



UNIVERSIDADE DE
vassouras

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária

PAULA GONFINETTI CUKIER

**CULTIVO *in vitro* PARA DETECÇÃO DE
INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. EM
FELINOS DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO
DE VOLTA REDONDA-RJ**

**VASSOURAS
2023**

Paula Gonfinetti Cukier

**Cultivo *in vitro* para detecção de infecção por
Leishmania spp. em felinos domésticos no
município de Volta Redonda-RJ**

**Trabalho Final do Mestrado
Profissional em Diagnóstico em
Medicina Veterinária da
Universidade de Vassouras para
obtenção do título de Mestre em
Diagnóstico em Medicina
Veterinária.**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação Mestrado Profissional em Diagnóstico em
Medicina Veterinária

Orientador(es):

Prof. Dr^a Priscilla Nunes dos Santos, Universidade de Vassouras
Doutor pela UFRRJ-Seropédica, Brasil

Prof^a. Dr^a. Bruna de Azevedo Baêta, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Doutor pela UFRRJ-Seropédica, Brasil

Prof^a. Dr^a. Glenda Ribeiro de Oliveira, Universidade Federal de Juiz de Fora
Doutor pela UFRRJ-Seropédica, Brasil

**VASSOURAS
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

Cukier, Paula Gonfinetti

CULTIVO *in vitro* PARA DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR
Leishmania spp. EM FELINOS DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE
VOLTA REDONDA-RJ / Paula Gonfinetti Cukier. - Vassouras: 2023.
x, 35 f. ; 29,7 cm.

Orientador: Priscilla Nunes dos Santos. Coorientador: Bruna de Azevedo
Baêta e Glenda Ribeiro de Oliveira

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em Mestrado Profissional
em Diagnóstico em Medicina Veterinária - Universidade de Vassouras, 2023.
Inclui Bibliografias e Material Anexo.

1. Leishmaniose. 2. zoonose. 3. diagnóstico. 4. saúde pública. I. Santos,
Priscilla Nunes dos. II. Oliveira, Bruna de Azevedo Baêta e Glenda Ribeiro
de. III. Universidade de Vassouras. IV. Título.

Sistema Gerador de Ficha Catalográfica On-line - Universidade de Vassouras

ATA DE DEFESA



UNIVERSIDADE DE
VASSOURAS

Ata da Defesa de Dissertação (Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária)

Aos 08 dias do mês de setembro de 2023, às treze horas, no bloco 5, sala 5302, reuniu-se em sessão pública a Comissão Examinadora constituída pelos (as) professores (as) Dr^a. Priscilla Nunes dos Santos (Universidade de Vassouras), Dr^a. Bruna de Azevedo Baêta (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), Dr^a. Glenda Ribeiro de Oliveira (Universidade Federal de Juiz de Fora), Ana Paula Martinez de Abreu (Universidade de Vassouras) e Dr. Matheus Dias Cordeiro (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), sob a presidência do (a) primeiro (a), para a Defesa da Dissertação do(a) Mestrando(a) **PAULA GONFINETTI CUKIER**, intitulada: **"DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DE *Leishmania spp.* EM FELINOS DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE VOLTA REDONDA - RJ "**.

A banca deliberou pela:

aprovação da aluna.

Vassouras, 08 de setembro de 2023.

Priscilla Nunes dos Santos
Dr^a Priscilla Nunes dos Santos
Orientadora

Baêta
Dr^a. Bruna de Azevedo Baêta
Coorientadora

Glenda Ribeiro de Oliveira
Dr^a Glenda Ribeiro de Oliveira
Coorientadora

Ana Paula M. de Abreu
Dr^a. Ana Paula Martinez de Abreu
Examinadora Interna

Matheus D. Cordeiro
Dr. Matheus Dias Cordeiro
Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pela oportunidade, incentivo e apoio desde a minha graduação. Principalmente meu pai, Sidney Cukier, que por diversas vezes se disponibilizou a me acompanhar nas viagens semanais até a FIOCRUZ e foi incansável. Às minhas Professoras e orientadoras que admiro imensamente Dr^a Priscilla Nunes dos Santos, Dr^a Bruna de Azevedo Baêta e Dr^a Glenda Ribeiro de Oliveira, pela oportunidade, compreensão, apoio, ensinamentos e orientação. Ao Professor Dr. Matheus Dias Cordeiro pelos ensinamentos, ajuda, paciência, e também por ter disponibilizado seu laboratório para execução de partes do trabalho. Aos componentes do laboratório LDP-UFRRJ pela ajuda essencial. Ao Dr. Artur Velho pela ajuda, ensinamentos, e por sempre ter me recebido com gentileza. A Dr^a Janaína Soledad, e aos médicos veterinários do CCZ por me auxiliarem durante a coleta das amostras, e por me receberam com gentileza mesmo muitas das vezes atrapalhando suas rotinas. À Professora Dr^a Erica Roier que me ajudou a conseguir todos os materiais e sempre esteve disponível para resolver qualquer questão. Agradeço aos meus amigos que sempre me apoiaram, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse traba

RESUMO

A Leishmaniose é uma zoonose de distribuição mundial causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, transmitida aos hospedeiros vertebrados através do repasto sanguíneo das fêmeas de mosquitos flebotômíneos. Os inquéritos epidemiológicos realizados em municípios com histórico de Leishmaniose em cães sugerem que a proximidade dos cães ao ambiente domiciliar pode ser um fator significativo para disseminação do protozoário e ocorrência extrasilvestre da infecção em humanos e felinos domésticos, atualmente considerados hospedeiros acidentais. Endêmica em algumas áreas da região Sudeste, os casos de Leishmaniose aumentaram consideravelmente a partir de 2010 nas regiões do Médio Paraíba onde está localizado o município de Volta Redonda-RJ. Tendo em vista as mudanças no padrão de transmissão e o crescimento territorial da enfermidade, o objetivo do trabalho consiste em identificar a presença do protozoário nos felinos domésticos através da técnica de cultivo *in vitro*. Foram coletadas amostras de tecido, aspirados de linfonodo e sangue de animais oriundos de 18 bairros do município de Volta Redonda-RJ (n=50). As amostras coletadas foram encaminhadas para o INI – Fiocruz para realizar pesquisa do protozoário com a técnica de cultivo “*in vitro*”. Os resultados demonstraram cultivo negativo para *Leishmania* spp. em 96% das amostras, e inconclusivo em 4% por contaminação por fungos. Os resultados podem contribuir para atualização das informações epidemiológicas da doença e sua ocorrência em felinos no município. E, além disso, o informe técnico para o diagnóstico da doença constitui uma ferramenta que possibilitará uma abordagem mais precisa por parte de veterinários em relação à doença.

Palavras-chave: Leishmaniose, zoonose, diagnóstico, saúde pública.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a worldwide zoonotic disease caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*, transmitted to vertebrate hosts through the blood meal of female phlebotomine sandflies. Epidemiological surveys conducted in municipalities with a history of Leishmaniasis in dogs suggest that the proximity of dogs to the domestic environment may be a significant factor in the spread of the protozoan and the occurrence of the infection in humans and domestic cats, which are currently considered accidental hosts. Endemic in some areas of the Southeast region, cases of Leishmaniasis have increased considerably since 2010 in the regions of Médio Paraíba where the municipality of Volta Redonda-RJ is located. Considering the changes in the transmission pattern and the territorial growth of the disease, the objective of this study is to identify the presence of the protozoan in domestic cats through the "in vitro" culture technique. Tissue samples, lymph node aspirates, and blood samples were collected from animals from 18 neighborhoods in the municipality of Volta Redonda-RJ (n=50). The collected samples were sent to INI - Fiocruz for protozoan research using the *in vitro* culture technique. The results showed negative culture for *Leishmania* spp. in 96% of the samples, and inconclusive in 4% due to fungal contamination. The results can contribute to the updating of epidemiological information on the disease and its occurrence in cats in the municipality. In addition, the technical report for the diagnosis of the disease constitutes a tool that will enable a more precise approach by veterinarians in relation to the disease.

Key-words: Leishmaniasis, zoonosis, diagnosis, public health.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Relação dos bairros em que os tutores dos animais residem e o número de casos de LVC confirmados em cada bairro a partir do mês de setembro de 2018 ao ano de 2021.....11
- Tabela 2 – Relação dos animais quanto ao local da coleta, quadro clínico prévio e amostra biológica coletadas.....14
- Tabela 3 – Resultado do cultivo *in vitro* para *Leishmania* sp. das amostras coletadas.....17

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais diagnosticados com esporotricose submetidos à eutanásia. (A) animal nº 21; (B) animal nº22; (C) animal nº 27 e (D) animal nº 38.....16

Figura 2 - Animais com úlceras cutâneas e diagnóstico negativo para esporotricose. (A) animal nº 32 e (B) animal nº 20.....16

LISTA DE ABREVIACÕES

CEUA - Comissão de ética no uso de animais
EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IgG - Imunoglobulina
INI/ FIOCRUZ - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Estado
LC - Leishmaniose Cutânea
LF - Leishmaniose Felina
LIT - Liver infusion Triptose
LMC- Leishmaniose Muco-cutânea
LV - Leishmaniose Visceral
LVC - Leishmaniose Visceral Canina
LVH - Leishmaniose Visceral Humana
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS - Ministério da Saúde
n - Número de felinos
NNN - Nicolle, McNeal, Novy
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPAS - Organização Panamericana de Saúde
PAAF - Punção aspirativa por agulha fina
PBS - Solução Salina de Fosfato Tamponada
SFB - Soro Fetal Bovino
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
SFM - Sistema fagocítico mononuclear
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	OBJETIVOS.....	11
	2.1 Objetivo Geral.....	11
	2.2 Objetivos Específicos.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
	3.1 Amostragem.....	11
	3.1.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	12
	3.1.2 Comissão de ética no uso de animais - CEUA.....	12
	3.1.3 Termo de anuência.....	12
	3.1.4 Descrição dos casos.....	12
	3.1.5 Descrição dos bairros.....	13
	3.1.6 Coleta de amostras.....	13
	3.2 Isolamento em cultivo <i>in vitro</i>	14
	3.3 Informe técnico.....	14
4	RESULTADOS.....	14
5	DISCUSSÃO.....	18
6	APLICABILIDADE.....	19
7	IMPACTO PARA A SOCIEDADE.....	20
8	CONCLUSÃO.....	20
9	REFERÊNCIAS.....	21
10	ANEXOS.....	27
	10.1 TCLE.....	27
	10.2 Termo de anuência.....	29
	10.3 CEUA.....	30

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma zoonose de distribuição mundial causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* transmitida aos hospedeiros vertebrados através do repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos flebotomíneos, insetos popularmente conhecidos como “mosquitos-palha” (Brasil, 2007; Brasil, 2020).

As leishmanioses são um crescente problema de saúde pública não só no Brasil, mas em todo continente Americano (Brasil, 2006). Segundo a Organização mundial da saúde (OMS), apesar de ser considerada uma endemia em franca expansão geográfica, são negligenciadas e possuem altas taxas de casos subdiagnosticados. Inicialmente as leishmanioses estavam associadas a ambientes silvestres e às áreas rurais de clima seco e com ambiente fisiográfico composto por vales/montanhas (Brasil, 2006). Todavia, principalmente devido às diversas alterações ambientais e alta capacidade adaptativa dos vetores, inquéritos entomológicos evidenciaram expansão para as cinco regiões do Brasil, incluindo áreas urbanas de médio e grande porte. Pode ser encontrado no peridomicílio, principalmente em residências com acúmulo de matéria orgânica em decomposição, árvores frutíferas, galinheiros, chiqueiro e canil (Brasil, 2006).

A enfermidade pode se manifestar em formas clínicas distintas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucosa/Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV), dependendo da espécie responsável pela infecção e sua relação com o hospedeiro (Longoni *et al.*, 2012; Brasil, 2020). Parasita intracelular obrigatório com tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), as formas amastigotas do protozoário são encontradas nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, enquanto a forma promastigota é extracelular e se desenvolve no interior do aparelho digestivo do vetor (Rey, 2001). No Brasil já foram identificadas sete espécies de protozoários com potencial zoonótico, sendo seis pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*. Amplamente distribuída em todo o país, a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é incriminada como o principal agente etiológico causador da LC, transmitida principalmente por vetores das espécies *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia migonei* (Brasil, 2020; Brasil, 2021). A espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* é considerada a principal responsável por causar a LV, forma sistêmica e crônica da doença que quando não tratada pode evoluir para óbito. No Brasil duas espécies são incriminadas pela transmissão da LV, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis* considerada a principal espécie vetora na maior parte do território brasileiro, exceto no estado do Mato Grosso do Sul, onde a espécie *Lutzomyia cruzi* está relacionada com grande parte dos casos reportados (Brasil, 2006; Brasil, 2020). Atualmente a LV é endêmica em 76 países, incluindo o Brasil, e já foi descrita em 12 países da América

Latina. Dos casos registrados de LV na América Latina no ano de 2014, 90% ocorrem no Brasil. Segundo o Ministério da Saúde (MS), estima-se que ocorre cerca de 3.500 casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) anualmente no Brasil, e para cada caso de LVH há cerca de 200 casos de Leishmaniose Visceral Canina (Brasil, 2020).

No ambiente silvestre os principais hospedeiros vertebrados são raposas da espécie *Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*, além de marsupiais didelfídeos da espécie *Didelphis albiventris*. Toda via, diversas espécies de animais como a preguiça (*Choloepus hoffmanni* e *Choloepus didactylus*) e roedores (*Nectomys squamipes*) já foram relatados com a infecção (Dantas-torres *et al.*, 2007; Rey, 2008). Além disso, o protozoário já foi identificado em equídeos, felídeos, considerados hospedeiros acidentais uma vez que não há evidências que comprovem o papel desses animais como reservatórios (Brasil, 2017).

Atualmente o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é considerado como a principal fonte de infecção em áreas urbanas e periurbanas, favorecendo a ocorrência do ciclo extrasilvestre da LV, forma grave da doença (Brasil, 2020). Quando infectados apresentam alto grau de parasitismo tecidual, característica de grande importância para manutenção do ciclo epidemiológico do protozoário, e aumento da prevalência da infecção no ambiente domiciliar e peridomiciliar (Brasil, 2006, Brasil 2020).

Com aumento considerável do número de casos de LVC no país nos últimos anos, a infecção já foi relatada em 25 estados brasileiros (Brasil, 2020; Sinan/MS, 2022). Os inquéritos epidemiológicos realizados em municípios com histórico de LVC sugerem que a proximidade dos cães ao ambiente domiciliar pode ser um fator significativo para disseminação do protozoário e ocorrência extrasilvestre da infecção em humanos e felinos domésticos (*Felis catus*), considerados atualmente como hospedeiros acidentais (Nunes *et al.*, 2010; Molina *et al.*, 1994; Pennisi *et al.*, 2018).

Com a popularização dos felinos como animais de companhia, áreas endêmicas para leishmaniose em cães e humanos passaram a relatar felinos com quadro sugestivo da enfermidade (Pennisi *et al.*, 2018). É importante ressaltar que as fêmeas dos flebotomíneos possuem hábito de se alimentar a partir do crepúsculo e durante a noite, horário que coincide com os hábitos dos felinos, aumentando o risco de infecção nesses animais (Morais, 2014; Reis *et al.*, 2019). Pesquisas realizadas no Brasil evidenciaram a transmissibilidade de *L. (L.) chagasi* de felinos domésticos (*Felis catus*) infectados naturalmente para o flebotomíneo através do teste de xenodiagnóstico, sugerindo que esses animais podem atuar como potenciais reservatórios da enfermidade (Silva *et al.*, 2010; Moraes, 2014; Vitoi, 2020). Desta forma, é de grande valia incluir a Leishmaniose Felina (LF) no diagnóstico diferencial dos animais com lesões sugestivas provenientes de áreas endêmicas (Da silva *et al.*, 2008; Pinto, 2013; Gontijo *et al.*,

2011). Realizar o diagnóstico das leishmanioses é um desafio tendo em vista a falta de sinais clínicos patognomônicos e a variedade de achados clínicos e laboratoriais comuns a outras infecções de maior recorrência na rotina clínica (Brasil, 2006). Além disso, animais infectados no período pré-patente são difíceis de serem identificados, já que podem desenvolver sinais clínicos após meses ou até anos de exposição (Brasil, 2006). Devido resposta imunológica celular eficaz contra o patógeno, grande parte dos felinos infectados são assintomáticos ou oligossintomáticos na ausência de doenças imunossupressoras concomitantes, e como consequência, dificilmente são diagnosticados (Attipa *et al.*, 2017). Dessa forma, além do resultado do exame clínico, é importante associar os dados epidemiológicos do caso e os resultados dos exames laboratoriais recomendados para obtenção de um diagnóstico seguro. Os resultados obtidos nos exames podem ser discrepantes devido à diferença nos valores de sensibilidade e especificidade entre os métodos, o que indica a necessidade da adoção de diferentes técnicas. O diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Felina (LF) é semelhante ao realizado na doença canina e humana, todavia, para eleição do método a ser utilizado, deve ser levado em consideração suas limitações e interpretação clínica (Brasil, 2006). Atualmente, é preconizado pelo MS realizar testes imunocromatográficos, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para triagem e monitoramento dos cães, além de exames parasitológicos e moleculares considerados como exames confirmatórios (Brasileish, 2018; Brasil, 2007; Solano-gallego *et al.*, 2009; Gontijo *et al.*, 2011; Dantas-torres *et al.*, 2017). Apesar das técnicas sorológicas serem amplamente utilizadas para diagnóstico da leishmaniose em cães e humanos, com pouca informação da infecção em felinos e a falta de padronização da técnica para detecção nesses animais, os testes sorológicos são pouco empregados para realizar o diagnóstico da enfermidade (Simões-mattos *et al.*, 2005). Alguns estudos se dedicaram a realizar inquéritos epidemiológicos nesses animais, principalmente em municípios receptivos e com transmissão confirmada da infecção em cães. Com aumento da prevalência da infecção em diversos municípios, os casos de LF passaram a ser reportados em todo território, com o primeiro caso oficial da região Sudeste reportado em 1996 no estado de Minas Gerais. Ainda com poucos inquéritos realizados em felinos no país, o primeiro caso de LF do estado do Rio de Janeiro ocorreu no ano de 2004, contabilizando quatro casos positivos até o ano de 2020, com um caso no município de Barra Mansa em 2009, área considerada não endêmica (Oliveira *et al.*, 2020; Schubach *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2009). Com altas taxas de casos subdiagnosticados, é provável que a baixa quantidade de casos notificados seja atribuída a escassez de inquéritos sorológicos em áreas endêmicas, e por se assemelhar clinicamente a LF de outras doenças comuns em gatos. Como consequência muitos animais só são diagnosticados quando se tornam sintomáticos (Da silva *et al.*, 2008). Dessa

forma, é interessante incluir sistematicamente a LF no diagnóstico diferencial de gatos que apresentem lesões cutâneas sugestivas, principalmente daqueles provenientes das áreas endêmicas, uma vez que não há sinais patognomônicos dessa enfermidade (Da silva *et al.*, 2008, Grevot *et al.*, 2005). O município Volta Redonda- RJ, relatou o primeiro caso autóctone de LVC e de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) no ano de 2011 (Campos *et al.*, 2013; Sangenis *et al.*, 2014). De acordo com o boletim epidemiológico das Leishmanioses nº 001/2021 publicado pela Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, durante o período de 01/01/2019 a 31/12/2020 foram diagnosticados 20 casos de LC em humanos no estado, com 5 casos confirmados no município de Volta Redonda, reforçando a necessidade de realizar inquéritos epidemiológicos na área a fim de identificar reservatórios do protozoário (Brasil, 2021).

O exame parasitológico é considerado “padrão-ouro” para diagnóstico da infecção já que a visualização de protozoários na amostra biológica é um diagnóstico preciso que pode ser realizado em diversos materiais, tais como aspirados obtido de punções hepática, esplênica, gânglios linfáticos e medula óssea, além de biópsia ou escarificação de pele (Rey, 1991; Gontijo, 2002). Estudos com o isolamento do parasito em meios de cultivo *in vitro* e *in vivo* revelaram a existência de duas formas de *Leishmania*, a forma promastigota (extracelular) observada no tubo digestivo do inseto vetor, e amastigota (intracelular) encontrada nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Gontijo, 1991). O exame parasitológico direto é comumente utilizado na rotina clínica, por ser prático e de baixo custo. No entanto, o exame parasitológico direto não permite identificar e caracterizar a espécie infectante, e, além disso, a presença de infecções concomitantes causadas por outros agentes que prejudicam a visualização do protozoário na amostra. O diagnóstico parasitológico pode também ser estabelecido por meio da detecção do parasito inoculados em meios de cultivo específicos (exames parasitológicos indiretos), nos quais as formas amastigotas presentes na amostra biológica transformam-se em promastigotas, podendo ser observadas em microscopia de contraste de fase (Laurenti, 2009). O mesmo material coletado para a realização do exame direto pode ser utilizado em exames parasitológicos indiretos (Brasil, 2011; Brasil, 2015). Em vista da possibilidade de visceralização de espécies dermotrópicas e da manifestação cutânea na LV, recomenda-se o isolamento e a caracterização do protozoário (Brasil, 2006). A demonstração de formas amastigostas do parasita, tanto dentro do macrófago como na forma livre permitem o diagnóstico definitivo da infecção (Pirajá *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo investigar a infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos provenientes do município de Volta Redonda-RJ através da técnica de cultivo *in vitro* visando contribuir para identificação das espécies circulantes no município.

2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar pesquisa parasitológica das espécies de *Leishmania* através da técnica de cultivo *in vitro*;
2. Propagação do protozoário em meio de cultura e posterior caracterização por isoenzimas;
3. Elaborar um informe técnico de diagnóstico de leishmaniose felina destinada a Médicos Veterinários

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O número amostral foi calculado com base na média dos casos de LVC no município no ano de 2018, 2019 e 2020. Os dados foram fornecidos pelo CCZ porém não publicados (Tabela 1). Utilizando-se o software Epiinfo calculou-se um “n” de 50 animais utilizando a fórmula $N \cdot Z^2 + p \cdot (1-p) / (N-1) \cdot e^2 + Z^2 \cdot p \cdot (1-p)$. Os animais foram selecionados sem critério de raça, idade e bairro onde reside.

Tabela 1 – Relação dos bairros em que os tutores dos animais residem e o número de casos de LVC confirmados em cada bairro a partir do mês de setembro de 2018 ao ano de 2021.

Bairros	Nº do animal	Nº de LVC a partir de 09/2018	Nº de LVC em 2019	Nº de LVC em 2020	Nº de LVC em 2021	Total
Jardim Belmonte	16	-	1	5	2	8
Siderlândia	17, 18, 44 e 45	-	2	4	4	10
São Luiz	19 e 20	-	2	-	2	4
Conforto	21	-	1	4	2	7

Santo Agostinho*	22 e 27	1	17	8	15	41
Belmonte	23	-	5	10	3	18
Caieira	24 e 25	-	-	1	2	3
Santa Cruz	26	-	-	1	2	3
Água limpa	28, 29, 30, 32, 47, 48 e 49	3	6	6	5	20
Retiro*	31, 38 e 50	2	28	36	17	83
Padre Josimo	33 e 34	3	2	5	7	17
Três poços*	1 a 15, 35 e 41	1	7	21	11	40
Roma 1	36	-	1	-	1	2
Laranjal	37	3	-	4	8	15
Jardim Amália	39	1	1	4	4	10
Aterrado	40 e 42	-	3	1	-	4
São Lucas	43	-	4	2	1	7
São Geraldo	46	1	1	-	-	2

(*)Bairros com maior média de prevalência de LVC nos anos de 2018 a 2021.

3.1.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Foi solicitada a autorização dos responsáveis para realizar as coletas das amostras biológicas dos animais através do Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

3.1.2 Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade de Vassouras, sob o protocolo número 008/2022 de 03 de novembro de 2022 (Anexo 3) e realizados em conformidade com a legislação nacional brasileira sobre experimentação animal (Lei Federal 11794, 10 a 8-2008).

3.1.3 Termo de anuência

A coleta do material no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) foi autorizada pela Secretaria de saúde do município de Volta Redonda (SMS/VR) (Anexo 2).

3.1.4 Descrição dos casos

Foi realizada coleta da amostra biológica de 15 animais provenientes da uma residência localizada no bairro Três Poços, além da coleta de 35 animais provenientes de 18 bairros do município cadastrados no projeto de castração realizado no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e daqueles com suspeita de esporotricose encaminhados para consulta clínica

no CCZ. Os animais que apresentaram lesões cutâneas foram submetidos ao exame parasitológico direto por impressão por aposição em lâmina (*imprint*) das lesões para pesquisa do fungo da espécie *Sporothrix schenckii*.

3.1.5 Descrição dos bairros

Do total de animais que participaram do estudo, 22 são provenientes dos bairros que apresentaram casos de LVC no ano de 2018 a 2021 confirmados por sorologia (dados não publicados registrados pelo CCZ-VR. Com maiores taxas de prevalência de LVC, os bairros Três poços (1,31%), seguido do Retiro (1,2%) e Santo Agostinho (0,93%) se destacaram dos demais.

3.1.6 Coleta de amostras

Os animais foram submetidos ao exame clínico onde foi realizada inspeção de mucosa, pele e fâneros, além de palpação abdominal e de gânglios linfáticos, todas as alterações foram descritas nas fichas clínicas. Em seguida foi realizada a pesagem dos animais para sedação com cetamina 2 mg/kg associada à xilazina 0,2 mg/kg para iniciar os procedimentos.

Após anti-sepsia foi realizada a coleta de 2 a 5 mL de sangue através da veia cefálica com auxílio de scalp 25G (Safer®) acoplado a uma seringa de 3 mL descartável. Cerca de 2 mL foi acondicionado em tubo contendo anticoagulante (Vacuette®) para obtenção do sangue total e 1 a 2 mL em tubos com ativador de coágulo (Vacuette®) para obtenção do soro.

Para realizar biópsia dos fragmentos de pele foi necessário realizar tricotomia cerca de 3 cm x 3 cm na região da face anterior do músculo deltóide e antissepsia da pele com Álcool, Iodopovidona (Septmax® 10%) e Clorexidina (Riohex® 2%). Após isso foi realizado bloqueio local com cloridrato de lidocaína associado à hemitartarato de epinefrina (XYLestesis® 2%) via subcutânea para coletar os 3 fragmentos cutâneos com auxílio do punch de biópsia descartável de 3 mm (Uniqmed®). Dos fragmentos coletados, dois deles foram armazenados em tubo de polipropileno de 1,5 mL estéril para futuras análises moleculares, e um em tubo de polipropileno de 1,5 mL com solução salina contendo Benzilpenicilina 1200 UI/mL e Estreptomicina 1000 UI/mL para isolamento em cultivo *in vitro*. Após o procedimento foi aplicado epinefrina 1 mg/mL (Hyfren®) no local para vasoconstrição, e unguento (Pearson®) para evitar moscas causadoras de miíase. Além disso, foi realizado uma única punção do linfonodo poplíteo em quantidade máxima de 0,3 ml dos animais que apresentaram tecido linfóide aumentado, o material foi acondicionado em tubo de polipropileno de 1,5 mL estéril contendo solução salina com Benzilpenicilina 1200 UI/mL e Estreptomicina 1000 UI/mL para

isolamento em cultivo *in vitro*.

3.2 Isolamento em cultivo *in vitro*

Essa técnica foi realizada no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI – Fiocruz).

No laboratório as amostras foram submetidas a duas lavagens com a mesma substância utilizada no transporte com a finalidade de minimizar os riscos de contaminação para então serem colocadas em refrigeração a 4°C por 24 horas após a inoculação em meios específicos. Para o cultivo foi utilizado o meio sólido bifásico NNN adicionado ao meio Schneider suplementado com 10% de SFB e após semeadura, acondicionadas em estufas (26 a 28°C). Foram realizadas leituras das lâminas para pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania* sp. em microscópio invertido semanalmente até completar 30 dias.

As amostras foram fragmentadas e semeadas em dois tubos diferentes, sendo o resultado final determinado de acordo com a avaliação dos dois tubos durante quatro semanas. Quando um dos tubos apresentar contaminação por fungos e/ou leveduras são desprezados enquanto o tubo-irmão segue em análise, sendo levado em consideração como resultado final o que é observado neste único tubo. O resultado final é considerado contaminado somente quando os 2 tubos apresentam contaminação.

3.3 Informe técnico

A elaboração do informe técnico foi realizado com conteúdo científico disponível na literatura, principalmente através de materiais fornecidos pelo Ministério da Saúde como o Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral e atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial, além de artigos que abordam leishmaniose em felinos.

4 RESULTADOS

Foi realizada biópsia de pele de todos animais 50/50 (100%) e punção venosa daqueles que não apresentaram quadro de desidratação 48/50 (96%). Além disso, foi realizada Punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos animais que apresentaram gânglios linfáticos aumentados 4/50 (8%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação dos animais quanto ao local da coleta, quadro clínico prévio e amostra coletadas.

<u>Nº do animal</u>	<u>Local da coleta</u>	<u>Quadro clínico prévio</u>	<u>Amostras coletadas</u>
---------------------	------------------------	------------------------------	---------------------------

1	Residência	-	FP e ST
2	Residência	-	FP, ST e AL
3	Residência	-	FP e ST
4	Residência	-	FP e ST
5	Residência	-	FP e ST
6	Residência	-	FP e ST
7	Residência	-	FP e ST
8	Residência	-	FP e ST
9	Residência	-	FP e ST
10	Residência	-	FP, ST e AL
11	Residência	-	FP e ST
12	Residência	-	FP e ST
13	Residência	-	FP e ST
14	Residência	-	FP e ST
15	Residência	-	FP, ST e AL
16	Castração - CCZ	-	FP e ST
17	Castração- CCZ	-	FP e ST
18	Castração- CCZ	-	FP e ST
19	Castração- CCZ	-	FP e ST
20	Consulta- CCZ	Suspeita de Leishmaniose	FP, ST e AL
21	Consulta- CCZ	Esporotricose	FP, ST e SO
22	Consulta- CCZ	Esporotricose	FP, ST e SO
23	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
24	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
25	Castração- CCZ	-	FP e ST
26	Castração- CCZ	-	FP e ST
27	Consulta- CCZ	Esporotricose	FP e ST
28	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
29	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
30	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
31	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
32	Consulta- CCZ	Suspeita de Leishmaniose	FP, ST e SO
33	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
34	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
35	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
36	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
37	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
38	Consulta- CCZ	Esporotricose	FP, ST e SO
39	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
40	Castração- CCZ	-	FP e ST
41	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO

42	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
43	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
44	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
45	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
46	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
47	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO
48	Castração- CCZ	-	FP
49	Castração- CCZ	-	FP
50	Castração- CCZ	-	FP, ST e SO

(FP) fragmento de pele; (ST) sangue total; (SO) soro; (AL) aspirado de linfonodo poplíteo;

Durante o exame clínico dos animais, foi constatado que apenas aqueles encaminhados para consulta clínica 6/50 (12%) apresentaram sintomatologia suspeita de Leishmaniose, tais como lesões ulcerativas nas regiões do focinho e orelhas (Figura 1 e Figura 2). Aqueles que obtiveram resultado positivo para *Sporothrix schenckii* durante a consulta foram submetidos à eutanásia pela secretaria de Saúde após a coleta do material 4/50 (8%).

Figura 1 – Animais diagnosticados com Esporotricose submetidos à eutanásia. (A) animal nº 21; (B) animal nº 22; (C) animal nº 27 e (D) animal nº 38.



Fonte: Arquivo pessoal, Volta Redonda-RJ, 2023.

Figura 2 – Animais com úlceras cutâneas e diagnóstico negativo para esporotricose. (A) animal nº 32 e (B) animal nº 20.



Fonte: Arquivo pessoal, Volta Redonda-RJ, 2023.

O resultado do cultivo *in vitro* foi negativo em 48/50 (96%) das amostras e inconclusivo por contaminação por fungos em 2/50 (4%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado do cultivo *in vitro* para *Leishmania* sp. das amostras coletadas.

Animal	Amostra	Tubo 1	Tubo 2	Resultado final
1	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
2	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
2	Aspirado de linfonodo	(-)	(-)	(-)
3	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
4	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
5	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
6	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
7	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
8	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
9	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
10	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
10	Aspirado de linfonodo	(-)	(-)	(-)
11	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
12	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
13	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
14	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
15	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
15	Aspirado de linfonodo	(-)	(-)	(-)
16	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
17	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
18	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
19	Pele íntegra	(-)	α	(-)
20	Pele íntegra	(-)	α	(-)
20	Aspirado de linfonodo	(-)	(-)	(-)
21	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
22	Pele íntegra	α	α	Inconclusivo
23	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
24	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
25	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
26	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
27	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
28	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
29	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
30	Pele íntegra	α	α	Inconclusivo
31	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
32	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
33	Pele íntegra	α	(-)	(-)
34	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
35	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
36	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
37	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
38	Pele íntegra	(-)	α	(-)
39	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
40	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
41	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
42	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
43	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
44	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
45	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)

46	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
47	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
48	Pele íntegra	α	(-)	(-)
49	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)
50	Pele íntegra	(-)	(-)	(-)

(-) resultado negativo; (α) contaminação por fungos;

5 DISCUSSÃO

Durante a coleta na residência do bairro Três poços, foi analisado as características ambientais e as condições em que se encontravam os animais, no qual apresentou condições favoráveis para proliferação do flebotomíneo, com vasta área de mata com árvores frutíferas e grande quantidade de matéria orgânica em decomposição.

Considerando o aspecto das lesões apresentadas pelos animais que participaram da coleta, e a variedade de lesões cutâneas causadas pela LC e LMC (papulosas, crostosas, pápulo-ulcerativas ou nodulares) que se assemelham com as da esporotricose, é de grande valia incluir essas infecções no diagnóstico diferencial (Barros *et al.*, 2008).

Em cães, os exames parasitológicos negativos não são admitidos como prova de ausência de infecção, sendo necessária a realização dos exames sorológicos no LACEN, não havendo protocolo que atualmente determine as recomendações para felinos. Em casos com resultados parasitológicos e sorológicos negativos/inconclusivos, deve ser realizado o diagnóstico molecular em laboratórios especializados utilizando amostras de sangue ou materiais obtidos através de aspirados de medula óssea e de órgãos do SFM, biópsia de pele e mucosas. Serrano *et al.* em 2008 descreveu no Estado de São Paulo um caso de LF em um animal sintomático com alterações cutâneas características de dermatite crostosa, confirmada com RIFI e ELISA associado ao exame parasitológico e a técnica de PCR. Souza *et al.* (2009) relataram um caso de LF por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em que os sinais clínicos apresentados pelo animal eram semelhantes aos observados em outras doenças comumente diagnosticadas em gatos como a criptococose e esporotricose. A lesão cutânea causada pela esporotricose tem predominantemente característica de goma, no entanto também pode se apresentar na forma verrucosa, em placas ulceradas e nódulos ulcerados ou não (Lyra *et al.*, 2015; Bazzi *et al.*, 2016). Contudo, os animais em que foram observadas lesões ulcerativas sugestivas (n=6) apresentaram resultado positivo para pesquisa direta de *S. schenckii*. O exame parasitológico é considerado padrão-ouro para o diagnóstico das leishmanioses devido ao seu alto valor de especificidade (Da Silva *et al.*, 2005). Evidências apontam que o valor de sensibilidade do exame varia consideravelmente de acordo com a amostra analisada e o método de coleta

empregado (Brasil, 2015). Sampaio *et al.* demonstrou em um estudo realizado no ano de 2002 maior sucesso na pesquisa do protozoário em exames parasitológicos indiretos através de cultivo *in vitro* quando comparado com exame parasitológico direto, principalmente em animais com baixa carga parasitária. No entanto, o crescimento *in vitro* de *Leishmania* spp. pode variar conforme a espécie infectante e sua interação em diferentes tipos de meios de cultura, dessa forma, é de grande importância conhecer as espécies circulantes na área de estudo para definir o meio mais apropriado para cultivo (Lainson *et al.*; 1994). Estudos demonstraram que para realizar crescimento inicial de *Leishmania* spp. em condições artificiais é indicada a utilização do meio bifásico NNN, que contém uma fase sólida a base de agar e sangue de coelho, e uma fase líquida (Brasil, 2011). O meio NNN é comumente associado ao meio Liver infusion Triptose (LIT) ou Schneider, visto que esses líquidos aceleram a positividade da cultura (Brasil, 2017). A maioria dos meios de cultivo necessitam da associação de soro bovino fetal ou eritrócitos lisados, importante para a reprodução do parasito (Sadigursky, 1986; Schuster, 2002; Armstrong, 1994; Warburg, 2008). Em um estudo realizado por Marzochi *et al.* (1993) foi evidenciado que as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* apresentam baixas taxas de replicação em meio NNN, corroborando com Niño *et al.*, 2005, o qual evidenciou que a taxa de replicação do parasita varia conforme a espécie, sendo a taxa de replicação de *L. (L.) amazonensis* similar em dois meios de cultura diferentes ocorrendo em cerca de 48h, e a *Leishmania (V.) braziliensis* entre 72 e 96h. Esse meio tem sido utilizado principalmente no cultivo com material obtido através de aspirados de medula óssea, punção esplênica e biópsia de pele, uma vez que as formas amastigotas se multiplicam no interior dos macrófagos presentes nesses tecidos (Brasil, 2011; Brasil, 2006; Brasil, 2007;). Apesar das amostras obtidas de biópsia cutânea serem consideradas apropriadas para o isolamento de *Leishmania*, estudos demonstram que a produção de promastigotas é lenta mesmo em tecidos de pacientes com alta carga parasitária (Limoncu *et al.*, 1997). Além disso, a distribuição do protozoário no organismo não é uniforme e há divergências com relação ao tipo de material e o local onde deve ser realizada a coleta para garantir um diagnóstico acurado. Estudos apontam que o cultivo *in vitro* do parasita é vulnerável à contaminação secundária por fungos e bactérias, acarretando em diagnósticos inconclusivos principalmente dos animais em que foram obtidas amostras em local com presença de microbiota natural como a pele (Okot-kotober *et al.*, 1985; Palomino *et al.*, 1983). Evidências apontam que apesar da adição de antifúngicos nos tubos de coleta evitar esse tipo de contaminação, seu uso deve ser evitado por causar interferência no isolamento e no crescimento de *Leishmania* spp. (Palomino *et al.*, 1983; Mello *et al.*, 2010).

6 APLICABILIDADE

Por meio deste estudo procurou-se contribuir com a caracterização das espécies de *Leishmania* circulantes em felinos no município de Volta Redonda. Além disto, através do manual, espera-se que o conteúdo científico revisado na literatura seja transmitido de forma clara, atualizando e facilitando o entendimento de médicos veterinários sobre infecção em felinos, sobretudo os métodos de diagnóstico disponíveis e medidas de prevenção que vão auxiliar no controle vetorial.

7 IMPACTO PARA A SOCIEDADE

As leishmanioses são um crescente problema de saúde pública não só no Brasil, mas em todo continente Americano. A falta de informações sobre a infecção favorece diagnósticos incorretos, muitas vezes induzindo o abandono e eutanásia dos animais. É importante ressaltar que a eutanásia dos animais reagentes tem se mostrado uma medida ineficaz, já que os transmissores do protozoário não são eliminados, sendo necessário adotar medidas preventivas. Além disto, o conhecimento sobre a doença incluindo diagnóstico em potenciais reservatórios como os felinos é de grande importância para o planejamento do controle da doença. Portanto, o informe técnico constitui uma ferramenta que possibilitará uma abordagem mais precisa por parte de veterinários em relação à doença.

8 CONCLUSÃO

As amostras encaminhadas para o cultivo foram acondicionadas em tubo estéril sem adição de qualquer substância antifúngica para não interferir no crescimento das leishmanias, e realizada em meios de cultivo específico para *Leishmania* spp. com leitura das lâminas até completar 30 dias para definir o resultado. É importante ressaltar que a realização de inquéritos epidemiológicos é uma ferramenta que auxilia no monitoramento das leishmanioses, possibilitando a adoção de estratégias de controle e prevenção adequadas para minimizar a propagação da infecção. O conhecimento sobre a doença incluindo diagnóstico em potenciais reservatórios como os felinos é de grande importância para o planejamento do controle da doença. Dessa forma, os resultados podem contribuir para atualização das informações epidemiológicas da doença e sua ocorrência em felinos. E, além disso, o informe técnico para o diagnóstico da doença constitui uma ferramenta que possibilitará uma abordagem mais precisa por parte de veterinários em relação à doença.

9 REFERÊNCIAS

ALVAR, J., CAÑAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., & NIETO, J. Canine Leishmaniasis advances in parasitology, 1–88, 2004. Doi:10.1016/s0065-308x(04)57001-x

ALVARES, O. E. Spliced Leader (SL) RNA: análises de gene e regiões intergênicas com aportes na filogenia, taxonomia e genotipagem de *Trypanosoma spp.* de todas as classes de vertebrados. Tese de Doutorado, São Paulo, 2017. Doi: <https://doi.org/10.11606/T.42.2018.tde-15022018-161025>

Armstrong TC, Patterson JL. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. **J Parasitol.** 80(6): 1030-2, 1994.

ATTIPA, C.; PAPASOULIOTIS, K., GALLEGGO, L. S. Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vectorborn, pathogens in cats from Cyprus. **Parasites & Vectors**, Estados Unidos da América, v. 10. n. 130, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346881>

BARROS, M.B.L., SCHUBACH, A.O., SCHUBACH, T.M.P., WANKE, B., LAMBERT-PASSOS, S.R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol Infect.** 136(9), 2008.

BAZZI, T., MELO, S. M. P., FIGHERA, R. A., KOMMERS, G. D. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesq. Vet. Bras.** 36(4), 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000400009>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2006. ISBN 85-334-0742-4

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV.** 1. ed., rev. e ampl. – Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2015. ISBN 978-85-334-2256-8

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria do Estado de Saúde. Gerência Técnica de Zoonoses. Boletim Epidemiológico da Leishmaniose Visceral, Brasília, Editora do Ministério da Saúde 2020. Disponível em: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/08/Boletim-Epidemiol%C3%B3gico-Leishmaniose-SE-32.pdf>

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia de Bolso Leishmaniose Visceral.** Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Editora do Ministério da Saúde 1, 11-109, 2020.

Brasil. Conselhos Regionais de Medicina Veterinária. CRMV-PR **Manual Técnico de Leishmanioses Caninas Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral.**

Paraná, Brasil, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. Editora do Ministério da Saúde, 2020. ISBN 978-85-334-2706-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose Tegumentar**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília. 1, 1-180, 2017. ISBN 978-85-334-2474.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Subsecretaria De Vigilância Em Saúde. Superintendência De Vigilância Epidemiológica e Ambiental. Coordenação De Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico Leishmanioses Nº 001/2021**. Rio de Janeiro. 2021.

CAMPOS, M. P. D., SILVA, D. A., MADEIRA, M. F., JÚNIOR, A. A. M. V., FIGUEIREDO, F. B. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 424-426, 2013. ISSN 1984-2961.

CUPOLILLO, E., GRIMALDI, G., MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, p.296-311, 1994.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DA SILVA, A. V. M., DE SOUZA CÂNDIDO, C. D., DE PITA PEREIRA, D., BRAZIL, R. P., CARREIRA, J. C. A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, 105(1), 92–94, 2008. Doi:10.1016/j.actatropica.2007.09.001

FIGUEIREDO, F.B., BONNA, I.C.F., NASCIMENTO, L.D., COSTA, T., BAPTISTA, C., PACHECO, T.M.V., *et al.* Avaliação sorológica para a detecção do anticorpo 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**. (42):141-5, 2009.

FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANOGALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SANCHEZ, A., ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

GONTIJO, B. B., PAVÃO, F. F., SILVA, S. F. A., TAVARES, G. C., COELHO, G. L. Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **Pubvet**, Minas Gerais, 2011. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/2110/esporeticose-e-leishmaniose-tegumentar-em-catildees-e-gatosnbspsemelhancedilas-e-diferencedilas>

GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(3), 338–349, 2004. Doi:10.1590/s1415-790x2004000300011

GONTIJO, C.M. *et al.* **Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley**, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*. 81: 143-50, 2002.

GREVOT, A., JAUSSAUD, H. P., MARTY, P., PRATLONG, F., OZON, C., HASS, 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.

LAINSON, SHAW, J., SILVEIRA, F. T, SOUZA, A., BRAGA, R. R., ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the co-epidemiology of the disease in Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na LVA canina. Artigo de revisão. Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50). Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil. 6(67):13-23, 2009.

LIMONCU, E.M., BALCIOGLU, C., YERELI, K; OZEBEL, Y., OZBILGIN, A. A New experimental In Vitro Culture Medium for Cultivation of *Leishmania* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 2430-2431, 1997.

LYRA, M.R., VALLE, A.C., PIMENTEL, M.I., ANTONIO, L.F., LURA, J.P., ARAÚJO, R.C., SCHUBACH, A.O. Scar examination in sporotrichosis. Na additional tool for clinical diagnosis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**. 81:290-2, 2015.

LYRA, M.R., PIMENTEL, M.I., MADEIRA, M. DE F., ANTONIO, L. DE F., LYRA, J.P., FAGUNDES, A., SCHUBACH, A. DE O. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo. 57(5):451-4, 2015.

LONGONI, S. S., LÓPEZ-CESPEDES, A., SÁNCHEZ-MORENO, M., BOLIO-GONZALEZ, M. E., SAURI-ARCEO, C. H., RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I., & MARÍN, C. Detection of different *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using a niron superoxidodismutase excreted as antigen. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 35(5), 469–476, 2012. Doi:10.1016/j.cimid.2012.04.003

MADEIRA, M. F., SCHUBACH, A. O., SCHUBACH, T. M., LEAL, C. A., MARZOCHI, M. C. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 440–444, 2004.

MARZOCHI, M. C. A., *et al.* Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport, preliminary report. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**. v. 35. n. 03. p. 301-303, 1993.

MELLO, C.X. Comparação dos procedimentos de "imprint" e escarificação no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Mestrado Acadêmico. Rio de Janeiro. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

MELLO, G. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v. 54, n. 12, p. 180, 1940.

MELLO, C. X. MADEIRA, M. F., NÓBREGA, A., ABRANTES, S. Avaliação do efeito dos

antimicrobianos benzilpenicilina estreptomomicina e flucitosina, no crescimento “*in vitro*” de *leishmania braziliensis*. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ. **Revista Analytica**, n.49, 2010.

MOLINA, R., AMELA, C., NIETO, J., SAN-ANDRES,M., GONZALEZ, F., CASTILLO, J.A., LUCIENTES, J., ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491- 493, 1994.

MORAIS, C. S. D. M. Leishmaniose Felina: Revisão de Literatura. Monografia apresentada como requisito para conclusão do curso de Pós-Graduação, Especialização em Clínica médica de Felinos, do Centro de Estudos Superiores de Maceió da Fundação Educacional Jayme de Altavila, São Paulo, 2014. Disponível em: https://www.equalisveterinaria.com.br/wp-content/uploads/2019/01/Leishmaniose_Felina_-_pos_graduacao_veterinaria_equalis.pdf

NIÑO, A., CAMACHO, M. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* growth in vitro culture relies more on folic acid availability than *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis*. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro. v. 100, n. 3, p 309-310, 2005.

NUNES, C. M., PIRES, M. M. P., DA SILVA, K. M., ASSIS, F. D., GONÇALVES, F. J., PERRI, S. H. V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 131–133, 2010.

OLIVEIRA, T. M. F. S., LEONEL, J. A. F., SILVA, D. T., ALVES, M. L., VIOTIL, G., SOARES, R. M., STARKE-BUZETTI, W. A. Leishmaniose Felina no Brasil. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2020.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, 2018

OKOT-KOTOBER, B. M. A rapid chromatographic method for elimination of fungal contamination in in vitro cultures of *leishmania* spp. **Parasitology**, 91:1, 1985.

PALOMINO, J. C.; GUERRA, H.; LUMBRERAS, H. A. Selective liquid Medium for Primary Isolation of South American *Leishmanias*. **Trop. med Parasit**, 34:229,1983.

PENNISI, M. G., PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology** 251, 131–137, 2018. Doi:10.1016/j.vetpar.2018.01.012

PENNISI, M. G., CARDOSO, L., BANETH, G., BOURDEAU, P., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., SOLANO-GALLEGO, L. Leish Vet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, 8(1), 2015. Doi:10.1186/s13071-015-0909-z

PINTO, P. M. F. Prevalência da infecção por *Leishmania* sp. em gatos residentes no Concelho de Cascais. 2013. Dissertação de Mestrado. Lisboa. Disponível em: <http://recil.grupolusofona.pt/handle/10437/4837>

REY, L. Bases da parasitologia. Ed. Guanabara Koogan, v. 2, 2001.

REY L. *Leishmania* e leishmanioses: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed. p. 182-92, 1991.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 4 ed, 2008.

REIS, L. M. S. D. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos de Leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, no período de 2013 a 2017. Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Teresina, 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/31714>

REIS, L. L. DOS, BALIEIRO, A. A. DA S., FONSECA, F. R., & GONÇALVES, M. J. F. Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Cadernos de Saúde Pública**, 35, 2019. Doi:10.1590/0102-311x00047018

SADIGURSKY, M. & BRODSKYN, C. F. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemaflagellates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 35(5): 942- 44, 1986.

SANGENIS, L. H. C.; LIMA, S. R. A.; MELLO, C. X.; CARDOSO, D. T.; MELLO, J. N.; ESPÍRITO SANTO, M. C. C.; TAVARES, W. Expansion of visceral leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 271-274, 2014. ISSN 0036-4665

SCHUBACH, T.M.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; MADEIRA, M.F.; SANTOS, I.B.; ANDRADE, M.V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M.C.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 3, p. 165-167, 2004.

SERGEANT, E., LOMBAARD, J., QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bull Soc. Pathol Exotique**, 5:93-8, 1912.

SERRANO, A.C.M., NUNES, C.M., SAVANI, E.S.M., NICOLETII, S.R., BONELLO, D.F.L., VASCONCELOS, R.O., *et al.* Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. **Clin Vet**, (76):36-40, 2008.

SHUSTER, F. L., SULLIVAN, J. J. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. **American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 374-389, (2002).

SILVA, S. M., RABELO, P. F. B., GONTIJO, N. F., RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N., RIBEIRO, V. M., MICHALICK, M. S. M. Primeiro relato de infecção de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania (Laishmania) infantum* de um gato infectado naturalmente do Brasil. **Parasitologia Veterinária**, v. 174, n. 1-2, p.150-154, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., BANETH, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, 165(1-2), 1–18, 2009. Doi:10.1016/j.vetpar.

SOLANO-GALLEGO L, RODRÍGUEZ-CORTÉS A, INIESTA L, QUINTANA J, PASTOR J, ESPADA Y. Crosssectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the

Northwestern Mediterranean. **Am J Trop Med**, 76, 2007.

SOUZA, A.L., NUNES, V.L.B., BORRALHO, V.M., ISHKAWA, E.A.Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil : A case report . **J Venom Anim Toxins Trop Dis**, 15(2):359-65, 2009.

WARBURG, A., GELMAN, S., DEUTSCH, J. Xanthine in urine stimulates growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. **J Med Microbiol**, 57:136-8, 2008.

10 ANEXOS

10.1 TCLE

Comitê de Ética em Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Diagnóstico parasitológico e molecular de *Leishmania sp.* em felinos domésticos no município de Volta Redonda-RJ.

Orientador da Pesquisa: Priscilla Nunes dos Santos

Telefone e e-mail do Pesquisador: (21) 98869-4376
priscilla.santos@universidadedevassouras.edu.br

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade: Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280 – bloco 06 – Térreo – Centro – Vassouras/RJ. E-mail: cep@universidadedevassouras.edu.br - Telefone: (24) 2471-8379 – de 08 às 18 horas.

Informações ao participante ou responsável

1. Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo realizar o diagnóstico em felinos através do método de isolamento e cultura do protozoário, além de realizar diagnóstico molecular desses animais a fim de identificar os possíveis reservatórios do parasita.
2. Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as seguintes explicações que informam sobre o procedimento a ser realizado.
 - Imobilização do animal para coleta de sangue
 - Aparar pelos em uma pequena região (cerca de 5cm x 5cm)
 - Aplicação de anestésico local (Nome comercial Lidocaína)
 - Limpeza e assepsia do local (álcool e Iodopovidona)
 - Coleta de tecido para realizar o exame de biopsia
 - Limpeza do local com água oxigenada
 - Aplicação de medicamento para parar o sangramento (Adrenalina)
3. Você poderá se recusar a participar da pesquisa e poderá abandonar o procedimento em qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo. Durante o desenvolvimento deste estudo, você poderá se recusar a responder qualquer pergunta caso não se sinta à vontade.

4. A participação do animal como voluntário sob qual você detém a tutela não oferecerá nenhum privilégio, seja ele de caráter financeiro ou de qualquer natureza, podendo se retirar do projeto em qualquer momento sem prejuízo para você ou o animal envolvido.

5. Existe os possíveis riscos ao participar deste estudo:
Estresse do animal durante a contenção (a coleta será feita por profissionais experientes, de modo a evitar um manejo inadequado que exceda a tolerância do animal);

Sangramento durante/após o procedimento de biópsia, com possibilidade de formação de hematoma (será feita administração de adrenalina para evitar sangramentos);

Inflamação/infecção da ferida inflamatória (haverá aplicação de uma solução de água oxigenada na ferida cirúrgica e orientações ao tutor sobre cuidados com a mesma de modo a evitar complicações);

Pode haver desconforto do participante ao presenciar a coleta de material biológico (sangue e fragmento de pele). Salientamos a sua inteira liberdade de se recusar a participar ou se retirar da pesquisa em qualquer momento do andamento da mesma, sem penalização.

6. A pesquisa pretende trazer os seguintes benefícios:

Estudos dessa natureza são essenciais para direcionar as medidas de controle da zoonose que devem adotadas pelos órgãos competentes do município visto que um dos fatores de risco de maior importância na transmissão das Leishmanioses é presença de reservatórios (animais infectados) no ambiente domiciliar.

7. A sua participação e do seu animal como voluntário não deverá causar nenhum ônus financeiro, sendo todo custeio da pesquisa feita pelo pesquisador. É dado ao participante ou responsável o direito a indenização (cobertura material para reparação de danos) causado pela pesquisa ao participante dela quando necessário.

8. Serão garantidos o sigilo e a privacidade das informações que você fornecer, sendo-lhes reservado o direito de omissão de sua identificação ou de dados que possam comprometê-lo.

10.2 Termo de anuência



Estado do Rio de Janeiro
Prefeitura Municipal de Volta Redonda
Secretaria Municipal de Saúde



Sistema
Único
De Saúde

TERMO DE ANUÊNCIA

Eu, Priscilla Nunes dos Santos, na qualidade de orientador (a) pelo Curso de pós-graduação em diagnóstico em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, solicito autorização da realização da pesquisa intitulada "Diagnóstico parasitológico e molecular da *Leishmania* sp. em felinos domésticos do município de Volta Redonda-RJ" a ser conduzida sob minha responsabilidade e dos (as) discentes Paula Gonfinetti Cukier.

Atenciosamente,

Priscilla Nunes dos Santos
Orientador (a)

De acordo em: 25/01/2023

MARIA DA CONCEIÇÃO DE SOUZA ROCHA
Secretária de Saúde do município de Volta Redonda (SMS/VR)

Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda
Rua São João Batista nº 35 – Bairro Niterói – CEP: 27215-390
Telefone: (24) 3339-9696 E-mail: gs.sms@epdvr.com.br

10.3 CEUA

 <p>UNIVERSIDADE DE VASSOURAS</p>	<p>UNIVERSIDADE DE VASSOURAS REITORIA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA</p> <p>Universidade de Vassouras, Avenida Expedicionário Oswaldo Almeida Ramos, 280 CEP: 27.700-000. Fone: (24) 2471-8377. E-mail: ceua@universidadedevassouras.edu.br</p>
--	---

OFÍCIO CEUA Nº. 024/2022, de 03 de novembro de 2022.

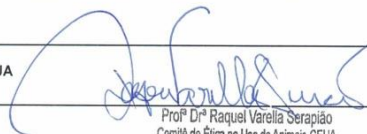
Ilmo.

Sra. Profa. Priscilla Nunes dos Santos

Certificamos que a proposta intitulada: “**Diagnóstico parasitológico e molecular da leishmania sp. em felinos domésticos do município de Volta Redonda - RJ**” registrada com o protocolo nº 008/2022, sob a responsabilidade de Priscilla Nunes dos Santos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE VASSOURAS, em reunião de 27/10/2022.

Finalidade	(x) Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/02/2022 Término: 01/02/2025
Espécie/linhagem/raça	Gatos
Nº de animais	50
Peso/Idade	-----
Sexo	-----
Origem	Particular

Coordenação da CEUA
Assinatura:



Prof.ª Dr.ª Raquel Varela Serapião
Comitê de Ética no Uso de Animais-CEUA
Universidade de Vassouras
Coordenadora - Mat. 100277

