borne Zoonot Dis. 2010;10(3):313-6.
- 41- Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. Vet Parasitol. 2011;178(1-2):22-8.
- 42- Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. Parasit Vectors. 2015;8:302.
- 43- Silva SM, Rabelo PF, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Vet Parasitol. 2010;174(1-2):150-4.
- 44- Underhill-Day JC. A literature review of urban effects on lowland healths and their wildlife. Northminster House: English Nature; 2005. p. 8. (English Nature Research Reports, n. 623).

- 45- Da Silva AVM, Cândido CDD, Pereira DP, Brazil RP, Carreira JCA. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*. 2008;105(1):92-4.
- 46- Kirkpatrick CE, Farrell JP, Goldschmidt MH. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infection in domestic cats. *Exp Parasitol*. 1984;58:125-31.
- 47- Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira SA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004; (3):165-7.
- 48- De Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;128(1-2):41-5.
- 49- Silveira-Neto L, Marcondes M, Bilsland E, Matos LVS, Viol MA, Bresciani KDS. Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose felina no Brasil. *Semina Ciênc Agrár*. 2015;36(3):1467-80.
- 50- Bresciani KDS, Serrano ACM, De Matos LVS, Savani ESMM, D'Auria SRN, Perri SHV, et al. Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19(2):127-9.
- 51- Rossi CN. Ocorrência de *Leishmania* spp. em gatos do município de Araçatuba, São Paulo, Brasil [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba; 2007.
- 52- Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, et al. Ocorrência de leishmanioses em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2010;47(3):213-7.
- 53- Grevot A, Jaussaud Hugues P, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Haas P, et al. Leishmaniosis

due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*. 2005;12:271-5.

54- Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Bepa, Bol Epidemiol Paul*. 2009;6(67):13-23.

55- Mohammed AR, Wrigth EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. Serodiagnosis Sudanese visceral an mucosal leishmaniasis: comparasion of Elisa- imunoflorescence and indirect haemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;80:271-4.

56- Ministério da Saúde (BR). Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2a ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde; 1996.

57- Cardia DF, Camossi LG, Silveira-Neto L, Langoni H, Bresciani KD. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. *Vet Parasitol*. 2013;197(3-4):634-7.

58- 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*. 2009;46:181-7.

59- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº1, de 29 de dezembro de 2011. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde; 2011b.

60- Coelho WM, Do Amarante AF, Apolinário JC, Coelho NM, De Lima VM, Perri SH, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol Res*. 2011;109:1009-13.

61- Zanette MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [tese]. Araçatuba:

Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2006.

62- Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo JRJP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2005;11(4):492-509.

63- Ferreira SA, Almeida GG, Silva SO, Vogas GP, Fujiwara RT, Andrade ASR, et al. Oral and ear swabs for canine Visceral Leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(4):e2150.

64- Benvenga GU. Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no estado de São Paulo [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária; 2013.

65- Oliveira TMFS, Pereira VF, Benvenga GU, Alves-Martin MF, Benassi JC, Silva DT, et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. Braz J Vet Parasitol. 2015;24(2):220-2.

66- Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-Time PCR for detection and quantification of *Leishmania* in mouse tissues. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1666-9.

67- Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. Ann N Y Acad Sci. 2004;1026:139-43.

68- Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. From-urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). Vet Parasitol. 2007;150(4):283-90.

69- Troncarelli MZ, Lucheis SB, Camargo JB, Machado JG, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009;164:118-23.

70- Monteiro MEZ, Baruque M, Neves MF. Leishmaniose visceral em cães: relato de caso. Rev Cientif Eletrôn Med Vet. 2009;7(12):1-5.

- 71- Greca H, Silva AV, Langoni H. Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. e anti-*Neospora caninum* em cães de Bauru, SP. Arq Bras Med Vet Zootec. 2010;62(1):224-7.
- 72- Souza VAF, Cortez LRPB, Dias RA, Amaku M, Ferreira Neto JS, Kuroda RBS, et al. Space-time cluster analysis of American visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2012;28(10):1949-64.
- 73- Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral [Internet]. São Paulo; 2016 [acesso 2017 maio 22]. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
- 74- Ortiz RC, Anversa L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. Epidemiol Serve Saúde. 2015;24(1):97-104.
- 75- Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balana-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2016; 227: 98-114.
- 76- Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF, et al. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. Vet Parasitol. 2014;202(3-4):217-25.
- 77- Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. J Comp Pathol. 2010;143:297-302.
- 78- Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1966;8:227-34.
- 79- Lima VMF, Biazzono L, Silva AC, Correa APFL, Luvizzoto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. Braz J Vet Res Anim Sci. 2005;25(4):215-8.

- 80- Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MR, Valadão IF, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. Vet Parasitol. 1997;17(1):17-26.
- 81- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme-linked immunoasorbent assay. In: Rose N, Friedman H. Manual of clinical immunology. South Carolina: American Society for Microbiology; 1980. p. 359-71.
- 82- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res. 1991;19(19):5444. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>.
- 83- Kullberg M, Nilson MA, Arnason U, Harley EH, Janke A. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. Mol Biol Evol. 2006;23:1493-503.
- 84- El Tai N, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sspc) and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(5):575-9.
- 85- Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of six new world *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasit Vectors. 2014;7:501.
- 86- Folgueira C, Quijada L, Soto M, Abanades DR, Alonso C, Requena JM. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. J Biol Chem. 2005;280(42):35172-83.
- 87- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Mega 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011;28:2731-9.
- 88- Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall; 1996.

611 p.

89- 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, Briant E. Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet Parasitol.* 2017; 236: 144-151.

90- Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata Junior R, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2005;127(3-4):199-208.

91- Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol.* 2002;106(3):181-91.

92-Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, et al. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2013;15:638-42.

93- Richter M, Schaarschmidt-Kiener D, Krudewig C. Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2014;156:289-94.

94- Metzendorf IP, Lima Junior MSC, Matos MFC, Souza Filho AF, Tsujisaki RAS, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2017; 166:121-5.

95- Persichetti MF, Gallego LS, Serrano L, Altet L, Reale S, Masucci M, et al. Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in Southern Italy. *Parasit Vectors.* 2016;9:247.

96- Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol.* 2010;174:336-40.

- 97- Chatzis MK, Leontides L, Athanasiou LV, Papadopoulos E, Kasabalis D, Mylonakis M, et al. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp Parasitol*. 2014;147:54-9.
- 98- Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, et al. Current status of *L.infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors*. 2014;7:112.
- 99- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(4):676-80.
- 100- Pennisi MG, Lupo T, Malara D, Masucci M, Migliazzo A, Lombardo G. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. *J Feline Med Surg*. 2012;17(14):656-7.
- 101- Alves-Martin MF. Avaliação diagnóstica para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em gatos domésticos procedentes da Associação Protetora dos Animais do município de Ilha Solteira, SP, Brasil [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu; 2013.
- 102- Pennisi MG, Venza M, Reale S, Vitale F, Lo Giudice S. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun*. 2004;28:363-6.
- 103- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the States of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(6):671-83.
- 104- Antunes TR, Peixoto RAV, Oliveira BB, Sorgatto S, Ramos CAN, Souza AI. Detecção de *Leishmania infantum* em esfregaço de sangue periférico e linfonodo de um felino doméstico. *Acta Scient Vet*. 2016; 44: 162.
- 105- Marcos R, Santos M, Malhão F, Pereira R, Fernandes AC, Montenegro L, et al. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Vet Clin Pathol*. 2009;38:201-5.

- 106- Migliazzo A, Vitale F, Calderone S, Puleio R, Binanti D, Abramo F. Feline leishmaniosis: a case with a high parasitic burden. *Vet Dermatol*. 2015;26:69-70.
- 107- Giordano A. Le chat dans la transmission de la leishmaniose viscérale de la méditerranée. *Bull Sez Ital Soc Int Microbiol*. 1933;5:300-32.
- 108- Nemati T, Khanmohammadi M, Bazmani A, Mirsamadi N, Koshki MHK, Mohebbali M, et al. Study on *Leishmania* infection in cats from Ahar, East Azerbaijan Province and North west Iran by parasitological, serological and molecular methods. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5:40-3.
- 109- Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2016;164:43-8.
- 110- Ferreira SA, Ituassu LT, Melo MN, Andrade ASR. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2008;152:257-63.
- 111- Silva RAMS, Sanchez V, Dávila AMR. Métodos de diagnósticos parasitológicos das tripanosomoses bovinas e eqüinas. Circular técnica 41. Embrapa Pantanal. 2003; 3.
- 112- Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Dell'Porto A, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MMG. Brazilian isolates of trypanosoma (megatrypanum) theileri: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol*. 2003; 116(3): 185-207.

ANEXOS

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Autorização do Comitê de Ética



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE RIOSQUE  
FACULDADE DE MEDICINA

FMB

Comitê de Ética no Uso de Animais

Código de registro via Portaria CEEA nº 011 de 15/12/2012

## CERTIFICADO N° 1096/2014-CEUA

**CERTIFICAMOS** que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1096/2014) **Diagnóstico molecular e quantificação da carga parasitária em gatos domésticos de área endêmica sorologicamente positivos para leishmaniose visceral**, a ser conduzido por Maria Fernanda Alves, orientada pela Profª Drª Simone Baldini Luchies, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "gatos" são provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

**CERTIFICAMOS**, ainda que foi autorizada a utilização de "30 gatos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 25/09/2014

*Katashi Okoshi*  
Prof. Adjunto Katashi Okoshi  
Presidente da CEUA

*Kleber Messias de Camargo*  
Kleber Messias de Camargo  
Secretário da CEUA

Dalberto Rêulão Junior, adm - Dabucatu - D.P. CEP: 13.010-978 Fone: (14) 3000-1600/3880-1300 e-mail: secretaria\_dabucatu@fmb.unesp.br

## Anexo 2: Modelo de ficha individual dos gatos



**PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BAURU**  
 CENTRO DE CONTROLE DE ZOONOSES

**AGENDAMENTO**  
 \_\_\_\_\_

|                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                |                         |                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------|--------------------|
| DATA REGISTRO: _____ Nº REGISTRO: _____                                                                                                                                                                                                                                                   |                |                         |                    |
| <b>DADOS DENUNCIANTE</b>                                                                                                                                                                                                                                                                  |                |                         |                    |
| DENUNCIANTE: _____                                                                                                                                                                                                                                                                        |                |                         |                    |
| ENDEREÇO: _____ Nº: _____                                                                                                                                                                                                                                                                 |                |                         |                    |
| BAIRRO: _____ FONE: _____                                                                                                                                                                                                                                                                 |                |                         |                    |
| <b>DADOS PROPRIETÁRIO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                 |                |                         |                    |
| NOME: _____                                                                                                                                                                                                                                                                               |                |                         |                    |
| ENDEREÇO: _____ Nº: _____                                                                                                                                                                                                                                                                 |                |                         |                    |
| BAIRRO: _____ FONE: _____                                                                                                                                                                                                                                                                 |                |                         |                    |
| <b>CARACTERÍSTICAS DO ANIMAL</b>                                                                                                                                                                                                                                                          |                |                         |                    |
| NOME ANIMAL: _____ ESPÉCIE: _____ OUTROS: _____ SEXO: _____                                                                                                                                                                                                                               |                |                         |                    |
| PELAGEM: _____ PORTE: _____ RAÇA: _____                                                                                                                                                                                                                                                   |                |                         |                    |
| <b>ENTRADA NO CCZ</b>                                                                                                                                                                                                                                                                     |                |                         |                    |
| MOTIVO ENTRADA: _____                                                                                                                                                                                                                                                                     |                |                         |                    |
| SITUAÇÃO: _____ OUTROS: _____ Nº IAL: _____                                                                                                                                                                                                                                               |                |                         |                    |
| <b>DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE PELA ENTREGA</b>                                                                                                                                                                                                                                        |                |                         |                    |
| Eu, _____ R.G/CPF _____                                                                                                                                                                                                                                                                   |                |                         |                    |
| Declaro que entreguei, POR MINHA LIVRE E ESPONTÂNEA VONTADE, o animal de minha propriedade acima descrito ao Centro de Controle de Zoonoses, consciente que, após avaliação veterinária ou expirado o prazo legal de permanência no abrigo, o mesmo poderá ser EUTANASIADO (SACRIFICADO). |                |                         |                    |
| ASSINATURA: _____                                                                                                                                                                                                                                                                         |                |                         |                    |
| <b>OBSERVAÇÕES DA CAPTURA</b>                                                                                                                                                                                                                                                             |                |                         |                    |
| (1) ANIMAL NÃO LOCALIZADO (5) CASA FECHADA<br>(2) ANIMAL FUGIU (6) MORREU<br>(3) PROPRIETÁRIO NÃO ENTREGOU O ANIMAL (7) ANIMAL CAPTURADO<br>(4) RECUSA DE ASSINATURA NO TERMO DE RESPONSABILIDADE (8) OUTROS: _____                                                                       |                |                         |                    |
| DATA: __/__/__ HORÁRIO: _____ RESPONSÁVEL PELA CAPTURA: _____                                                                                                                                                                                                                             |                |                         |                    |
| <b>AVALIAÇÃO VETERINÁRIA (carimbar e assinar)</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                |                         |                    |
| Emagrecimento                                                                                                                                                                                                                                                                             | Descamação     | Infecções oculares      | Hemorragias        |
| Caquexia                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Lesões de pele | Infecções respiratórias | Neuropatias        |
| Anemia                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Hiperqueratose | Linfoadenopatias        | Gastroenteropatias |
| Febre                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Onicogribose   | Esplenomegalia          |                    |
| Apatia                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Alopecias      | Hepatomegalia           |                    |
| <b>DESTINO DO ANIMAL</b>                                                                                                                                                                                                                                                                  |                |                         |                    |
| (1) EUTANÁSIA (3) ADOÇÃO/DOAÇÃO (5) OUTROS: _____                                                                                                                                                                                                                                         |                |                         |                    |
| (2) RESGATADO PELO PROPRIETÁRIO (4) ORIENTAÇÃO DATA: __/__/__                                                                                                                                                                                                                             |                |                         |                    |
| OBSERVAÇÕES ADICIONAIS _____                                                                                                                                                                                                                                                              |                |                         |                    |

**Anexo 3:****MEIO LIT (*Liver Infusion Tryptose*)**

Para o preparo de 250 mL de meio, em Kitassato estéril, acrescentou-se 2g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de NaCl e 0,1 g de KCl, acrescido de 44,5 mL de água milli-Q. Foi adaptado a este kitassato, um filtro de aço (Millipore®), com membrana de 22 $\mu\text{m}$  de poro (Millipore®). Esta solução contendo os sais diluídos foi autoclavada juntamente com o filtro a 121°C por 15 minutos, e nesse período, em um Erlenmeyer de 250 mL, foram diluídos em 100 mL de água Milli-Q: 0,75 g de infusão de fígado (Difco <sup>TM</sup>), 0,5 g de Dextrose (Oxoid®) e 1,25 g de Tryptose (Vetec®), com ajuste do pH a 7,4. Essa diluição foi filtrada no kitassato, acoplando-se ao mesmo uma bomba à vácuo. Após esta filtração, em capela de fluxo laminar, foram acrescentados a esse meio 5,5 mL de hemoglobina bovina a 2,2% (BBL <sup>TM</sup>), 30 mL de soro fetal bovino a 11% (Nutricell®) e 1 mL (20 mg) de gentamicina (Gentocin®). Foi realizado controle de esterilidade, por 48 horas em estufa a 37°C, utilizando meio BHI e após este período, o conteúdo final foi distribuído em tubos estéreis, mantidos em geladeira até o momento do uso.

**Anexo 4:****Meio de Cultura NNN (Novy, McNeal, Nicolle)**

Para o preparo de 150 mL de meio NNN, deve-se diluir 0,99 g de NaCL e 2,25 g de Ágar Base (Bacto Ágar) em um Erlenmeyer, com 150 mL de Água Milli-Q. Tampar com “boneca” de algodão hidrófobo, papel laminado e papel rosado. Após diluído, deve-se autoclavar esta solução, os tubos rosqueados para armazenar o meio NNN, e três pipetas de vidro, graduadas de 10 mL, a 121°C por 15 minutos. Após autoclavado, deve-se deixar a solução preparada em estufa, para que o material não endureça. Acrescentar 20mL de sangue bovino desfibrinado. Este frasco deve ser homogeneizado desde o momento que o animal foi puncionado. A homogeneização do frasco se deve ao fato da necessidade de se esgotar os fatores de coagulação. Colocar o frasco, as pipetas, a solução de sal e Ágar base e os tubos rosqueados de NNN na câmara de fluxo laminar e sob radiação de luz UV por 15 minutos, e, adicionar os 20 mL de sangue, com pipeta, no Erlenmeyer com o sal e Ágar base. Homogeneizar bem e proceder a distribuição do meio nos tubos de NNN. Deve-se adicionar 5 mL por tubo e deixá-los inclinados, para que formem um bizel até o final do tubo, permitindo assim, o perfeito crescimento das promastigotas em todo o tubo, não havendo desperdício de meio. O meio deve ser mantido em controle de esterilidade em estufa a 37°C por 48 horas. Após esse período, deve-se embrulhar os tubos em papel alumínio e papel rosado, e armazenados sob refrigeração até o momento do uso.

**Anexo 5:****Preparação dos antígenos (manutenção das formas promastigotas de Leishmanias)**

Os antígenos nas formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/IOC/2906), foram mantidos em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio LIT (líquido) e 5 mL de meio NNN (sólido). O repique para manutenção do antígeno foi realizado quinzenalmente, dentro da capela de fluxo laminar, retirando-se uma alíquota de cada um dos dois tubos de manutenção mais recente (repique anterior) e colocando-se entre lâmina e lamínula para observação sob microscopia óptica (aumento de 40X), para avaliação do crescimento das promastigotas. Do tubo que apresentasse parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, repicou-se uma alíquota de 1 mL para dois novos tubos contendo NNN e LIT, procedendo-se assim uma nova passagem. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. (ELETROLAB- EL 101/2-Brasil) a 26°C, temperatura ideal para o desenvolvimento das leishmanias.

**Anexo 6:****Confecção de lâminas para a técnica de RIFI**

Para a obtenção de uma quantidade viável de promastigotas por lâmina, foi necessário repicar 0,5 mL de cultura em LIT e NNN para um tubo de rosca contendo somente 10 mL de LIT. Procedeu-se dois repiques em LIT, com intervalo de sete dias para obtenção de maior concentração do agente (para maiores quantidades de lâminas). Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, centrifugou-se 10 mL de LIT a 3000 rpm por 10 minutos; em seguida, desprezou-se o sobrenadante e foi acrescentado 5 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST), e centrifugou-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes, quantificou-se os parasitas em microscópio óptico e, caso a quantidade de promastigotas fosse inferior a 20 a 30 parasitas por campo, proceder-se-ia novamente à centrifugação, até que então pudesse se obter a concentração desejada. Caso a quantidade de parasitas estivesse concentrada, a mesma seria diluída em SST. As lâminas para RIFI são compostas de duas fileiras de seis orifícios (perfurações). Fixou-se o antígeno, pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas. Logo em seguida a suspensão foi retirada, por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício (Figura 4). As lâminas permaneceram em temperatura ambiente para secagem, quando então foram guardadas em laminário à -20°C até o momento de uso.

**Anexo 7:****Preparação dos antígenos brutos de *Leishmania infantum***

Para a sensibilização da placa de ELISA para a realização do Ensaio Imunoenzimático, foi necessário a produção dos antígenos brutos. Para a obtenção de uma quantidade viável de promastigotas para a sensibilização das placas do ELISA, foi necessário repicar 5 mL de cultura em LIT e NNN para um tubo de rosca contendo somente 40 mL de LIT. Procedeu-se dois repiques em LIT, com intervalo de sete dias para obtenção de maior concentração do agente (para maiores quantidades de promastigotas) para o preparo dos antígenos para a sensibilização das placas de ELISA. Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, passou-se as culturas para um tubo de Falcon e centrifugou-se 3000 rpm por 10 minutos; em seguida, desprezou-se o sobrenadante e foi acrescentado de 30 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST), e centrifugou-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes, e ao final as amostras foram tratadas com inibidor de protease (Fenilmetil Sufonil Fluorido – PMSF) a 1 mM diluído em metanol. A outra etapa do processo consistiu em submeter o extrato antigênico à lise por ultrasom de acordo com o seguinte ciclo: 50% a 4°C por 30 segundos (seis repetições). O método de quantificação proteica foi de acordo com Smith et al.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150:76-85.

**Anexo 8:****Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum***

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966)<sup>3</sup>. Utilizaram-se microplacas para a diluição inicial de 190 µL de solução salina tamponada (SST) 0,01 M com pH 7,2 e 10 µL do soro para uma diluição inicial (primeira diluição) de 1:20. Posteriormente, distribuiu-se 100 µL da primeira diluição em 100 µL de solução de PBS para obter-se uma diluição de 1:40 (segunda diluição), a qual foi utilizada para a triagem da reação. De mesma forma foram diluídos soros controles positivos e negativos. Nas lâminas fixadas com o antígeno de *L. infantum*, distribuíram-se 10 µL de soro diluído (segunda diluição), incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Logo foram lavadas duas vezes com STS 0,01 M, pH 7,2 por 10 minutos, posteriormente foram secas em estufa. O conjugado espécie-específico (Anti gato IgG FITC, Sigma®, USA), foi diluído segundo título pré-estabelecido em solução de Azul de Evans a 20%, no qual foi previamente diluído em PBS 0,01M pH 7,2 na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10 µL do conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se novamente as lavagens por duas vezes com PBS 0,01 M pH 7,2 por 10 minutos e logo foram secas em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínulas de 24x60 mm, examinando-se em microscópio de Imunofluorescência na objetiva de 40. Depois da leitura dos controles, procedeu-se a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se positivos as amostras de soro com título igual a 40. Os soros positivos na diluição 1:40 foram avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em gatos.

---

<sup>3</sup> Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996;8:227-34.

**Anexo 9:****ELISA indireto para *Leishmania* spp.**

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Lima et al.<sup>4</sup> e adaptado por Costa et al.<sup>5</sup> para *Leishmania* spp. Para o teste ELISA, em cada poço da placa de poliestireno (Nunc® Maxisorp Thermo Scientific) foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *Leishmania infantum* na concentração 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com PBS pH 7,4 acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com PBS-T, para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados 100 µL por poço, em duplicata, das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos a serem testados na diluição 1:400 em PBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com PBS-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG total de gato ligado à peroxidase (A20-120P; Bethyl, Montgomery, USA) na diluição 1:40000 em PBS-T, foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada (TMB) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm (Figura 6). Os valores de D.O dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove) como descrito por Machado et al. (1997)<sup>6</sup>. O limite máximo do nível zero foi determinado

---

<sup>4</sup> Lima VMF, Biazzone L, Silva AC, Correa APFL, Luvizzoto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. Braz J Vet Res Anim Sci. 2005;25(4):215-8.

<sup>5</sup> Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, et al. Ocorrência de leishmanioses em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. Braz J Vet Res Anim Sci. 2010;47(3):213-7.

<sup>6</sup> Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MR, Valadão IF, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. Vet Parasitol. 1997;17(1):17-26.

pela média das D.O. de animais negativos para *Leishmania infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al.<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup> Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme-linked immunoasorbent assay. In: Rose N, Friedman H. Manual of clinical immunology. South Carolina: American Society for Microbiology; 1980. p. 359-71.

**Anexo 10:****Inclusão de material em parafina histológica**

Após a eutanásia dos gatos, os fragmentos de 1 a 2 cm dos órgãos (pele de orelha, baço, fígado, linfonodo e rim) foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada 10% por até 24 horas. Os tecidos foram lavados em álcool 70% e desidratados por meios de passagens sucessivas em álcool 80%, 90% e 100%. Posteriormente, os tecidos foram submetidos ao processo de diafanização com xilol e pela impregnação com parafina para a confecção dos blocos histológicos, que foram armazenados à -20°C, até o momento do corte em micrótomo. Os processos de desidratação, diafanização e impregnação dos tecidos estão caracterizados abaixo:

Álcool 80%: (Dois banhos de 15 minutos cada);

Álcool 95%: (Dois banhos de 15 minutos cada);

Álcool Absoluto: (Dois banhos de 15 minutos cada);

Álcool Absoluto/Xilol: (Um banho de 10 minutos);

Xilol I: (Um banho de cinco minutos);

Xilol II: (Um banho de cinco minutos);

Xilol III: (Um banho de três minutos);

Xilol/Parafina: (Imersão por uma hora em estufa a 60°C);

Parafina I: (Imersão “overnight”);

Parafina II: (Imersão por uma hora em estufa a 60°C);

Parafina III: Inclusão final.

Armazenamento: -20°C.

**Anexo 11:****Confecção de lâminas histológicas**

Após a inclusão dos tecidos em parafina, os blocos foram submetidos à secção de cortes em micrótomo (LEICA RM2145) com corte de 0.5µm para montagem das lâminas histológicas. Cada fragmento cortado foi hidratado em água mantida a 40°C em uma malha para hidratação do corte e posteriormente “pescados” e fixados em lâminas microscópicas seladas com Poly-L-lysina (Poly-L-lysine solution P8920-SIGMA-ALDRICH®). As lâminas foram submetidas à técnica padrão de histologia e coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), para a investigação tecidual.

Xilol I: (Banho de 15 minutos);

Xilol II: (Banho de 15 minutos);

Álcool 100% I: (Banho de 10 segundos);

Álcool 100% II: (Banho de 10 segundos);

Álcool 95%: (Banho de um minuto);

Álcool 90%: (Banho de um minuto);

Álcool 70%: (Banho de um minuto);

Água destilada: (Banho de 10 segundos);

Hematoxilina: (Banho de 2 minutos);

Água destilada: (Banho de quatro minutos);

Álcool 80%: (Banho de 10 segundos);

Eosina: (Banho de um minuto);

Água Destilada: (Banho de 10 segundos);

Álcool 100%I: (Banho de um minuto);

Álcool 100% II: (Banho de um minuto);

Álcool 100% III: (Banho de um minuto);

Álcool/Xilol: (Banho de dois minutos);

Xilol I: Banho de 10 minutos;

Xilol II: Banho de 10 minutos.

Fixar a lamínula na lâmina com Bálsamo do Canadá.

**Anexo 12:****Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em sangue**

A purificação do DNA do sangue foi realizada com o Kit comercial Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®), seguindo recomendações do fabricante. As amostras em microtubos foram descongeladas sob refrigeração em gelo seco. Em seguida acrescentou-se em microtubos de 1,5 ml livres de DNases e RNases, 20µL de proteínase K e 300µL da amostra biológica, e foram homogeneizados em Vortex por 10 segundos. A seguir, foi adicionado 400 µL de tampão de extração (Lysis buffer-“extraction solution”) para suspender as células brancas e novamente homogeneizou-se em vortex por 15 segundos. Em seguida, os tubos permaneceram em temperatura ambiente por dez minutos e foram transferidos para um tubo coletor acrescido de uma coluna do kit comercial empregado, sendo o material centrifugado a 11000 rcf por 1 minuto. Logo após, descartou-se o sobrenadante do tubo coletor e acrescentou-se 500 µL de solução de lise a coluna. Em seguida, foi centrifugado a 11000 rcf por 1 minuto. Após desprezar o sobrenadante, voltou-se a coluna ao tubo coletor e acrescentou-se 500 µL de solução de lavagem à coluna e foi centrifugado a 11000 rcf por três minutos. O tubo coletor foi desprezado juntamente com o sobrenadante e a coluna colocada em microtubos de 1,5 mL livres de DNases e RNases, adicionando-se 100 µL de “elution buffer” previamente aquecido à 70°C, o qual permaneceu incubado por 1 minuto. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 11000 rcf por 1 minuto, obtendo-se a amostra de DNA, a qual foi mantida a -20°C até o momento do uso.

**Anexo 13:****Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em tecidos**

Após a maceração dos tecidos, foi realizada a extração do DNA desse conteúdo com o Kit comercial Illustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin (Ge Healthcare®), seguindo recomendações do fabricante. O tecido macerado foi armazenado em microtubos. Em seguida acrescentou-se em microtubos de 1,5 ml livres de DNAses e RNAses, 1 mL de PBS 7,2, centrifugou-se a 16000 RCF por 2 minutos e descartou-se o sobrenadante. Após, adicionou-se 50 µL de PBS 7,2, homogeneizou-se por 10 segundos, adicionou-se 10µL de solução de lise e 10 µL de Proteínase K, seguindo por uma homogeneização de 15 segundos. Incubação por uma hora a 56°C. Após a incubação, centrifugou-se os microtubos a 2000 RCF por 10 segundos e adicionou-se 500 µL de Lysis Buffer type 4, seguindo de homogeneização por 15 segundos. Incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Logo após, as amostras foram tranferidas para a coluna do tubo coletor e centrifugadas a 11000 RCF por 1 minuto. Descartou-se o líquido do tubo de coleção e adicionou-se, novamente, 500 µL de Lysis Buffer type 4 e centrifugou-se por 1 minuto a 11000 RCF. Descartou-se o conteúdo filtrado e adicionou-se 500 µL de Wash Buffer Type 6, centrifugou-se por 3 mkinutos a 11000 RCF e descartou-se o conteúdo filtrado. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL estéreis e adicionou-se 100 µL do Tampão de Eluição, previamente aquecido a 70°C. Incubou-se por 1 minuto e centrifugou-se a 11000 RCF por 1 minuto, obtendo-se o DNA. Os DNAs extraídos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

**Anexo 14:****Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. em suabes**

Desta forma, testou-se o protocolo de Lahiri & Nurnberger<sup>8</sup> adaptado por Oliveira et al.<sup>9</sup> realizado sem a utilização de kit comercial. Para cada microtubo com suabe, foi adicionado 300 µL de solução de Tampão de Proteinase K, homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 20 minutos. Após, distribuiu-se 160 µL da solução desse microtubo para outros microtubos que continham a seguinte solução: 160 µL de Solução de Proteinase K, 200 µL de água ultrapura, 20 µL de SDS (Invitrogen®) e 10 µL de Proteinase K (Life Technologies®). Após homogeneização, os microtubos foram mantidos em banho seco a 54°C, agitados periodicamente por 3 horas. Após esse período de incubação, os microtubos foram mantidos a 4°C por cerca de 15 minutos, para que depois fosse adicionado 120 µL de NaCl, homogeneizado e centrifugado por 13000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, devidamente identificados e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto (Dinâmica®), homogeneizando os microtubos por inversão e mantidos overnight em freezer -20°C. Após o período de incubação, os microtubos foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C; após, descartou-se o sobrenadante e manteve-se os microtubos invertidos em papel absorvente para secá-los. Depois foram submetidos a banho seco a 54°C por 15 minutos e adicionou-se 40 µL de água ultrapura em cada microtubo para eluição do DNA. As amostras foram mantidas congeladas até o momento do uso.

---

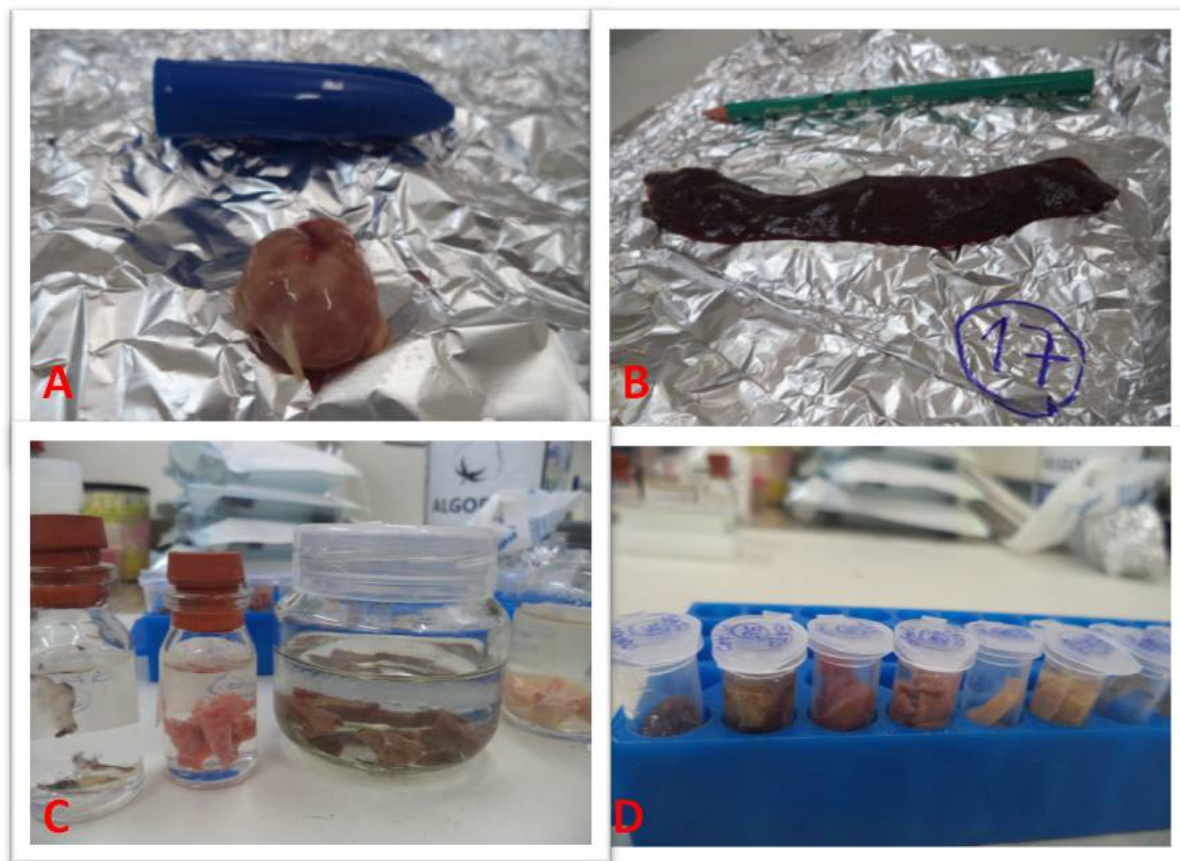
<sup>8</sup> Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5444. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>.

<sup>9</sup> Oliveira TMFS, Pereira VF, Benvença GU, Alves-Martin MF, Benassi JC, Silva DT, et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Braz J Vet Parasitol.* 2015;24(2):220-2.

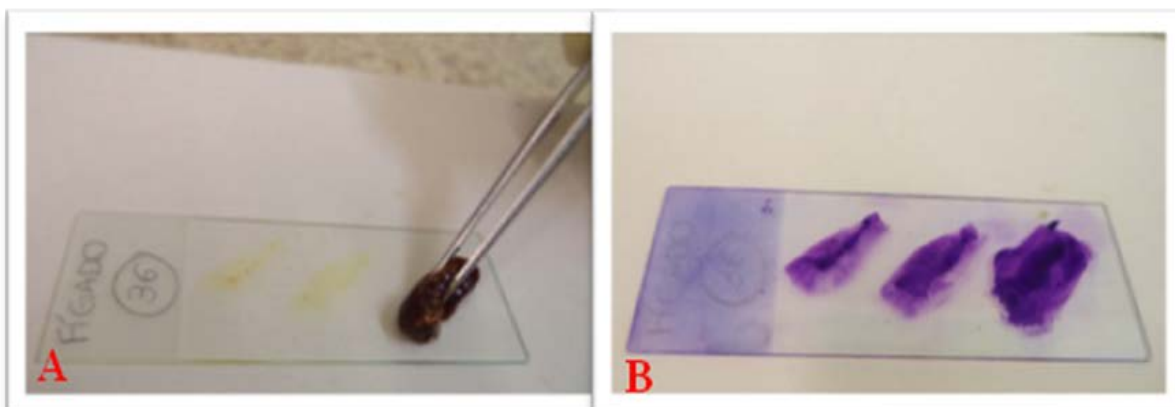
# APÊNDICES

## 10. APÊNDICES

### Apêndice 1:



**Apêndice 1:** Preparação e preservação dos órgãos coletados de gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP. Em (A) linfonodo, (B) baço, (C) preservação dos fragmentos dos órgãos em formalina tamponada e em (D) fragmentos conservados em RNA later®. Fonte: Arquivo pessoal.

**Apêndice 2:**

**Apêndice 2:** Técnica parasitológica de Imprint. (A) Fragmento de órgão sendo pressionado contra a lâmina; (B) Lâmina corada com Giemsa. Fonte: Arquivo pessoal.

### Apêndice 3:



**Apêndice 3:** Preparação dos tecidos para a realização da técnica parasitológica de histoquímica. (A) Fragmentos de órgãos armazenados em álcool 70%; (B) Separação dos fragmentos antes de iniciar o procedimento; (C) Fragmentos submetidos aos banhos em álcool e xilol; (D) Preparação das formas para a impregnação em parafina; (E) Preparação dos fragmentos para a inclusão em parafina; (F) Blocos em parafina contendo os diferentes fragmentos de tecidos. Fonte: Arquivo pessoal.

**Apêndice 4:** Resultados sorológicos de RIFI e ELISA em gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP.

**Reação de Imunofluorescência Indireta e ELISA indireto (RIFI e ELISA indireto) para *Leishmania* spp.**

| Gato | RIFI (Titulação) | ELISA indireto (N.E) |
|------|------------------|----------------------|
| 1    | NR               | NR                   |
| 2    | NR               | NR                   |
| 3    | 160              | 6                    |
| 4    | 40               | 6                    |
| 5    | 40               | 7                    |
| 6    | 40               | 6                    |
| 7    | 40               | 5                    |
| 8    | NR               | NR                   |
| 9    | 40               | 4                    |
| 10   | NR               | NR                   |
| 11   | 40               | NR                   |
| 12   | 40               | 7                    |
| 13   | 80               | 6                    |
| 14   | 80               | 6                    |
| 15   | 40               | 5                    |
| 16   | NR               | NR                   |
| 17   | 40               | NR                   |
| 18   | NR               | 4                    |
| 19   | 40               | 9                    |
| 20   | 80               | 4                    |
| 21   | NR               | NR                   |
| 22   | 40               | NR                   |
| 23   | 80               | 6                    |
| 24   | NR               | NR                   |
| 25   | NR               | NR                   |
| 26   | 80               | 5                    |
| 27   | NR               | NR                   |
| 28   | 40               | 6                    |
| 29   | 40               | 6                    |
| 30   | 40               | 8                    |
| 31   | NR               | NR                   |
| 32   | 40               | 6                    |
| 33   | 40               | 3                    |
| 34   | 80               | NR                   |
| 35   | NR               | 5                    |
| 36   | 40               | 6                    |

Ponto de corte RIFI: Titulação  $\geq 40$  (Camargo, 1966); Ponto de corte ELISA: N.E $\geq 2$  (Voller et al., 1980); N.E= Níveis ELISA; NR= Não Reagente.

**Apêndice 5:** Diagnósticos parasitológicos em gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP.

| Diagnósticos Parasitológicos em gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP |           |                   |        |                |     |           |              |        |                |     |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------|--------|----------------|-----|-----------|--------------|--------|----------------|-----|-----------|
| Técnicas Parasitológicas                                             |           |                   |        |                |     |           |              |        |                |     |           |
|                                                                      | Esfregaço | Imprint de órgãos |        |                |     |           | Histoquímica |        |                |     |           |
| Gato                                                                 | Sangue    | Baço              | Fígado | Pele de orelha | Rim | Linfonodo | Baço         | Fígado | Pele de Orelha | Rim | Linfonodo |
| 1                                                                    | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 2                                                                    | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 3                                                                    | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 4                                                                    | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 5                                                                    | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 6                                                                    | -         | S                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 7                                                                    | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 8                                                                    | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 9                                                                    | S         | -                 | -      | S              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 10                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 11                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 12                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 13                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | P            | -      | P              | -   | -         |
| 14                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | P            | -      | -              | -   | -         |
| 15                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 16                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | S         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 17                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | S         | -            | -      | -              | -   | P         |
| 18                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 19                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 20                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | P            | -      | P              | -   | -         |
| 21                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 22                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 23                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 24                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 25                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 26                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | P         |
| 27                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 28                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 29                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 30                                                                   | S         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 31                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | P            | -      | -              | -   | -         |
| 32                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 33                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 34                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 35                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 36                                                                   | -         | -                 | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |

Legenda: P: Positivo; -: Negativo; S: Suspeito

**Apêndice 6:** Diagnósticos sorológicos e parasitológicos em gatos provenientes do CCZ de Bauru-SP

| <b>Diagnósticos Sorológicos e Parasitológicos em gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP</b> |           |       |           |                          |        |                |     |           |              |        |                |     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|-----------|--------------------------|--------|----------------|-----|-----------|--------------|--------|----------------|-----|-----------|
| Gato                                                                                      | Sorologia |       | Esfregaço | Técnicas Parasitológicas |        |                |     |           | Histoquímica |        |                |     |           |
|                                                                                           | RIFI      | ELISA | Sangue    | Imprint de órgãos        |        |                |     |           |              |        |                |     |           |
|                                                                                           |           |       |           | Baço                     | Fígado | Pele de orelha | Rim | Linfonodo | Baço         | Fígado | Pele de Orelha | Rim | Linfonodo |
| 1                                                                                         | -         | -     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 2                                                                                         | -         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 3                                                                                         | P         | P     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 4                                                                                         | P         | P     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 5                                                                                         | P         | P     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 6                                                                                         | P         | P     | -         | S                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 7                                                                                         | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 8                                                                                         | -         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 9                                                                                         | P         | P     | S         | -                        | -      | S              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 10                                                                                        | -         | -     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 11                                                                                        | P         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 12                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 13                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | P            | -      | P              | -   | -         |
| 14                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | P            | -      | -              | -   | -         |
| 15                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | P              | -   | -         |
| 16                                                                                        | -         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | S         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 17                                                                                        | P         | -     | S         | -                        | -      | -              | -   | S         | -            | -      | -              | -   | P         |
| 18                                                                                        | -         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 19                                                                                        | P         | P     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 20                                                                                        | P         | P     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | P            | -      | P              | -   | -         |
| 21                                                                                        | -         | -     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 22                                                                                        | P         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 23                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 24                                                                                        | -         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 25                                                                                        | -         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 26                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | P         |
| 27                                                                                        | -         | -     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 28                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 29                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 30                                                                                        | P         | P     | S         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 31                                                                                        | -         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | P            | -      | -              | -   | -         |
| 32                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 33                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 34                                                                                        | P         | -     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 35                                                                                        | -         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |
| 36                                                                                        | P         | P     | -         | -                        | -      | -              | -   | -         | -            | -      | -              | -   | -         |

Legenda: P: Positivo; -: Negativo; S: Suspeito

**Apêndice 7:** Quantificação das amostras de DNA (ng/μl) de 36 gatos procedentes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

| Gatos   | Sangue | Baço  | Fígado | Rim   | Pele<br>de<br>orelha | Linfonodo | Suabe<br>oral | Suabe<br>nasal | Suabe<br>O.D | Suabe<br>O.E |
|---------|--------|-------|--------|-------|----------------------|-----------|---------------|----------------|--------------|--------------|
| Gato 1  | 197,4  | 185,5 | 185,0  | 274,5 | 43,2                 | -         | 43,0          | 58,0           | 42,0         | 61,5         |
| Gato 2  | 170,1  | 342,0 | 293,4  | 193,7 | 28,5                 | -         | 39,0          | 60,0           | 85,5         | 81,0         |
| Gato 3  | 113,5  | 77,0  | 129,8  | 129,6 | 165,6                | 270,0     | 64,0          | 49,0           | 79,0         | 76,5         |
| Gato 4  | 148,2  | 91,5  | 108,4  | 108,1 | 20,3                 | -         | 51,0          | 15,0           | 11,9         | 45,5         |
| Gato 5  | 71,7   | 91,2  | 263,2  | 98,9  | 26,5                 | -         | 60,0          | 17,5           | 49,0         | 36,0         |
| Gato 6  | 168,2  | 50,9  | 81,2   | 137,6 | 36,2                 | 433,7     | 32,0          | 23,5           | 50,0         | 54,5         |
| Gato 7  | 129,7  | 125,6 | 138,1  | 210,8 | 20,9                 | -         | 52,0          | 215,5          | 32,0         | 128,5        |
| Gato 8  | 299,1  | 142,4 | 106,7  | 100,2 | 19,4                 | -         | 85,0          | 79,5           | 57,5         | 56,5         |
| Gato 9  | 78,7   | 169,9 | 39,2   | 194,4 | 8,3                  | 296,294   | 46,5          | 63,0           | 63,0         | 76,0         |
| Gato 10 | 49,6   | 55,6  | 65,3   | 274,7 | 53,5                 | -         | 24,5          | 36,5           | 34,0         | 8,4          |
| Gato 11 | 49,2   | 24,3  | 233,7  | 581,1 | 31,8                 | -         | 43,5          | 16,5           | 20,5         | 33,0         |
| Gato 12 | 285,6  | 178,4 | 201,3  | 330,8 | 18,1                 | -         | 72,5          | 35,0           | 28,0         | 58,0         |
| Gato 13 | 383,7  | 149,2 | 42,2   | 409,7 | 32,9                 | 335,7     | 220,5         | 122,0          | 119,0        | 184,5        |
| Gato 14 | 328,0  | 44,2  | 54,6   | 134,9 | 195,3                | -         | 45,0          | 52,0           | 51,0         | 383,0        |
| Gato 15 | 88,1   | 5,6   | 351,2  | 569,7 | 24,2                 | 286,6     | 64,0          | 40,0           | 148,5        | 61,5         |
| Gato 16 | 472,8  | 191,3 | 258,4  | 192,6 | 8,3                  | 1064,4    | 27,0          | 74,0           | 49,5         | 38,5         |
| Gato 17 | 187,1  | 32,7  | 45,9   | 105,5 | 18,2                 | 228,5     | 25,0          | 61,0           | 37,0         | 37,5         |
| Gato 18 | 175,6  | 244,7 | 159,6  | 354,7 | 11,4                 | 288,6     | 58,0          | 37,5           | 79,0         | 50,5         |
| Gato 19 | 121,2  | 155,3 | 53,9   | 267,3 | 10,6                 | -         | 38,5          | 72,5           | 42,0         | 45,5         |
| Gato 20 | 112,6  | 53,4  | 65,7   | 183,6 | 18,2                 | -         | 34,0          | 171,0          | 1,9          | 213,5        |
| Gato 21 | 229,1  | 13,6  | 26,7   | 89,3  | 22,9                 | -         | 41,0          | 20,0           | 75,0         | 50,0         |
| Gato 22 | 52,1   | 137,4 | 231,1  | 194,1 | 3,6                  | -         | 18,5          | 60,5           | 9,7          | 44,0         |
| Gato 23 | 147,7  | 238,3 | 311,2  | 168,2 | 61,5                 | -         | 49,0          | 67,5           | 11,5         | 48,5         |
| Gato 24 | 202,2  | 74,9  | 128,9  | 162,8 | 30,1                 | -         | 106,0         | 101,5          | 7,4          | 31,5         |
| Gato 25 | 70,3   | 398,5 | 33,3   | 144,9 | 58,9                 | -         | 33,0          | 20,0           | 43,5         | 40,5         |
| Gato 26 | 98,8   | 164,2 | 113,8  | 198,9 | 52,1                 | 155,8     | 15,0          | 65,0           | 21,0         | 87,0         |
| Gato 27 | 44,5   | 36,2  | 116,5  | 243,8 | 40,4                 | -         | 16,5          | 24,0           | 13,2         | 46,0         |
| Gato 28 | 278,8  | 172,7 | 130,2  | 125,8 | 54,7                 | -         | 93,5          | 8,2            | 50,0         | 42,5         |
| Gato 29 | 51,8   | 283,3 | 104,3  | 269,1 | 18,8                 | 292,6     | 25,0          | 50,5           | 6,6          | 23,5         |
| Gato 30 | 37,9   | 101,7 | 157,1  | 164,6 | 23,9                 | 425,5     | 27,5          | 3,2            | 34,0         | 33,0         |
| Gato 31 | 148,2  | 86,2  | 20,4   | 57,1  | 30,9                 | 347,3     | 29,5          | 31,5           | 13,4         | 33,0         |
| Gato 32 | 1,7    | 85,2  | 10,3   | 141,6 | 21,5                 | -         | 28,5          | 27,5           | 21,0         | 94,0         |
| Gato 33 | 75,1   | 65,0  | 129,9  | 97,0  | 13,2                 | -         | 25,0          | 29,0           | 18,0         | 27,0         |
| Gato 34 | 195,2  | 52,2  | 26,0   | 225,5 | 14,4                 | -         | 66,0          | 51,5           | 46,5         | 31,5         |
| Gato 35 | 73,5   | 42,0  | 120,5  | 330,0 | 14,1                 | 2254,0    | 36,5          | 96,5           | 318,0        | 31,0         |
| Gato 36 | 188,0  | 461,5 | 50,5   | 216,0 | 22,5                 | -         | 72,0          | 31,5           | 51,5         | 73,5         |

-: Órgão não coletado



**Apêndice 9:** Diagnóstico molecular de qPCR a partir de amostras biológicas de gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP.

Diagnóstico Molecular pela técnica de qPCR em amostras biológicas de gatos procedentes do CCZ de Bauru-SP

| Gato | qPCR dos tecidos |      |        |           |                |     | qPCR dos suabes |                 |      |       |
|------|------------------|------|--------|-----------|----------------|-----|-----------------|-----------------|------|-------|
|      | Sangue           | Baço | Fígado | Linfonodo | Pele de orelha | Rim | Conjuntiva O.D. | Conjuntiva O.E. | Oral | Nasal |
| 1    | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 2    | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 3    | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 4    | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 5    | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 6    | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 7    | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 8    | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 9    | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 10   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 11   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 12   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 13   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 14   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 15   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 16   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 17   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 18   | N                | N    | N      | N         | P              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 19   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 20   | N                | N    | N      | N         | P              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 21   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 22   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 23   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 24   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 25   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 26   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 27   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 28   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 29   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 30   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 31   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 32   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 33   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 34   | P                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 35   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |
| 36   | N                | N    | N      | N         | N              | N   | N               | N               | N    | N     |

P: Positivo; -: Negativo; O.D: Olho Direito; O.E: Olho Esquerdo.