



Diagnóstico molecular de agentes parasitários e coronavírus em gatos no Nordeste do Brasil

Tainã R. Pesqueira¹, Gabriel F. S. Martins¹, Ila F. Farias¹, Anna M. C. F. Evaristo¹, Felipe S. Sento Sé², Flávio R. B. Oliveira², Thállitha S. W. J. Vieira³, Flávia C. M. Collere³, Rafael F. C. Vieira^{4,5}, Paulo E. Brandão⁶, Mauricio C. Horta^{1*}

¹Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina - PE, Brasil.

²Médico Veterinário, Autônomo, Petrolina - PE, Brasil.

³Vector-Borne Diseases Laboratory, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Paraná - PR, Brasil.

⁴Department of Public Health Sciences, University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, USA.

⁵Center for Computational Intelligence to Predict Health and Environmental Risks (CIPHER), University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, USA.

RESUMO

OBJETIVO

O presente estudo realizou diagnóstico molecular e analisou fatores de risco associados à infecção de *Leishmania* sp., *Mycoplasma* sp., *Bartonella* sp. e Pan-coronavírus em gatos do Nordeste do Brasil.

MÉTODOS

Foram obtidas 127 amostras sanguíneas e 52 amostras de swabs retal de gatos domiciliados e errantes que foram extraídas e submetidas à PCR com alvo na região kDNA de *Leishmania* spp. e do gene *gltA* de *Bartonella* spp.; e triadas por PCR em tempo real (qPCR) direcionado para o gene *16S rRNA* de *Mycoplasma* sp. Amostras de RNA extraídas dos sobrenadantes de suspensões fecais foram submetidas à PCR visando gene *pan-coronavírus nsp12*.

RESULTADOS

A frequência de positividade foi de 12,6% (16/127) para hemoplasmas e 4,7% (6/127) para *Leishmania* spp., sendo identificada co-positividade para ambos os agentes em 0,79% (1/127) dos gatos avaliados. As amostras para *Bartonella* spp. e *pan-coronavírus* não foram amplificadas. Dos animais positivos para *Leishmania* e *Mycoplasma*, 66,6% (4/6) e 81,2% (13/16), apresentaram maior frequência de sinais clínicos como: êmese, apatia e pirexia.

CONCLUSÕES

Este estudo relata, pela primeira vez, coinfeção por *Leishmania* spp. e hemoplasmas em gatos da mesorregião do São Francisco, Nordeste do Brasil, expressando risco no subdiagnóstico de doenças felinas relevantes em saúde pública.

DESCRITORES

Coronavírus, Hemoparasitoses, Diagnóstico, Leishmaniose, Coinfeção.

Autor correspondente:

Maurício C. Horta.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias no Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil. Rodovia BR 13 407, km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n, C1, Petrolina, PE, 56300-990, Brasil. E-mail: horta.mc@hotmail.com/ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3834-8398>

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

INTRODUÇÃO

Gatos domésticos podem atuar como reservatórios de importantes agentes patogênicos zoonóticos¹, como por exemplo *Leishmania* spp. *Mycoplasma* sp. *Bartonella* sp. e *Coronavírus*.

Durante muito tempo, gatos foram considerados refratários à infecção por doenças transmitidas por vetores², mas estudos recentes os identificaram como hospedeiros sentinelas na cadeia epidemiológica da Leishmaniose, especialmente em áreas endêmicas^{3,4,5}. Estudos sobre leishmaniose felina (FEL) ainda são limitados⁶ e o sub-diagnóstico da enfermidade na espécie representam um risco adicional à manutenção de hospedeiros competentes em áreas de risco^{1,6}. Ademais, trabalhos que relatam coinfeção de FEL com outras doenças em gatos são escassos⁷ e o reconhecimento sobre o potencial zoonótico de doenças amplamente disseminadas na população de gatos, como a micoplasmose hemotrófica (hemoplasmose)⁸ e agentes causadores de anemia relevante nesses animais⁹, precisam ser melhor elucidados.

Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias cosmopolitas^{10,11} que infectam uma grande diversidade de mamíferos¹² podendo causar anemia grave e letal nos gatos afetados⁹. A testagem de gatos, especialmente doadores por meio da PCR é recomendada¹², bem como controle de ectoparasitas, principalmente pulgas *Ctenocephalides felis felis*¹² que reconhecidamente são associadas também, à transmissão de outro agente zoonótico comum de gatos, como *Bartonella* spp¹³.

A bartonelose é uma zoonose bacteriana transmitida por mordidas ou arranhões de gatos, cuja amplitude de distribuição foi evidenciada com detecções registradas no mundo e no Nordeste brasileiro^{1,14,15}. Em humanos, *Bartonella henselae* é a causadora da Doença da Arranhadura do Gato (DAG), zoonose que pode se manifestar atipicamente, resultando em infecções sistêmicas com febre e encefalite grave¹⁶.

Nos gatos, o coronavírus felino (FCoV), pertence ao gênero *Alphacoronavirus*, espécie *Alphacoronavirus 1*, é o agente causador de importante doença de curso progressivo letal em felinos domésticos e selvagens, a Peritonite Infecciosa Felina (PIF)¹⁷. Embora SARS-CoV-2 e FCoV sejam vírus taxonomicamente distantes¹⁸, estudos recentes evidenciaram semelhanças na patogenia e imunopatogenia de gatos acometidos por PIF e humanos com COVID-19, sugerindo que informações sobre CoVs felinos podem ser relevantes no entendimento de mecanismos patogênicos da doença em humanos¹⁸. Ademais, a obtenção de um diagnóstico definitivo da PIF *ante-mortem* é desafiador e a disponibilidade atual de tratamentos não impede o óbito de gatos infectados^{19,20}.

Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo realizar diagnóstico molecular e análise de fatores de risco associados à infecção por *Leishmania* spp., hemoplasmas, *Bartonella* spp. e Coronavírus, em gatos domiciliados e errantes na região Nordeste do Brasil.

MÉTODOS

Todos os procedimentos de coleta do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco sob o protocolo 0003/031220 (CEUA- UNIVASF).

Este estudo foi realizado no município de Petrolina (9° 19' 41" S; 40° 33' 30" W), Pernambuco, localizado na mesorregião do São Francisco, inserida em uma região de clima semiárido quente, com temperatura média anual de 25,7 °C, área de 4.558, km² representando 4,81% do território estadual com população estimada de 359.372 habitantes, compondo bioma Caatinga no Nordeste do Brasil^{21,22}.

No período de dezembro de 2020 a outubro de 2021, foram coletadas 127 amostras sanguíneas de gatos, por amostragem

de conveniência não probabilística, sendo 112 de animais domiciliados e/ou semi-domiciliados provenientes de atendimento em clínicas veterinárias locais e 15 de não domiciliados e/ou errantes apreendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Também foram coletadas 52 amostras de sobrenadantes de suspensões fecais obtidos com swabs (39 domiciliados e/ou semi-domiciliados e 13 não domiciliados e/ou errantes) conforme disponibilidade e autorização prévia dos tutores. Foram incluídos no presente estudo gatos sintomáticos com ou sem compatibilidade de quadro clínico relacionado à manifestação das doenças avaliadas no estudo, ou assintomáticos encaminhados para avaliação de rotina pré-cirúrgica, com faixa etária a partir dos seis meses de vida, sem distinção de gênero ou condições de criação específicas.

Os animais foram submetidos à venopunção da veia jugular ou cefálica e as amostras foram acondicionadas em tubos com EDTA e após processamento, armazenadas a -20 °C. As amostras de swab retal foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL, sendo mantidas à -20 °C até realização das análises moleculares.

Foram obtidas fichas clínicas dos animais atendidos nas clínicas veterinárias parceiras e coletado dados resultantes do exame físico realizado nos animais do CCZ visando identificar a presença de sinais clínicos e fatores de risco que pudessem ser relacionados à infecção pelos agentes estudados. As variáveis consideradas no estudo foram sexo (macho/ fêmea), idade (seis a 12; 13 a 84 e acima 85 meses), presença de ectoparasitas (sim/não), estilo de vida do animal (domiciliado/não domiciliado), histórico de fuga ou brigas (sim/não), além da presença ou ausência de sinais clínicos compatíveis com a manifestação das doenças investigadas (sim/não), tais como apatia, caquexia, mucosas hipocoradas, icterícia, esplenomegalia, linfadenomegalia, diarreia, uveíte, pirexia, perda de peso, presença de efusões ou sinais neurológicos, ataxia, inclinação de cabeça, nistagmo e convulsões.

A localização dos gatos foi obtida por meio de relatórios clínicos de atendimento, transformados em coordenadas geográficas utilizando o Software Google Earth Pro e georreferenciados pelo QGIS (versão 2.8).

O hemograma dos animais foi determinado usando um contador hematológico automatizado (Analisador automático de Hematologia - BC-5000Vet Mindray®). Foram analisados parâmetros hematológicos do eritrograma (hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas), Volume Globular Médio (VGM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Médio (CHGM) e diferencial do leucograma (leucócitos, segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos).

Visando a pesquisa molecular de *Leishmania* spp., *Mycoplasma* sp. e *Bartonella* spp. a extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se um Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, Madison, USA de acordo com as instruções do fabricante. Para a pesquisa de *Pan-coronavírus* o RNA total foi extraído de sobrenadantes residuais de fezes obtidas com swabs retais usando reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação do DNA de *Leishmania* spp. foi realizada visando amplificação de um fragmento (145 pb) do gene *kDNA*, utilizando os iniciadores RV1 e RV2 de acordo com Lachaud et al.²³. Foi utilizado como controle positivo solução contendo DNA genômico de *Leishmania infantum* de cão naturalmente infectado e o controle negativo de água ultra purificada. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados por transiluminador de ultravioleta. Para confirmação da infecção específica por *L. infantum*, as amostras positivas no gene *kDNA* foram testadas para um fragmento (223 bp) do gene *L-Like* da catapsina de *L. infantum*, conforme preconizado por Da Silva et al.²⁴.

As amostras de DNA extraídos foram triadas para hemoplas-

mas utilizando um ensaio universal de PCR em Tempo real (qPCR) SYBR Green visando um fragmento de 156 pb conforme descrição de Willi et al 2009²⁵. A curva padrão foi calibrada usando diluições em série do gBlock e os parâmetros analisados de acordo com os padrões estabelecidos pelo MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments) sendo que amostras com valor mediano de quantificação do Ciclo (CT) < 32 foram consideradas positivas. Água livre de nucleases e um gBlock sintetizado (IDT, Coralville, IA) visando o gene 16S rRNA de hemoplasmas, foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

A detecção do DNA de *Bartonella* spp. foi realizada por meio da PCR convencional para um fragmento (380 pb) do gene *gltA* do gênero *Bartonella* spp.²⁶. Foi utilizado como controle positivo solução contendo DNA genômico de pulgas *Ctenocephalides felis felis* naturalmente infectadas e o controle negativo de água ultra purificada. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados por transiluminador de ultravioleta.

Para diagnóstico de *Pan-coronavírus*, as amostras foram testadas por cPCR utilizando primers segundo Escutenaire et al²⁷. O DNA complementar (cDNA) foi preparado com primers randômicos e M-MLV Reverse Transcriptase™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguida da PCR com iniciadores PanCo-11Fw (TGA TGA TGS NGT TGT NTG YTA YAA) e PanCo13Rv (GCA TWG TRT GYT GNG ARC ARA ATTC) e GoTaq® Green Master Mix (Promega) visando à amplificação parcial de 179pb do gene da *nsp12*. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em géis de agarose 1,5% corados com Gel Red (Sigma-Aldrich) SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Como controle positivo, foi utilizada a amostra Kakegawa de Coronavírus bovino e, como negativo, água ultrapura.

Foram obtidas fichas individuais de avaliação clínica e resultados de exames voluntariamente cedidas pelas clínicas parceiras. Adicionalmente, para animais domiciliados e não domiciliados (CCZ), foram preenchidos questionários para a obtenção de informações relevantes que pudessem ser associadas ao risco de desenvolvimento da hemoplasmose, bartonelose, e leishmaniose, histórico de infestação por pulgas (*Ctenocephalides felis felis*), utilização de pulicidas, acesso à rua e/ou histórico de fuga, brigas e convivência com outros animais. Considerando fatores de dispersão para FCoV, foi considerado histórico de convivência com outros felinos provenientes de abrigos, gatis e/ou ambientes “multigatos”, com ou sem associação de episódios de estresse relacionado. Na análise univariada, a variável independente foi cruzada com variável dependente, e aquelas que apresentassem $p \leq 0,20$ pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher seriam selecionadas para análise multivariada, por meio de regressão logística múltipla²⁸. O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todos dados foram analisados com o programa SPSS 20.0 Windows.

RESULTADOS

Seis de 127 (4,72%) das amostras de gatos submetidas a PCR com iniciadores RV1 e RV2 foram positivas para detecção de *Leishmania* spp. sendo confirmada infecção por *L.infantum* com PCR alvo para o gene *L-Like* da catepsina. Não foi evidenciada padronização de faixa etária dos gatos positivos que variou de seis a 75 meses de vida. Cinco dos seis indivíduos positivos (83,3%) eram machos, sendo todos domiciliados. Quatro dos seis animais (66,6%) apresentaram manifestação de ao menos um sintoma, tais como êmese e apatia, enquanto 2/6 (33,3%) dos gatos eram assintomáticos.

Um total de 16/127 (12,6%) gatos foram positivos para *Mycoplasma* sp. Gatos machos representaram maioria das amostras

positivas no teste 10/16 (62,5%; 95% CI: 330-2,728%), sendo 50% (8/16) adultos, com faixa etária entre 12 a 84 meses de vida e 93,7% (15/16) domiciliados. Êmese (2,5%), apatia (12,5%) e pirexia (12,5%) foram os sinais clínicos mais relacionados à positividade em 81,2% (13/16) dos animais sintomáticos avaliados.

A análise estatística univariada revelou oito variáveis associadas a infecção por *Leishmania* spp. (êmese, conjuntivite, apatia, linfadenomegalia, diagnóstico clínico de CRF, fraqueza, diarreia e secreção ocular, neutrofilia e trombocitopenia) e três para hemoplasmas (pirexia, lesão generalizada e êmese), sendo que nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa no modelo de regressão logística multivariável (Tabela 1). Um indivíduo mostrou-se positivo na PCR para *Leishmania* spp. e qPCR de hemoplasmas, demonstrando coinfeção entre os agentes, estando ainda co-infectado por *Giardia* spp.

Nenhum animal apresentou ectoparasitas na avaliação física ou histórico prévio relacionado. Nenhuma das 52 amostras de swab retal de gatos submetidas à amplificação do gene RNA polimerase (RNA-dependente dos coronavírus) e DNA de amostras sanguíneas submetidas a PCR para o gene *gltA* gênero *Bartonella* spp. foram positivas.

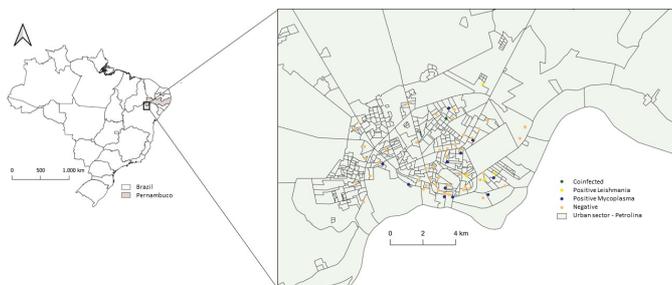
Na análise espacial especificamente sobre a área urbana, foi demonstrado distribuição homogênea das amostras de felinos coletadas, sobre o município de estudo (Figura 1) e dispersão das amostras positivas para *Leishmania* spp. e Hemoplasmas na mesma área geográficas. No entanto uma das amostras positivas para Leishmania não foi possível obter o endereço, pois ele não foi repassado à clínica.

Tabela 1. Prevalência das principais condições clínicas observadas com base na amostra total de gatos sintomáticos (n = 56) e positivos nos testes moleculares de *Leishmania* e hemoplasmas, cidade de Petrolina, Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Sinais clínicos	cPCR				qPCR			
	<i>Leishmania</i> spp.				Hemoplasmas			
	n/t*	(%)	+ (%)	p-Valor	n/t*	(%)	+ (%)	p-Valor
Apatia	2/56	3,5	33,3 (2/6)	0,010	2/56	3,5	12,5 (2/16)	-*
Conjuntivite	1/56	1,7	16,6 (1/6)	0,002	0/56	-	-	-
CRF	1/56	1,7	16,6 (1/6)	0,100	1/56	1,7	6,2 (1/6)	-
Diarreia	1/56	1,7	16,6 (1/6)	0,158	1/56	1,7	6,2 (1/6)	-
Emese	3/56	5,3	50 (3/6)	0,000	2/56	3,5	12,5 (2/16)	0,190
fraqueza	1/56	1,7	16,6 (1/6)	0,100	1/56	1,7	6,2 (1/6)	-
Linfadenomegalia	1/56	1,7	16,6 (1/6)	0,018	0/56	-	-	-
Lesão generalizada	2/56	1,7	-	-	1/56	-	6,2 (1/6)	0,108
Pirexia	0/56	-	-	-	2/56	3,5	12,5 (2/16)	0,022
Secreção ocular	1/56	1,7	16,6 (1/6)	0,158	6/56	-	-	-

*t, número total de amostras de animais sintomáticos; n, número de animais sintomáticos por categoria de sintoma; + (%), prevalência de sintomas nos animais positivos. ($P \leq 0,2$).

Figura 1. Município de Petrolina, Nordeste do Brasil indicando amostras coletadas e gatos positivos (PCR positivo para *Leishmania* sp. e *Mycoplasma* e coinfectado por ambos os agentes) na área urbana.



DISCUSSÃO

No estudo foi encontrada ocorrência de DNA de *L. infantum* em 4,72% dos gatos amostrados. Em áreas endêmicas, tem sido cada vez mais documentada a participação de gatos domésticos como potenciais hospedeiros sentinelas na cadeia

epidemiológica da enfermidade^{3,4,5,29}. A LV está amplamente distribuída no Brasil e no mundo^{6,30}, caracterizada como uma doença emergente e endêmica, sendo amplamente diagnosticada na Região Nordeste do país e no estado de Pernambuco³¹.

Apesar da escassez de estudos relacionados ao estudo de vetores na região Nordeste e Estado de Pernambuco³¹, trabalhos recentes apontam para ocorrência de *Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia whitmani*³², *Lutzomyia migonei* e mais predominantemente, de *Lutzomyia Longipalpis* relacionado à transmissão de *Leishmania infantum* em áreas de risco³³.

De acordo com Nascimento et al²⁹ no Brasil a média de FEL, verificada por métodos moleculares e sorológicos é de aproximadamente 7 a 8%, e foram encontradas frequências de detecção molecular em algumas investigações de 6% e 5,7%^{34,35}, uma média de 5,8%. Esses achados sugerem proximidade das prevalências de infecção identificadas através do diagnóstico molecular com as do presente estudo (4,72%).

Berenguer et al³⁶ encontrou prevalência de 0,7% (1/128) no diagnóstico molecular de *Leishmania infantum* como resultado de um estudo conduzido em áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral no mesmo Estado. Comumente são observadas baixas titulações de anticorpos de *L. infantum* e reduzida parasitemia e positividade nos métodos moleculares em gatos, quando comparada às prevalências observadas na detecção de LV canina^{3,37}, o que pode estar associada a chamada resistência natural atribuída a espécie felina, contra infecções por doenças transmitidas por vetores ou ainda, ao comportamento típico de higienização de gatos, diferenças na resposta imune e diversidade genética da espécie que podem resultar na menor taxa de infectividade nesses animais².

Embora tenha sido verificado que a PCR com alvo para o gene *kDNA* tenha demonstrado boa sensibilidade na detecção de LV canina²³, estudos de desempenho de testes para o diagnóstico de FEL são ausentes e o emprego de técnicas direcionadas a detecção de LV na espécie são os mesmos utilizados para cães²⁹. Ainda assim, pela elevada sensibilidade da técnica molecular quando comparada a outros métodos diagnósticos, espera-se que mais resultados positivos para presença de *Leishmania* spp. sejam obtidos na PCR mesmo em amostras com reduzida parasitemia conhecida, como sangue³⁵.

Neste trabalho amostras positivas para o gene *kDNA* foram testadas e amplificaram consistentemente para o gene *L-Like da Catepsina*. A submissão das amostras a CatLeish-PCR foi uma opção para caracterização da espécie sem a necessidade de realizar o sequenciamento, visto que análises anteriores demonstraram que o marcador é sensível e específico em ensaios diagnósticos de *L. infantum* em pesquisas clínicas e epidemiológicas, sem apresentar variabilidade intraespécie ou reações cruzadas com outras espécies de hemoparasitas²⁴, validando a positividade para *Leishmania* spp. relacionadas a *L. infantum*.

Gatos com FEL podem apresentar sinais clínicos inespecíficos ou serem assintomáticos^{3,4,6} e comumente associada a coinfeções, fator limitante para o reconhecimento de um perfil clínico e subdiagnóstico de LV em felinos⁶. Contudo, investigações de prevalência de FEL demonstraram haver uma correlação significativa entre positividade para infecção e achados de lesões dermatológicas em gatos afetados⁶. Alterações dermatológicas na presença de LV felina foram evidenciadas em um dos gatos positivos para *Leishmania* nesse estudo, incluindo áreas de descamação no corpo e alopecia em pavilhão auricular direito e esquerdo.

Na análise univariável, neutrofilia ($p= 0,129$) e trombocitopenia ($p= 0,051$) estavam entre as alterações laboratoriais evidenciadas em gatos com *Leishmania* desse estudo, mas no modelo final de regressão logística, nenhum dado foi associado ao estado de infecção. Ainda assim, os resultados de neutrofilia corroboram com relatos de aumento na contagem absoluta de neutrófilos em gatos com LV³⁸. Esses resultados reiteram o

caráter inespecífico da infecção observados na ocorrência de leishmaniose felina²⁹ e reforça a necessidade de considerar LV no diagnóstico diferencial de gatos em áreas endêmicas, mesmo na presença de sinais clínicos inespecíficos²⁹.

Gatos machos e domiciliados representaram a maioria das amostras positivas para LV nesse estudo, mas, significância entre gênero e maior risco de infecção por *Leishmania* spp. não foi evidenciada nesta ou em investigação anterior³⁹. Com relação faixa etária metade dos felinos infectados eram indivíduos com 6 a 12 meses de vida, contrastando parcialmente com dados de maior incidência relatada na literatura de infecção de gatos adultos por LV⁴⁰.

A detecção de *Mycoplasma* sp. identificada no presente estudo comprova a exposição de gatos ao agente na região. Vetores artrópodes, especialmente a pulga do gato (*Ctenocephalides felis felis*) e histórico de brigas lacerantes são componentes envolvidos na transmissão da hemoplasmosse felina^{11,41}. A região de estudo, possui clima semiárido quente, que não favorece a manutenção de pulgas⁴² e de fato, infestações por ectoparasitas não foram encontradas ou relatadas nos gatos amostrados, não excluindo a possibilidade, de que em algum momento esses gatos pudessem ter sido expostos a ectoparasitos. Entretanto, infecção de gatos por hemoplasmas foram relatadas mesmo em áreas consideradas livres da ocorrência de infestações por pulgas e carrapatos⁴³. Entre os animais positivos no estudo, havia um gato macho positivo com histórico de fuga e presença de lesões de arranhadura em cabeça, pescoço e membros. Além disso, foi verificado que gatos domiciliados e adultos representaram a maioria das amostras positivas para hemoplasmas, diferentemente dos relatos de maior predisposição de gatos jovens à infecção por *Mycoplasma*².

Êmese, apatia e piroxia foram mais comumente relacionadas a positividade para Hemoplasmas. As manifestações demonstradas nesse estudo, são em parte condizentes com as apresentações clínicas comumente relatadas na hemoplasmosse, que incluem fraqueza, letargia, depressão, mucosas hipocoradas, linfadenopatia, desidratação, caquexia, taquicardia, dispneia, icterícia, piroxia intermitente, esplenomegalia, alterações renais, e pulsos femorais fracos ou limitados com sopros cardíacos⁴⁴. Diferenças na apresentação clínica de gatos com hemoplasmosse pode ser justificada pela presença de infecções crônicas, sem anemia ou cepa infectante¹². Anemia hemolítica grave e fatal em gatos foram mais relatados na infecção por *M. haemofelis*, sendo por outro lado, a infecção por 'Ca. *M. turicensis*' '*Candidatus M. haemominutum*' mais associadas à ocorrência de anemia relevante na presença de comorbidades e retrovírus comuns de gatos^{12,44}. Vale ressaltar que as amostras positivas para hemoplasma verificadas nesse estudo, eram quase que em sua totalidade oriundas de animais atendidos em clínicas veterinárias, o que pode refletir numa maior apresentação de sinais clínicos dos animais avaliados.

A triagem molecular de DNA de amostras sanguíneas indicou presença de coinfeção por *Leishmania* spp. e *Mycoplasma* sp. em um gato, tornando esse estudo o primeiro a documentar coinfeção por ambos os agentes em gatos no Nordeste do Brasil. Coinfeção de *Leishmania* spp. e hemoplasmas em gatos foi relatada no Sudeste do Brasil e continente Asiático^{7,45}, e de *Leishmania* com outros agentes infecciosos comuns de gatos como FIV/FELV⁷. Aqui, o animal coinfectado por *Leishmania* sp. e *Mycoplasma* sp., também estava infectado por *Giardia* spp. O que pode ter resultado na manifestação mais evidente de sintomas gastrointestinais (êmese e diarreia) e outros sinais sistêmicos importantes.

Nesse estudo não foi encontrada nenhuma associação entre resultados positivos na PCR de *Leishmania*, hemoplasmas e presença de FIV ou FELV nos animais amostrados. A baixa associação entre infecção por LV e FIV ou FELV em gatos nesse estudo pode ser explicada pela não adesão de grande parte dos

tutores para realizar a testagem de rotina nesses animais. Reconhecidamente, gastos com saúde preventiva de felinos são negligenciados², fato reforçado pela escassez de pesquisas sobre doenças transmitidas por vetores artrópodes em felinos^{2,7}.

Amostras de DNA com alvo para o gene *gltA* do gênero *Bartonella* spp. não foram amplificadas nesse estudo, e a não observância de infestação dos animais avaliados é ponto a ser considerado na ausência de positividade para o agente. Nesse contexto, os resultados de negatividade aqui verificados podem estar relacionados aos fatores climáticos do local de estudo, tipicamente seco com índices de pluviosidade anual reduzidos que representam um ambiente hostil à manutenção desses vetores^{22,42,46}. Os resultados de negatividade aqui obtidos podem ser justificados pela reduzida concentração de material genético das amostras testadas⁴⁷ e oscilações da bacteremia característica da infecção⁴⁸.

No mesmo sentido, a amplificação do gene *nsp12* de *pan-coronavirus* não foi evidenciada em nenhuma das 52 amostras de swabs retais dos gatos analisados. Reconhecidamente, o diagnóstico de vírus de longa extensão genômica como coronavírus felinos (FcoVs) é complexo⁴⁹, adicionando-se a diversidade gênica natural de coronavírus²⁷ e o elevado índice de mutações associadas que podem resultar em falha na amplificação das amostras⁴⁹. Outros fatores também podem explicar o insucesso na obtenção de amostras positivas nessa investigação incluindo menor disponibilidade de RNA viral na amostra⁵⁰, e especialmente para as amostras cedidas por clínicas veterinárias, o acondicionamento inadequado da amostragem e consequente inviabilidade do material biológico.

Com relação a distribuição espacial dos casos positivos de *Leishmania* spp. e *Mycoplasma* sp., o georreferenciamento confirma a presença e distribuição uniforme desses agentes na zona urbana da região.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam a exposição de gatos à *L. infantum* e *Mycoplasma* sp. na região semiárida de Pernambuco, Nordeste do Brasil, sendo o primeiro relato de coinfeção por ambos os agentes mesma área geográfica. Felinos machos, domiciliados e sem condições clínicas concorrentes com a infecção, representaram maioria dos animais positivos, apontando para a necessidade de pesquisas complementares sobre doenças de transmissão vetorial e com potencial zoonótico na espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro de Controle de Zoonoses de Petrolina, PE pelo auxílio às colheitas dos gatos errantes; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) com suporte financeiro (IBPG 1069-5.05/20 T. R. Pesqueira); à CAPES (bolsa doutorado F. C. M. Collere); e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Produtividade Científica de M. C. Horta (314019/2021-9) e R. F. C. Vieira (313161/2020-8).

REFERÊNCIAS

- Chomel BB. Emerging and re-emerging zoonoses of dogs and cats. *Animals*. 2014; 4(3):434-445. <https://doi.org/10.3390/ani4030434>
- Day, MJ. Cats are not small dogs: is there an immunological explanation for why cats are less affected by arthropod-borne disease than dogs? *Parasites & Vectors*. 2016;9(1):507. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1798-5>
- Pennisi MG, Persichetti MF. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. *Veterinary Parasitology*. 2018; 251:131-137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>
- Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *Journal Venomous Animal Toxins including Tropical Diseases*. 2019; 25:1-10. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0012>
- Dos Santos NS, De Pinho FA, Hlavac NRC, Nunes TL, Almeida NR, Solcà M.S, et al. Feline leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*: parasite sequencing, seropositivity, and clinical characterization in an endemic area from Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021; 8:1-12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.73491>
- Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:302. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>
- Marcondes M, Hirata KY, Vides JP, Sobrinho LSV, Azevedo JS, Vieira TSWJ, et al. Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2018; 11(1):131. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2716-9>
- Dos Santos AP, Dos Santos RP, Biondo AW, Dora JM, Goldani LZ, De Oliveira ST, et al. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14(12):1922-1924. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080964>
- Tasker S, Peters IR, Mumford AD, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Day S, et al. Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. *Journal of Medical Microbiology*. 2010; 59(11):1285-1292. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021691-0>
- Tasker S, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones, TJ, Harbour DA, et al. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(1):439-441. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.439-441.2003>
- Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(3):961-969. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.961-969.2006>
- Tasker S, Hofmann-Lehmann R, Belák S, Frymus T, Addie DD, Pennisi MG, et al. Haemoplasmosis in cats European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2018; 20(3):256-261. <https://doi.org/10.1177/1098612X18758594>
- Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline Medicine and Surgery*. 2013; 15(7):638-642. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489229>
- Hjelm E, McGill S, Blomqvist G. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae*, *B. elizabethae* and *B. quintana* in Swedish domestic cats. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2002; 34(3):192-196. <https://doi.org/10.1080/00365540110080188>
- Fontalvo MC, Favacho ARM, Araujo AC, Santos NMD, Oliveira GMB, Aguiar DM, et al. Bartonella species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. *Brazilian Journal Infectious Diseases*. 2017; 21(3):290-296. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1798-5>

- org/10.1016/j.bjid.2017.02.002
16. Nawrocki CC, Max RJ, Marzec NS, Nelson CA. Atypical manifestations of cat scratch disease, United States, 2005-2014. *Emerging infectious diseases*. 2020; 26(7):1438-1446. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200034>
 17. Hora AS, Asano KM, Guerra JM, Mesquita RG, Maiorka P, Richtzenhain LJ, Brandão PE. Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses? *The Scientific World Journal*. 2013; 2013:572325. <https://doi.org/10.1155/2013/572325>
 18. Paltrinieri S, Giordano A, Stranieri A, Lauzi S. Feline Infectious Peritonitis (FIP) and coronavirus disease 19(COVID-19): are they similar? *Transboundary and emerging diseases*. 2020; 68(4):1786-1799. <https://doi.org/10.1111/tbed.13856>
 19. Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Veterinary Pathology*. 2014; 51(2):505-526. <https://doi.org/10.1177/0300985814522077>
 20. Felten S, Hartmann K. Diagnosis of feline infectious peritonitis: a review of the current literature. *Viruses*. 2019; 11(11):1068. <https://doi.org/10.3390/v11111068>
 21. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Manual técnico da vegetação brasileira. 2012; 253-272. [Acesso em 10 mar 2022]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=263011>
 22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Cidades. [Acesso em 17 mar 2022]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/petrolina/panorama>
 23. Lachaud L, Marchegui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(1):210-215. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>
 24. Da Silva RE, Sampaio BM, Tonhosolo R, Da Costa AP, Costa LES, Nieri-Bastos FA, et al. Exploring *Leishmania infantum* cathepsin as a new molecular marker for phylogenetic relationships and visceral leishmaniasis diagnosis. *BMC Infectious Diseases*. 2019; 19(1):895. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4463-8>
 25. Willi B, Meli ML, Lüthy R, Honegger H, Wengi N, Hoelzle LE, et al. Development and application of a universal hemoplasma screening assay based on the SYBR Green PCR principle. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(12):4049-4054. <https://doi.org/10.1128/JCM.01478-09>
 26. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33(7):1797-1803. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1797-1803.1995>
 27. Escutenaire S, Mohamed N, Isaksson M, Thorén P, Klingeborn B, Belák S, et al. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Archives of Virology*. 2007; 152(1):41-58. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0840-x>
 28. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. 2nd ed. New York: 2000; 1-30.
 29. Nascimento LFJ, Cirilo TM, Gomes DS, Gomes ACA, Lima VFS, Scher R, et al. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. *Parasitol Res*. 2022; 121(1):21-34. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07372-9>
 30. Ministério da Saúde - BRASIL. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral 2022. [Acesso em 20 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>
 31. Dantas-Torres F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*. 2006; 40(3):537-541. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000300024>
 32. Silva JAO, Silva FJ da, Macedo LO de, Santos CVB dos, Alves LC, Ramos RAN, et al. Sandflies in an endemic area for Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2019;28(4). <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019073>
 33. Silva RA, Santos FKM, Sousa LC de, Rangel EF, Bevilaqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet [Internet]*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2014; 23(3). <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014068>
 34. Metzendorf IP, Da Costa Lima MSJ, De Fatima CMM, De Souza Filho AF, De Souza Tsujisaki RA, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta tropica*. 2017; 166:121-125. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.013>
 35. Rocha AVVO, Moreno BFS, Cabral AD, Louzeiro NM, Miranda LM, Santos VMDB. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2019; 273:80-85. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.007>
 36. Berenguer LKAR, Gomes CFCA, Nascimento JO, Bernardi JCM, Lima VFS, Oliveira JB, Ramos CAN, et al. Correction to: *Leishmania infantum* infection in a domestic cat: a real threat or an occasional finding? *Acta Parasitológica*. 2021; 66(2):673-676. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00320-0>
 37. Baneth G, Nachum-Biala Y, Adamsky O, Gunther I. *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* infection in dogs and cats in central Israel. *Parasites & Vectors*. 2022; 15(147). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05272-0>
 38. Chatzis MK, Xenoulis PG, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis ME, Andreadou M, et al. Evaluation of clinicopathological abnormalities in sick cats naturally infected by *Leishmania infantum*. *HELyon*. 2020; 6(10):05177. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05177>
 39. Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2009.11(8):728-370. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.01.009>
 40. 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; 14:656. https://www.megacor.at/useruploads/files/pennisi_leishmania_cat_1.pdf
 41. Willi B, Boretti FS, Meli ML, Bernasconi MV, Casati S, Hegglin D, et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(12):3798-3802. <https://doi.org/10.1128/AEM.02977-06>
 42. Miceli NG, Gavioli FA, Gonçalves LR, André MR, Sousa VR, Sousa KC, et al. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2013; 22(3):385-390. <https://doi.org/10.1590/S198429612013000300011>
 43. Jensen WA, Lappin MR, Kamkar S, Reagan WJ. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *American journal of veterinary research*. 2001; 62(4):604-608. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.604>

44. Barker EN. Update on feline hemoplasmosis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 2019; 49 (4):733-743. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.009>
45. Attipa C, Papasouliotis K, Solano-Gallego L, Baneth G, Nachum-Biala Y, Sarvani E, et al. Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vector-borne, pathogens in cats from Cyprus. *Parasite Vectors*. 2017; 10: 130. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2063-2>
46. Instituto Nacional de Meteorologia - INMET. Brasília. [Acesso em 10 mar 2022]. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/normais>
47. André MR, Dumler JS, Herrera HM, Gonçalves LR, De Sousa KC, Scorpio DG, et al. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2016;18: 783-790. <https://doi.org/10.1177/1098612X15593787>
48. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12(3):389-394. <https://doi.org/10.3201/eid1203.050931>
49. Healey EA, Andre NM, Miller AD, Whitaker GR, Berliner EA. Outbreak of Feline Infectious Peritonitis (FIP) in shelter-housed cats: molecular analysis of the feline coronavirus S1/S2 cleavage site consistent with a 'circulating virulent-avirulent theory' of FIP pathogenesis. *JFMS open reports*. 2022; 8(1):20551169221074226. <https://doi.org/10.1177/20551169221074226>
50. Chen j, Huang C, Zhang C, Zhang S, Jin M. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 - specific antibodies in pets in Wuhan, China. *Journal of Infection*. 2020;81(3):68-69. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.045>