

DETECÇÃO MOLECULAR DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM FELINOS: INVESTIGANDO O PAPEL DO GATO NA TRANSMISSÃO DO CALAZAR

Glauciane Monteiro da Silva Sousa

Iniciação Científica – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

glauciane.sousa@aluno.unifametro.edu.br

Joana Lorena de Souza Freitas

Iniciação Científica – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

joana.freitas@aluno.unifametro.edu.br

Maria Vanessa de Oliveira Marques

Iniciação Científica – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

mariav.marques@aluno.unifametro.edu.br

Luciana Magalhães Melo

Professora orientadora – Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

luciana.melo@professor.unifametro.edu.br

Claudia Maria Leal Bevilaqua

Pesquisadora - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE

claudia.bevilaqua@uece.br

Helcileia Dias Santos

Pesquisadora - Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da UFT

hdsantos@mail.uft.edu.br

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária

Encontro Científico: IX Encontro de Monitoria e Iniciação Científica

RESUMO

Introdução: A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença que acomete humanos e cães, tendo como agente etiológico o protozoário *Leishmania infantum*. O principal reservatório urbano é o cão. Estudos recentes apontam o gato doméstico como possível reservatório urbano no ciclo desse parasito. **Objetivo:** Aplicar uma estratégia metodológica baseada em PCR em tempo real (qPCR) para detecção do parasito em amostras de sangue periférico de felinos. **Métodos:** Pacientes felinos (n =12), atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, foram submetidos a exame clínico e coleta de sangue, para teste rápido de FIV/FeLV e para extração de DNA total. O diagnóstico molecular foi feito através de amplificação de kDNA de *L. infantum*, bem como de mtDNA felino (controle endógeno). Informações acerca do conhecimento prévio do tutor sobre LV foram coletadas. **Resultados:** A maioria dos pacientes (91,7%) apresentou quadro clínico geral bom e nove (75,0%) apresentaram problemas dermatológicos. Todos os tutores já tinham conhecimento prévio da patologia e adotavam medidas preventivas baseadas em ações no ambiente. Todos os pacientes apresentaram resultado negativo para *L. infantum* e apenas um foi positivo para FIV. Todas as amostras apresentaram amplificação de mtDNA. **Conclusão:** De forma pioneira, iniciou-se a investigação da presença de *L. infantum* em felinos no município de Fortaleza, através de diagnóstico molecular. Todos os pacientes, atendidos no bairro da Jacarecanga, apresentaram resultado negativo para a presença do parasito. Uma maior quantidade de animais ainda é necessária nessa triagem, visando esclarecer o real papel epidemiológico do gato no ciclo da LV em Fortaleza.

Palavras-chave: gato; leishmaniose; qPCR; PCR em tempo real; DNA.

Financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia (PROCAD/Amazônia) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Além de bolsa de produtividade em pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e de doutorado da CAPES.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que acomete humanos e cães e tem como agente etiológico o protozoário *Leishmania infantum*. A doença afeta órgãos como baço, fígado e medula óssea, sendo fatal em casos graves e não-tratados. No Brasil, mais de 3.000 novos casos são notificados todo ano e na região Nordeste está alocada de 70 a 90% da população parasitada, especialmente na Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (CHAGAS et al., 2021).

O parasito é transmitido pela picada do mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) e, no ambiente urbano, o cão é considerado o principal reservatório. Estudos recentes relatam a forte possibilidade do gato doméstico (*Felis catus*) no ciclo urbano da reprodução da doença, uma vez que indivíduos dessa espécie podem albergar o parasito, com pouca ou nenhuma manifestação clínica (BENASSI et al., 2017). A detecção de *L. infantum* em felinos domésticos, sintomáticos ou não, poderá contribuir para estudos epidemiológicos da LV. Adicionalmente, a utilização de amostragem minimamente invasiva, como sangue periférico, viabilizaria levantamentos epidemiológicos mais eficientes, especialmente em felinos não-domiciliados (BENASSI et al., 2017).

A dificuldade de apuração de dados epidemiológicos referentes a felinos deve-se a alguns fatores (PENNISI e PERSICHETTI, 2018). Primeiramente, à ausência ou baixa intensidade de sinais clínicos, que, em geral, ocorrem apenas na forma de lesões cutâneas ou oculares. Assim, raramente ocorre indicação clínica para detecção do parasito *L. infantum* em gatos (BENASSI et al., 2015). Adicionalmente, diferente do que ocorre entre cães e humanos, o método de diagnóstico desse parasito em felinos também não é plenamente estabelecido. Finalmente, os resultados em testes de sorologia são pouco reprodutíveis pois a soro-conversão é variável em gatos (PENNISI e PERSICHETTI, 2018).

Dessa maneira, estudos baseados em qPCR estão sendo cada vez mais utilizados para a detecção de *L. infantum* em felinos domésticos, assim como em cães e humanos. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi aplicar uma estratégia metodológica baseada em qPCR para detecção do parasito em amostras de sangue periférico de pacientes felinos

atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO.

METODOLOGIA

1. Material biológico e ética animal

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) em abril de 2020. Amostras de sangue periférico de pacientes felino (n=12) atendidos no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, no mês de junho de 2021 foram utilizadas na investigação.

2. Avaliação clínica dos pacientes e conhecimentos prévios do tutor

Os pacientes foram submetidos a exame clínico completo, incluindo inspeção geral dermatológica, oftalmológica e da cavidade bucal. Dados clínicos do paciente relevantes para a pesquisa e informações acerca do conhecimento prévio do tutor sobre LV foram coletados em formulários específicos. Todos os pacientes foram submetidos a coleta de sangue periférico através de venopunção cefálica. As amostras foram armazenadas em freezer a -20° C até processamento na Unidade de Pesquisa em Genética Molecular (UPGeM) da UNIFAMETRO.

3. Teste Rápido de Fiv e FeLV

Para diagnóstico do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FeLV), foi utilizado o teste rápido ECO Vet Felino (Eco Diagnóstico Veterinário, Conrinto, Brasil). O procedimento foi realizado com amostras de sangue total de 5 animais, seguindo as orientações do fabricante, utilizando 10 μ L de sangue. Em seguida, com uma pipeta plástica descartável na posição vertical foi dispensada uma gota no poço do teste imunocromatográfico. Depois da completa absorção da amostra, foram adicionadas 2 gotas (80 μ L) da solução tampão no dispositivo teste. Após 10 minutos, foi constatado que apenas um animal testou positivo para FIV.

4. Extração e quantificação de DNA

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o Purelink Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, USA). O sangue felino (200 μ l), foi acrescido de 20 μ L de Proteinase K e 20 μ L de RNase A (ambos a 20 mg/mL) e incubado por 2min em temperatura ambiente. Após adição de 200 μ L de Purelink Genomic Lysis Buffer, incubação por 10 min a 55 $^{\circ}$ C e adição de 200 μ L de etanol a 100%, o volume total foi transferido para a resina e centrifugado a 10.000xg por 1min. O sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada com 500 μ L de solução tampão de lavagem-

1 e com 500 μ L de solução tampão de lavagem-2. Cada amostra de DNA foi eluída com 50 μ L de água livre de nucleases. Uma segunda eluição foi realizada para cálculo de rendimento de DNA total. O DNA foi quantificado por espectrofotometria com Picodrop (Picodrop, UK).

5. Reações de PCR em tempo real (RT-PCR)

Cada reação de amplificação por RT-PCR consistiu em um volume total de 25 μ L, contendo 12,5 μ L Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), 2,5 μ L primers (concentração final variando de 0,6 a 1,0 μ M), 1 μ L de amostra de DNA e 9 μ L água ultrapura. As reações de PCR foram realizadas no termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) e a ciclagem térmica consistiu em incubação inicial a 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95° C por 15 segundos e 60° C por 60 segundos. A curva de melting dos amplicons obtidos foi traçada através de procedimento padrão do equipamento, com temperatura variando de 60° C a 95° C.

6. Diagnóstico molecular de *L. infantum*

As detecções de *L. infantum* no sangue periférico dos pacientes felinos foram realizadas reações de qPCR para amplificação do DNA de kinetoplasto (kDNA) do parasito, utilizando os primers upkDNA-SE e upkDNA-AS (OLIVEIRA et al. 2019). Os controles das reações foram feitos através da amplificação de gene endógeno, mtDNA felino, utilizando os primers CAmt1- SE e CAmt1- AS (OLIVEIRA et al., 2020). Os parâmetros de Eficiência, Linearidade (R^2) e especificidade das amplificações dos primers para kDNA e mtDNA foram previamente descritas por OLIVEIRA et al., 2019 e OLIVEIRA et al., 2020 respectivamente.

7. Análise de dados

As reações de qPCR foram avaliadas através de análise das curvas de amplificação dos genes e de melting dos amplicons obtidos. Valores de threshold cycle (Ct) foram determinados automaticamente no QuantStudio Design&Analysis Software v.1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, USA). Os valores de rendimento de DNA foram expressos em média \pm e.p.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos recentes apontam que *L. infantum*, também pode ser detectada em felinos domésticos em áreas endêmicas para a LV canina e humana (CHAGAS et al., 2021). Esses estudos indicam ainda que o vetor passa a albergar o parasito após o repasto sanguíneo em animais parasitados. Assim, uma vez que gatos não-domiciliados estão em constante exposição ao vetor, sem nenhuma medida profilática, o papel do gato no ciclo urbano da LV vem sendo

revisado (SPADA et al., 2016).

Na presente investigação, todos os pacientes apresentaram resultado negativo para presença de *L. infantum* no sangue periférico (**Figura 1**). Adicionalmente, todas as amostras apresentaram rendimento apropriado de DNA (**Tabela 1**) e amplificação de mtDNA (Ct=15,00±0,85), indicando qualidade apropriada do DNA obtido, bem como realização correta dos procedimentos técnicos.

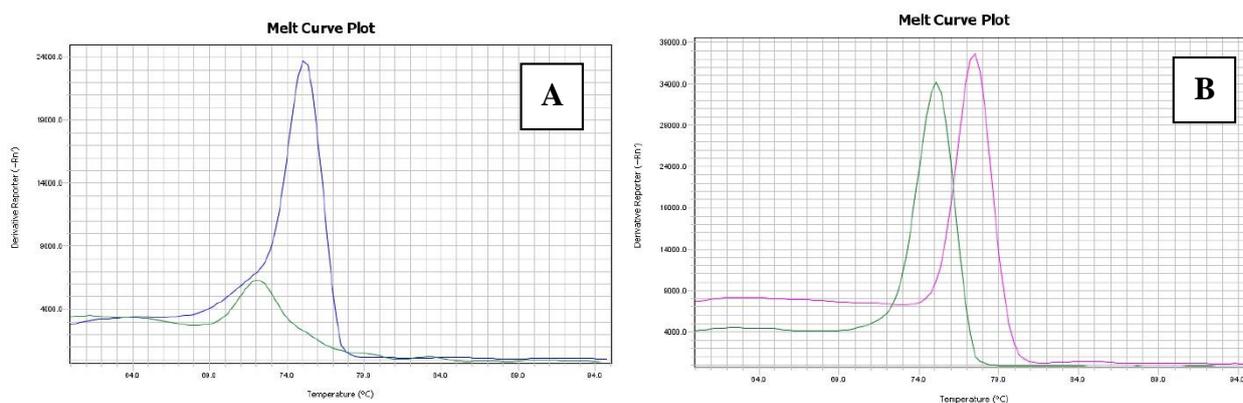


Figura 1: Diagnóstico molecular de *L. infantum* em pacientes felinos. A) Paciente felino negativo. B) Paciente canino positivo. Curva de melting dos amplicons obtidos por qPCR para amplificação de kDNA (verde) e mtDNA felino (azul) ou canino (rosa).

Tabela 1: Rendimento de DNA total de sangue periférico de pacientes felinos.

Nº paciente	35	38	41	45	46	47	49	51	52	53	54	56	Média±e.p.
DNA(µg)	2,98	4,30	5,28	3,98	2,78	2,38	1,95	0,78	0,98	1,83	0,98	3,40	2,63±0,41
R _{260/280}	2,90	1,89	1,68	1,84	1,82	1,77	1,47	1,43	1,71	1,77	1,67	1,74	1,81±0,11

Esse mesmo paciente também apresentou resultado negativo para a presença de *L. infantum* no sangue periférico. A triagem de um maior número de animais acometidos por FIV e/ou FeLV poderá, futuramente, corroborar a afirmação de PENNISI e PERSICETTI, 2018.

Outro aspecto relevante para a epidemiologia da LV é que felinos domésticos são assintomáticos, podendo apresentar somente lesões de pele ou oculares de forma extremamente variável. Tal fato dificulta sobremaneira a obtenção de dados epidemiológicos, uma vez que raramente haverá indicação clínica para detecção de *L. infantum* em gatos (BENASSI et al., 2017). No presente estudo, apenas um paciente felino (8,3%) apresentou quadro de apatia por ocasião do exame clínico. Os demais animais (91,7%) apresentaram quadro geral bom. Quatro pacientes (33,3%) apresentaram gengivite e nove (75,0%), algum problema dermatológico

(alopecia, dermatite, prurido, lesões ulcerativas etc.). (**Tabela 2**)

Tabela 2: Dados gerais de pacientes felinos e seus resultados para teste imunocromatográfico de FIV e FeLV e qPCR para detecção de *L. infantum*.

Nº	Sexo	Idade	Estado Clínico Geral	FIV e FeLV	qPCR LV
35	M	10 anos	Bom	FIV (+)	Negativo
38	F	15 anos	Apática	Negativo	Negativo
41	F	8 anos	Bom	Negativo	Negativo
45	F	4 anos	Bom	Negativo	Negativo
46	F	6 anos	Bom	Não testado	Negativo
47	F	4 anos	Bom	Negativo	Negativo
49	F	8 anos	Bom	Não testado	Negativo
51	F	2 anos	Bom	Não testado	Negativo
52	M	1 ano	Bom	Não testado	Negativo
53	M	2 anos	Bom	Não testado	Negativo
54	F	9 anos	Bom	Não testado	Negativo
56	M	1 ano	Bom	Não testado	Negativo

(+) = reagente.

Finalmente, diferente do que ocorre com cães e humanos, a estratégia de detecção de *L. infantum* em felinos também não é plenamente estabelecida. Assim, resultados negativos em testes de sorologia não descartam a presença do parasito, uma vez que a soroconversão é variável em gatos (PENNISI e PERSICHETTI, 2018). Diante do exposto, o diagnóstico molecular de *L. infantum* em felinos é uma estratégia promissora e importante para o monitoramento epidemiológico da LV, especialmente em regiões endêmicas. Esse processo deve ser realizado em conjunto com entidades que trabalham em favor da saúde pública, como as unidades de vigilância de zoonoses dos municípios.

Através do inquérito realizado com entrevistas dos tutores, no presente estudo, constatou-se que 100% já tinham conhecimento prévio acerca da LV. Desses, dois (18,2%) já tiveram cães acometidos pela patologia em suas residências. Os tutores informaram ainda que não realizaram tratamento medicamentoso dos animais, tendo sido realizada a eutanásia dos animais acometidos, através do programa de controle de zoonoses do município de Fortaleza. O inquérito mostrou também que os tutores adotam medidas preventivas de combate ao calazar, através de ações no próprio ambiente (**Figura 2**), como restrição de horário de passeio com os animais e controle de matéria orgânica nos arredores da residência.

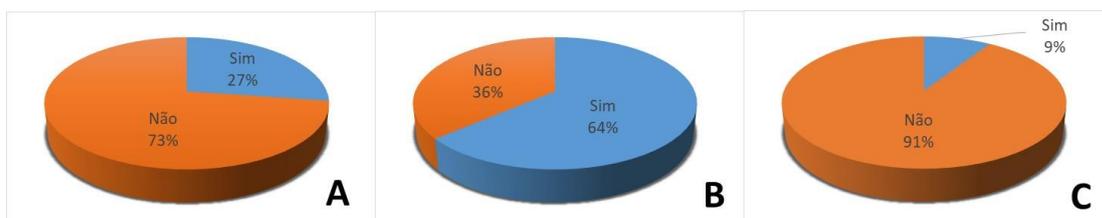


Figura 2: Inquérito sobre medidas preventivas no combate à leishmaniose visceral (LV) realizadas pelos tutores, (A) com foco no animal, (B) com foco no ambiente e (C) com foco em ações do tutor.

Diante do exposto, estratégias baseadas em PCR em tempo real (qPCR) vêm sendo a alternativa mais promissora para a detecção de *L. infantum* em felinos domésticos (BENASSI, 2015). Estudos adicionais na região de Fortaleza, Ceará, são necessários com maior quantitativo de animais, bem como, com outras amostras biológicas (como, swab ocular, swab bucal e pelos), que possam incrementar a sensibilidade do diagnóstico molecular por qPCR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo iniciou, de forma pioneira, a investigação da presença do parasito *L. infantum* em felinos domésticos no município de Fortaleza, através de diagnóstico molecular por qPCR. Um total de 12 pacientes felinos, atendidos no bairro da Jacarecanga, no Centro de Medicina Veterinária da UNIFAMETRO, apresentaram resultado negativo para a presença do parasito. Uma maior quantidade de animais ainda é necessária nessa triagem, a fim de esclarecer o real papel epidemiológico do gato doméstico no ciclo da LV nesse município.

REFERÊNCIAS

BENASSI, J.C. **Detecção de Leishmania spp. por PCR em tempo real em amostras de swab conjuntival de cães, gatos e equinos.** Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2015.

BENASSI, J. C. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, Belo Horizonte, v. 177, n. 291, p. 93-97, jun./2017.

CHAGAS, U. M. R. *et al.* Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: review article. **Elsevier: Experimental Parasitology**, São Paulo, v. 291, n. 3, p. 109-368, mar/2021.

OLIVEIRA, J. V. D. *et al.* **Detecção de Leishmania Infantum em amostras de swab ocular felino através de PCR em tempo real: validação metodológica.** Conexão Unifametro 2020: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária, Fortaleza, p. 1-1, nov./2020. Disponível em: <https://doity.com.br/anais/conexaounifametro2020/trabalho/169021>. Acesso em: 11 out. 2021.

OLIVEIRA, M. T. D. *et al.* **Amplificação de DNA mitocondrial canino para diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral por PCR em tempo real.** Conexão Unifametro 2019: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária, Fortaleza, p. 6-6, nov./2019. Disponível em: <https://doity.com.br/anais/conexaounifametro2019/trabalho/123781>. Acesso em: 11 out. 2021.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. **Elsevier: Experimental Parasitology**, São Paulo, v. 291, n. 3, p. 131-137, mar./2018.

SPADA, E. *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 53-58, fev./2016.