

**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*Leishmania infantum* POR
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) Y ESTUDIO DE FACTORES DE
RIESGO EN GATOS DOMÉSTICOS EN EL PARAGUAY**

Ana Liz Velázquez¹
Milagros Medina¹
Raquel Pedrozo¹
Jorge Miret²
Carla Janeiro Coiro³
Diego Generoso³
Mariana Kikuti³
Rodrigo Costa da Silva³
Helio Langoni³

RESUMEN

La Leishmaniasis es una infección zoonótica, causada por diferentes especies de *Leishmania*, afectando a varias especies de animales mamíferos. Recientes investigaciones han demostrado la participación de los gatos en la cadena epidemiológica de esta enfermedad. Se analizaron 317 muestras sanguíneas de gatos domésticos para verificar la ocurrencia de esta infección, provenientes del área metropolitana de Asunción y del Departamento de Paraguarí, obtenidas por visitas domiciliarias, y de gatos callejeros sometidos a eutanasia en el Centro Antirrábico Nacional de Paraguay, por el método serológico de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). 57 gatos (18%) fueron provenientes de área rural, y 260 gatos (82%) fueron del área urbana. En relación a la edad, 69 gatos (21,8%) tuvieron menos de 1 año, 219 animales (69,1%) entre 1 e 5 años, 27 felinos (8,5%) entre 6 e 10 años y 2 (0,6%) animales que tuvieron por encima de 10 años. En relación al sexo, 184 (58%) fueron hembras y 133 (42%) machos. Apenas 4 (1,3%) de los gatos fueron de raza pura Siamés, los demás 313 felinos (98,73%) fueron mestizos. El análisis de los resultados reveló 3 (0,94%) animales que presentaron anticuerpos positivos anti-*Leishmania* por la técnica de IFI, siendo 1 con una titulación de 1:40 y 2 con una titulación de 1:80. No hubo una asociación estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre la serología positiva y los factores de riesgo dependientes del animal, del hábitat y del manejo de los gatos. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que hasta el momento, los gatos no representan importancia en la cadena epidemiológica de la Leishmaniasis visceral, al compararse con la especie canina, que de manera general presentan una mayor seroprevalencia en las investigaciones seroepidemiológicas en diferentes regiones del Paraguay, factor que merece estudios mas profundos en cuanto al papel de estos animales en la transmisión de la Leishmaniasis visceral.

Palabras-claves: anticuerpos, Leishmaniasis visceral, gatos, inmunofluorescencia indirecta, Paraguay

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV). Universidad Nacional de Asunción (UNA). Ruta Mcal Estigarribia Km½. Campus UNA. San Lorenzo, Paraguay.

² Docente Investigador. Departamento de Medicina Tropical y Bioterio. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS). Universidad Nacional de Asunción (UNA). Río de la Plata y Lagerenza. CP 2511. Asunción, Paraguay Tel: (595-21)422069-423618 fax: (595-21)480185. E-mail: jorgemiret@gmail.com Autor para correspondencia.

³ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnia. Universidade Estadual Paulista – FMVZ/UNESP, Botucatu/SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Cx. Postal 524. Cep 18618-000. Botucatu/SP, Brasil.

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania infantum* PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E ESTUDO DE FATORES DE RISCO EM GATOS DOMESTICOS NO PARAGUAI

RESUMO

A Leishmaniose é uma infecção zoonótica, causada por diferentes espécies de *Leishmania*, afetando vários tipos de mamíferos. Recentes investigações têm demonstrado a participação dos gatos na cadeia epidemiológica desta enfermidade. Foram analisadas 317 amostras sanguíneas de gatos domésticos para verificar a ocorrência desta infecção. O material era proveniente da área metropolitana de Assunção e dos Departamentos de Cordillera e Paraguari, obtidas por visitas domiciliares, ou de gatos de rua submetidos à eutanásia no Centro Nacional Antirábico do Paraguai, pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). 57 gatos (18%) eram provenientes de área rural, e 260 (82%) da área urbana. Com relação a idade, 69 gatos (21,8%) tinham menos de 1 ano, 219 (69,1%) entre 1 e 5 anos, 27 (8,5%) entre 6 e 10 anos e 2 (0,6%) animais tinham mais de 10 anos. Com relação ao sexo, 184 (58%) eram fêmeas e 133 (42%) machos. Apenas 4 (1,3%) gatos eram de raça pura Siamês, e os demais 313 felinos (98,73%) eram mestiços. A análise dos resultados revelou que 3 (0,94%) animais apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* pela RIFI, sendo 1 gato com título 1:40 e 2 gatos com título 1:80. Não houve associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a sorologia e os fatores de risco ligados ao animal, ao habitat e ao manejo dos gatos. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que até o momento, os gatos não representam importância na cadeia epidemiológica da Leishmaniose visceral, ao comparar com a espécie canina, que de maneira geral apresenta uma maior soroprevalência nas investigações soropidemiológicas nas diferentes regiões do Paraguai, fato que revela a importância de estudos mais profundos quanto ao papel destes animais na transmissão da Leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: anticorpos, Leishmaniose visceral, gatos, reação de imunofluorescência indireta, Paraguai.

PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST-*Leishmania infantum* BY IMMUNOFLUORESCENCE ANTIBODY TEST (IFAT) AND RISK FACTORS IN DOMESTIC CATS IN PARAGUAY

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic infection caused by different species of *Leishmania*, affecting many types of mammals. Recent investigations have shown the involvement of cats in the epidemiological chain of this disease. Blood samples from 317 domestic cats were analyzed to determine the occurrence of this infection. The samples were from the metropolitan area of Asuncion and the Department of Paraguari, obtained by home visits or by stray cats euthanized at the National Rabies Paraguay, and were tested by Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). 57 cats (18%) were from rural area, and 260 (82%) from urban area. Regarding age, 69 cats (21.8%) were less than 1 year, 219 (69.1%) had between 1 and 5 years, 27 (8.5%) between 6 and 10 years and 2 (0.6 %) animals had more than 10 years. Regarding gender, 184 (58%) were females and 133 (42%) males. Only 4 (1.3%) cats were purebred Siamese, and the other 313 (98.73%) were crossbred. The results revealed that three

(0.94%) animals presented anti-*Leishmania* antibodies by IFAT, 1 presenting titre 40 and 2 titre 80. No association was statistically significant ($p < 0.05$) between serology and the risk factors related to animal habitat and management of cats. According to the results, so far the cats do not represent importance participation in the epidemiological chain of visceral leishmaniasis when comparing with dogs, which generally has a higher seroprevalence in seroepidemiological investigations in different regions of Paraguay. This fact reveals the importance of further study on the role of these animals in the transmission of visceral *Leishmaniasis*.

Keywords: antibodies, visceral *Leishmaniasis*, cats, indirect immunofluorescence, Paraguay.

INTRODUCCIÓN

El primer estudio de Leishmaniosis felina descrito lo realizó Sergent en 1912, en Algeria-África, en un gato de cuatro meses de edad, que perteneció a un niño afectado de Leishmaniasis visceral, encontrando amastigotes en la médula ósea del gato (1). Los gatos (*Felis domesticus*) son todavía vistos como un reservorio inusual para *Leishmania* sp. Sin embargo varios estudios serológicos (Inmunofluorescencia Indirecta, ensayo inmunoenzimático de ELISA, aglutinación directa DAT, Hemoaglutinación Indirecta HAI, Western Blot) y parasitológicos (citología, histología, aislamiento, caracterización enzimática y monoclonal, xenodiagnóstico y PCR en hígado, bazo, médula ósea, linfonódulo, piel, sangre, estómago, intestino grueso y ojo) en felinos de diversos lugares del mundo han demostrado la presencia de esta infección por: *L. infantum chagasi* en Brasil, (2-4), *L. braziliensis*, en Brasil, (5-7), *L. amazonensis* en Brasil (8), *L. venezuelensis* en Venezuela (9), por *L. infantum*, en Portugal (10,11), Francia (12,13), España (14-16), Italia (17-21), Grecia (22), Suiza (23) e Israel (24), en los Estados Unidos por *L. mexicana* (25,26), en Irán por *L. infantum* (27,28), *L. donovani* en Tailandia (29), *L. major* en Egipto (30). Es evidente un amplio rango (0,0%-60%) de seroprevalencia, lo que puede estar relacionado con diferencias en la metodología, y en los puntos de corte considerados en los niveles séricos (31).

No se encontraron diferencias significativas de prevalencia en cuanto a la época de muestreo, raza, estatus del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), sin embargo se encontró una asociación entre la prevalencia del virus de la leucemia felina (FeLV) y la serología positiva para Leishmaniasis felina (32,33).

La enfermedad se ha diagnosticado mayoritariamente en gatos de razas domésticas de pelo corto, y en menor cantidad en animales de pelo largo. Con relación a la edad la leishmaniasis felina se diagnosticó en gatos adultos o gatos viejos (rango entre los 3 a 5 años y edad media de 8 años) siendo la seroprevalencia mayor en las hembras al compararse con las tasas de infección en los gatos machos.(31).

Con relación al cuadro clínico, las lesiones cutáneas son predominantes; las lesiones que se presentaron fueron úlceras/dermatitis ulcerativa, alopecia, nódulos únicos o múltiples incluso ulcerados, quistes hemorrágicos, dermatitis escamosa, dermatitis costrosa, seborrea, prurito. Entre los síntomas sistémicos se observaron: linfadenomegalia, lesiones oculares, anorexia, pérdida de peso, estomatitis/faucitis, letargo, deshidratación, vómitos, mucosas pálidas, fiebre, hepato-esplenomegalia, ictericia, aborto recurrente y disnea (31).

Entre las alteraciones hematológicas y bioquímicas se observaron: neutrofilia, linfopenia, pancitopenia, eosinofilia, linfocitosis, monocitosis, anemia, hiperglobulinemia, gammapatía, hiperproteinemia, como típicamente se observan en la leishmaniasis canina (31).

Se describió el tratamiento de gatos con leishmaniasis, utilizando el Alopurinol (23,34) a la misma dosis empleada en los perros, también se utilizaron el Antimoniato de Meglumina,

Pentamidina, Fluconazol, Metronizadol, Espiramicina, pero los tratamientos fueron considerados ineficaces. (20,31,32).

Paraguay es un país altamente endémico para *Leishmania infantum chagasi*, y esta enfermedad es muy común en perros (35). Sin embargo, hasta la fecha no se describieron estudios de seroprevalencia de Leishmaniasis felina en el país.

Este trabajo tuvo por objetivo determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en 317 gatos, provenientes de áreas urbanas y rurales por medio de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y su asociación a factores de riesgo en el Paraguay, para de esta forma conocer la situación de la enfermedad ya que los gatos pueden jugar un papel muy importante como reservorio de esta enfermedad debido a su estrecha relación con los humanos y el perro, y este papel debe ser definido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este fue un estudio observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal con componente analítico. Fueron analizadas 317 muestras de sangre de gatos machos y hembras de diversas edades y razas, provenientes de visitas domiciliarias del área metropolitana de Asunción, y de los departamentos de Cordillera y de Paraguari y de gatos callejeros a ser sacrificados por el Programa Nacional de Control de Zoonosis y Centro Antirrábico Nacional (PNCZyCAN) provenientes del área metropolitana de Asunción-Paraguay, colectadas durante el período de Enero hasta Abril del 2010. Las muestras fueron obtenidas por punción de la vena cefálica del antebrazo con la utilización de jeringas y agujas descartables para la colecta de 1 a 2 mL de sangre. Se centrifugaron a 3000 rpm y los sueros fueron acondicionados en microtubos de 1,5 mL identificados individualmente y congelados a -20°C hasta la realización de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Los propietarios o responsables de los felinos respondieron una serie de preguntas formuladas de un cuestionario para evaluar los factores de riesgo dependientes del animal (raza, edad, sexo), factores relacionados al ambiente (habitat urbano o rural, tipo de construcción de la casa y patio, presencia de flebotomos y roedores), y finalmente factores dependientes del manejo del animal (protección del felino contra flebotomos, permanencia del animal dentro o fuera de la casa, destino de la basura, grado de escolaridad del propietario).

La IFI fue realizada en los laboratorios del Núcleo de Pesquisas en Zoonosis (NUPEZO) del Departamento de Higiene Veterinaria y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" UNESP, Botucatu-São Paulo, Brasil. La técnica de IFI para la detección de anticuerpos IgG anti-*Leishmania*, fue realizada de acuerdo con Camargo (1966) (36). Las láminas con el antígeno de *L. infantum (chagasi)*, MHOM/BR/1974/PP75, fueron preparadas pipeteándose 10 µL de suspensión de promastigotes en cada uno de los orificios, retirándose enseguida por aspiración, quedando solamente una película fina. Las láminas fueron secadas a temperatura ambiente y mantenidas en cajas para láminas a -20°C hasta el momento de su uso por un período máximo de dos semanas.

Se utilizaron microplacas para la dilución inicial de 190 µL de solución salina tamponada (PBS) 0,01 M y pH 7,2 y 10 µL de suero para una dilución inicial (primera dilución) de 1:20. Posteriormente, se distribuyeron 100 µL de la primera dilución en 100 µL de la solución de PBS para obtener una dilución de 1:40 (segunda dilución) la cual fue utilizada para la triada de la reacción. De la misma forma fueron diluidos sueros controles: positivos y negativos. En las láminas fijadas con el antígeno de *L. infantum (chagasi)*, se distribuyeron 10 µL de suero diluido (segunda dilución), incubándose a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda. Luego fueron lavadas dos veces en vasos de Coplin con PBS 0,01 M, pH 7,2 por 10 minutos, posteriormente fueron secadas en estufa. El conjugado especie-específico

(Anti gato IgG FITC, Sigma®, USA), fue diluido según su título pre-establecido en solución de Azul de Evans a 20 mg%, el cual fue previamente diluido en PBS 0,01 M y pH 7,2 en la proporción de 1:5.

Fueron distribuidos 10 µL del conjugado para cada dilución, incubándose nuevamente a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda. Se procedió nuevamente al lavado dos veces en vaso de Coplin con PBS 0,01 M pH 7,2 por 10 minutos y luego secadas en estufa. Las láminas fueron montadas con glicerina tamponada pH 8,5, cubriéndose con láminas 24x60 mm, examinándose en el microscopio de Inmunofluorescencia con el aumento de 40. Después de la lectura de los controles se procedió a la lectura de las muestras del estudio, considerándose positivos, las muestras de suero con titulación =1:40. Los sueros positivos a la dilución 1:40 fueron evaluados en diluciones mayores (1:40; 1:80, 1:160, 1:320 y 1:640), para determinar la titulación final de anticuerpos IgG anti-*Leishmania* en gatos.

Los datos obtenidos de las preguntas del cuestionario realizado a los propietarios o responsables de los felinos, fueron correlacionados con la frecuencia de gatos seropositivos encontrados en la prueba serológica de IFI, utilizando la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), utilizando los Programas estadísticos de Epiinfo 3.5.1 y GraphPad Instad 3.06. Se consideró como resultado significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Los aspectos éticos y científicos de este protocolo fueron aprobados por la Coordinación de Tesis de Grado y Postgrado, dependiente del Departamento Académico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción.

RESULTADOS

Del total de muestras de suero de gatos analizados por la técnica serológica de IFI, se obtuvieron 3/317, de muestras positivas para anticuerpos IgG anti-*Leishmania*, observándose una seroprevalencia del 0,94% (Tabla 1). De los animales positivos, un gato presentó títulos de anticuerpos 40 y dos gatos títulos de anticuerpos 80. Los 3 animales seropositivos no presentaron síntomas evidentes de Leishmaniasis felina.

Tabla 1. Resultados de la serología para Leishmaniasis visceral por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en 317 muestras de gatos de Paraguay

IFI	Número de animales	Porcentaje (%)
Positivo	3	(0,94)
Negativo	314	(99,05)
Total	317	(100)

IFI = técnica de Inmunofluorescencia Indirecta; % = porcentaje

Del total de sueros analizados, 142 muestras (44,79%) provinieron de la ciudad de Asunción, 253 muestras (79,81%) del área metropolitana de Asunción, siendo las 3 muestras positivas originarias de la capital del país, las demás muestras de suero de los gatos fueron provenientes de los Departamentos de Cordillera y Paraguarí (Tabla 2).

La edad de los gatos varió en un rango de menos de 1 año hasta gatos de 20 años. Teniendo en cuenta la edad de los gatos con serología positiva, uno de los gatos tuvo la edad comprendida entre los 1-5 años, y los otros dos, estuvieron en un rango de edad entre los 6-10 años. Con relación a la raza, 313 gatos (98,7%) fueron mestizos y solo 4 gatos (1,3%) fueron de la raza Siamés, siendo los 3 animales seropositivos, mestizos. 184 animales (58%) fueron hembras y 133 machos (42%); del total de animales positivos, 1 fue macho y dos fueron hembras. Al evaluarse la variable edad, como factor de riesgo, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,01$); sin embargo las variables: raza y sexo no mostraron una asociación estadísticamente significativa como factores de riesgo ($p \geq 0,05$). (Tabla 3).

Tabla 2. Procedencia de las muestras de suero de los gatos

Departamento	Localidad	Procedencia (%)	Número de animales + / -
Central	Asunción	(44,79)	3/142
Central	Areguá	(1,26)	0/4
Central	Capiatá	(7,25)	0/23
Central	Zeballos-cué	(1,26)	0/4
Central	Fernando de la Mora	(6,94)	0/22
Central	Itauguá	(1,26)	0/4
Central	Lambaré	(0,63)	0/2
Central	Loma Pytá	(2,21)	0/7
Central	Mariano Roque Alonso	(1,26)	0/4
Central	Ñemby	(0,32)	0/1
Central	San Lorenzo	(12,62)	0/40
Central	San Antonio	(1,26)	0/4
Cordillera	Caacupé	(2,52)	0/8
Paraguarí	La Colmena	(7,57)	0/24
Paraguarí	Yaguarón	(3,79)	0/12
Paraguarí	Ybycuí	(4,73)	0/15
Total		(100)	3/317

(%)= porcentaje, += muestra positiva, -= muestra negativa

Tabla 3. Evaluación de los factores de riesgo dependiente del animal

Variables	n (%)	IC (95%)	Positivos (IFI)	p
Edad				
< de un año	69 (21,8)	(17,4-26,8)	0	
1-5 años	219 (69,1)	(63,7-74,1)	1	
6-10 años	27 (8,5)	(5,8-12,3)	2	0,01*
11-15 años	1 (0,3)	(0,0-2,0)	0	
16-20 años	1 (0,3)	(0,0-2,0)	0	
Raza				
Mestizo	313 (98,7)	(96,6-99,6)	3	0,84
Siamés	4 (1,3)	(0,4-4,3)	0	
Sexo				
Hembra	184 (58)	(52,4-63,5)	2	0,76
Macho	133 (42)	(36,5-47,6)	1	

n=número de animales, %=porcentaje, IC=intervalo de confianza, p=probabilidad, *=resultados estadísticamente significativos

Con relación a las encuestas realizadas a los propietarios y/o responsables de los gatos, 183/317 muestras (57,7%) fueron gatos con propietarios, mientras que 134/317 muestras (42,3%), fueron gatos sin dueños por lo cual los datos presentados en las Tablas 3 y 4 se basan en un total de 183 muestras, con excepción de la variable procedencia que se basa de la totalidad de las muestras. Se observó que 2/3 animales positivos fueron gatos con dueños y 1/3 gato fue un animal sin propietario que provino de la calle. Del total de gatos positivos, los 3 provinieron de áreas urbanas y ninguno del área rural.

Se analizaron datos concernientes al hábitat o el medio ambiente de los animales, se observó que los 2 animales positivos procedieron de casas con paredes revocadas, con techo de teja, con patio con piso o cemento, pasto o arena. Al preguntar sobre la presencia de flebotomos en la residencia, propietarios de 99/183 (54,1%) de los gatos, dijeron haberlo visto, siendo que los dos animales positivos provinieron de hogares cuyos propietarios vieron al flebotomo.

En cuanto a la presencia de roedores sinantrópicos, propietarios de 61/183 (33,3%) gatos, observaron ratones/ratas en sus residencias y propietarios de 76/183 (41,5%) gatos, observaron roedores en sus barrios. Al evaluarse todas estas variables como factores de riesgo dependientes del hábitat y/o medioambiente, no se observaron una asociación estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación de los factores de riesgo dependientes del hábitat y/o medio ambiente

VARIABLES	n	(%)	IC(95%)	Positivos (IFI)	p
Paredes de la casa					
Revocado	155	(84,7)	(78,7-89,6)	2	
Ladrillo sin revocar	20	(10,9)	(6,8-16,4)	0	0,94
Madera	7	(3,8)	(1,6-7,7)	0	
Adobe	1	(0,5)	(0,0-3,0)	0	
Techo de la casa					
Teja	155	84,7)	(78,7-89,6)	2	
Cemento, hormigón	2	(1,1)	(0,1-3,9)	0	0,94
Zinc	25	(13,7)	(9,0-19,5)	0	
Paja	1	(0,5)	(0,0-3,0)	0	
Tienen patio la casa?					
Si	182	(99,5)	(97,0-100)	2	0,91
No	1	(0,5)	(0,0-3,0)	0	
Tipo de suelo del patio					
Piso, cemento					
Si	119	(65)	(57,6-71,9)	1	0,65
No	64	(35)	(28,1-42,4)	1	
Pasto					
Si	102	(55,7)	(48,2-63,1)	1	0,86
No	81	(44,3)	(36,9-51,8)	1	
Arena					
Si	163	(89,1)	(83,6-93,2)	1	0,07*
No	20	(10,9)	(6,8-16,4)	1	
Área					
Urbana					
Si	260	(82)	(77,3-86,1)	3	0,41
No	57	(18)	(14,0-22,8)	0	
Rural					
Si	57	(18)	(14,0-22,8)	0	0,41
No	260	(82)	(77,3-86,1)	3	
Vio flebótomos					
Si	99	(54,1)	(46,6-61,5)	2	0,19
No	84	(45,9)	(38,5-53,4)	0	
Vio ratas o ratones en la casa					
Si, pocas veces	45	(24,6)	(18,5-31,5)	1	
Si, muchas veces	16	(8,7)	(5,1-13,8)	0	0,67
No, nunca	122	(66,7)	(59,3-73,4)	1	
Y en el barrio					
Si, pocas veces	54	(29,5)	(23,0-36,7)	1	
Si, muchas veces	22	(12)	(7,7-17,6)	0	0,21
No, nunca	107	(58,5)	(51,0-65,7)	1	

n= número de animales, %= porcentaje, IC= intervalo de confianza, p= probabilidad, * = resultados estadísticamente significativos

En relación al manejo de los gatos con propietario: 162/183 animales (88,5%), permanecen en el patio de la casa de 18-22 hs, además, 156/183 animales (85,2%) permanecen todo el día en la casa. Se observó que 133/183 gatos (72,7%) tienen acceso a los patios baldíos cercanos a la casa.

Al evaluar la variable en donde duerme la mascota, 109/183 gatos (59,6%) duermen en el patio de la casa, mientras que 74/183 gatos (40,4%), duerme dentro de la casa. Al preguntar a los propietarios si protegen a sus animales contra la picadura del flebótomo, solo 8/183 gatos (4,4%) estuvieron protegidos, mientras que en 175/183 gatos (95,7%) no se utilizaron medidas de protección contra la picadura de los flebótomos.

La mayoría de los gatos (79,8%), entierran sus heces, mientras que solo el (18,6%) de los dueños de los felinos colocan las heces en basureros para su posterior eliminación por medio de la utilización del camión recolector de basura en el (59,2%) o quema en el (21,3%) de los casos. Al evaluar, como factor social el grado de escolaridad de los propietarios, se observó que el (18%) de los propietarios tuvieron formación media completa y el 33,3% de los dueños, contaron con formación universitaria completa (Tabla 5).

Al estudiar todas estas variables como factores de riesgo relativas al manejo de los felinos, no se observaron asociación estadísticamente significativa en ninguna de ellas ($p \geq 0,05$).

DISCUSIÓN

Un estudio realizado en Irán, encontraron una prevalencia del 25% en 10/40 gatos utilizando la técnica de IFI y Aglutinación directa (DAT) (28). En Grecia se observó que 7/284 (3,87%) de gatos adultos presentaron títulos positivos de IgG anti-*Leishmania* por el método enzimático de ELISA (22). Utilizando la técnica de ELISA y DAT, se observó una seroprevalencia del 2,8% de un total de 316 gatos domésticos originarios de Norte de Portugal (40). Utilizando la técnica molecular de PCR y la técnica serológica de ELISA, se obtuvo una prevalencia de 8,7% para *L. infantum* en la Isla de Ibiza en España (41).

En un estudio realizado recientemente en Brasil, se observó una prevalencia por el método de ELISA del 14,5% en 31/200 gatos provenientes de un área endémica de Araçatuba-São Paulo (42).

A pesar del hecho que los anticuerpos anti-*Leishmania*, han sido validados para el diagnóstico de la Leishmaniasis canina, su detección no parece ser lo suficientemente sensible como para predecir infecciones por *Leishmania* en gatos (11), ya que el diagnóstico por PCR en sangre periférica no parece guardar una relación estrecha con los anticuerpos circulantes en el suero. La presencia del ADN del parásito en sangre periférica de gatos sugiere que estos animales están continuamente expuestos a la infección (11).

Es evidente que en Europa, donde hay un mayor número de casos recogidos de infecciones naturales por Leishmaniasis felina producidas por una única especie de *Leishmania* (*L. infantum*), es la única especie autóctona endémica en el área mediterránea (31). Sin embargo, en América del Sur, además de la *L. infantum*, agente etiológico de la Leishmaniasis visceral, se han descrito casos de Leishmaniasis cutánea en gatos, ocasionada por infección natural por *L. braziliensis* (3,6,7), y *L. amazonensis* (8), principalmente en el Brasil, ya en los Estados Unidos, se describieron casos de Leishmaniasis cutánea en gatos domésticos ocasionada por *L. mexicana* (25).

No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la serología positiva para Leishmaniasis felina por la técnica de IFI y los factores de riesgos dependientes del animal (raza, edad y sexo), los dependientes del hábitat o medio ambiente (hábitat urbano o rural, tipo de construcción de la casa y patio, presencia de flebótomos y roedores), y finalmente factores dependientes del manejo del animal (protección del felino contra

flebótomos, permanencia del animal dentro o fuera de la casa, destino de la basura, grado de escolaridad del propietario).

Tabla 5. Evaluación de los factores de riesgo dependientes del manejo de los gatos

Variables	n	(%)	IC (95%)	Positivos (IFI)	p
El animal permanece en el patio de 18-22 PM.					
Si	162	(88,5)	(83,0-92,8)	2	0,60
No	21	(11,5)	(7,2-17)	0	
Permanencia del gato en la casa					
De vez en cuando	27	(14,8)	(10,0-20,7)	0	0,55
Todo el día	156	(85,2)	(79,3-90,0)	2	
Donde duerme la mascota					
Dentro de la casa	74	(40,4)	(33,3-47,9)	1	0,78
En el patio	109	(59,6)	(52,1-66,7)	1	
Protege al animal contra el flebótomo					
Si	8	(4,4)	(1,9-8,4)	0	0,76
No	175	(95,6)	(91,6-98,1)	2	
El gato tiene acceso a patios baldíos					
Si	133	(72,7)	(65,6-79)	1	0,46
No	50	(27,3)	(21,0-34,4)	1	
Destino de las heces del gato					
Basurero	34	(18,6)	(13,2-25,0)	1	
El gato entierra	146	(79,8)	(73,2-85,3)	1	0,72
Quema	1	(0,5)	(0,0-0,3)	0	
Tira en la calle	2	(1,1)	(0,1-3,9)	0	
Destino de la basura de la casa					
Camión recolector	109	(59,6)	(52,1-66,7)	2	
Fondo de la casa	12	(6,6)	(3,4-11,2)	0	
Terreno baldío	17	(9,2)	(5,5-14,5)	0	0,84
Entierra	5	(3,3)	(3,3)	(1,2-7,0)	0
Quema	39	(21,3)	(15,6-28,0)	0	
Grado de escolaridad del propietario					
Analfabeto	5	(2,7)	(0,9-6,3)	0	
Básica completa	31	(16,9)	(11,8-23,2)	0	
Básica incompleta	32	(17,5)	(12,3-23,8)	0	
Media completa	33	(18,0)	(12,8-24,4)	0	0,04*
Media incompleta	14	(7,7)	(4,2-12,5)	0	
Universitaria completa	61	(33,3)	(26,6-40,7)	1	
Universitaria incompleta	7	(3,8)	(1,6-7,7)	1	

n=número de animales, %=porcentaje, IC=intervalo de confianza, p=probabilidad, *=resultados estadísticamente significativos

Sin embargo, otros estudios demostraron que existe una asociación entre la serología positiva de anticuerpos anti-*Leishmania* y los signos clínicos de Leishmaniasis felina, así mismo como la presencia de anticuerpos para el virus de la Leucemia felina (FeLV), pero no con el virus de la Inmunodeficiencia felina (FIV), sugiriéndose de este modo un rol potencial de este retrovirus en la infección por *Leishmania* en felinos en las áreas endémicas (33,41).

Así mismo, algunos autores encontraron asociación estadísticamente significativa entre la seroprevalencia positiva de *Leishmania* en gatos y el sexo de los animales, encontrándose una mayor frecuencia de infección en gatos machos y altos niveles de anticuerpos en felinos mayores de 5 años. También se encontraron mayores tasas de prevalencia en gatos que viven en áreas rurales comparadas con las tasas de prevalencia observadas en gatos que provienen

de áreas urbanas (40), sin embargo en nuestro estudio encontramos que los 3 gatos con serología positiva provinieron del área urbana. Tampoco se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los gatos mestizos y los gatos puros de la raza Siamés, concordando nuestros resultados con los hallados por Cardoso y colaboradores (40), quienes tampoco observaron una asociación entre la prevalencia de la infección por *Leishmania* y la raza de los animales, así como también si los gatos vivían totalmente dentro de la casa como los que tuvieron acceso a las áreas externas de la casa.

Teniendo en cuenta que los 3 animales seropositivos para *Leishmania*, no presentaron síntomas clínicos asociados a la enfermedad, concordando estos hallazgos a los encontrados por Maia y colaboradores (10), se puede sugerir que los gatos pueden actuar como habituales reservorios para *L. infantum* en áreas endémicas de Leishmaniasis visceral.

A pesar de que los perros han sido universalmente reconocidos como los principales reservorios domésticos y peridomésticos; los felinos no son considerados un reservorio doméstico importante de la enfermedad y existen discordancia en la literatura de la susceptibilidad de los gatos a la infección por *Leishmania* y se cree que los gatos poseen un cierto grado de resistencia natural a la enfermedad, probablemente relacionada a factores genéticos (42).

Esta investigación nos permite concluir que los gatos, pueden actuar como un reservorio alternativo de *L. infantum*, más que un reservorio accidental del parásito y se deben realizar mayores estudios para determinar el papel epidemiológico (por métodos serológicos y parasitológicos), que puedan cumplir estos animales en la transmisión de esta zoonosis en el Paraguay.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Programa Nacional de Control de Zoonosis y Centro Antirrábico Nacional (PNCZyCAN) del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS) de Paraguay por la inmensa ayuda logística, a todos los veterinarios y propietarios de los felinos que colaboraron en la toma de muestras y respondieron a las preguntas de la encuesta y muy especialmente al Núcleo de Pesquisa en Zoonosis (NUPEZO) del Departamento de Higiene Veterinaria y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, de Botucatu-São Paulo, Brasil por el soporte técnico de los análisis laboratoriales realizados.

REFERENCIAS

1. Sergent ED, Sergent ET, Lombard J, Quilichini M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. Bull Soc Pathol Exot. 1919;5:93-8.
2. Da Silva SM, Rabelo PF, Gontijo ND, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat from Brazil. Vet Parasitol. 174;(1-2):150-4.
3. Figueiredo FB, Bonna IC, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TM, et al. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(2):141-5.

4. Da Silva AV, Souza Cândido CD, Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC. The First Record of American Visceral Leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2008;105(1):92-4.
5. Simões-Mattos L, Mattos MR, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CM, Prata-Júnior RC, et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2005;127(3-4): 199-208.
6. Schubach TM, Figueiredo FB, Pereira SA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(3):165-7.
7. Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degrave W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Vianna)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(1):19-20.
8. Souza AL, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;128(1-2):41-5.
9. Bonfante-Garrido R, Urdaneta I, Urdaneta R, Alvarado J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991; 85(1):53.
10. Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8(4):555-9.
11. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol.* 2010;174(3-4):336-40.
12. Grevot A, Jaussaud Hugues P, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Haas P, et al. Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite.* 2005;12(3):271-5.
13. Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelievre A, et al. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol.* 1998;75(2-3):273-7.
14. Ayllon T, Tesouro MA, Amusatogui I, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1149:361-4.
15. Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada I, et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecorregions around the northwestern mediterranean. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):676-80.

16. Hervas J, Chacon-M de Lara F, Sánchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, et al. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *J Feline Med Surg.* 1999;1:101-5.
17. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4):357-60.
18. Vita S, Santori D, Aguzzi I, Petrotta E, Luciani A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet Res Commun.* 2005; 29 Suppl 2:319-21.
19. Mancianti F. What's the epidemiological role of the cat?. *Parassitologia.* 2004; 46(1-2):203-6.
20. Pennisi MG, Venza M, Reale S, Vitale F, Lo Giudice S. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun.* 2004;28 Suppl 1:363-6.
21. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol.* 2002;106(3):181-91.
22. Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg.* 2009;11(8):728-30.
23. Rüfenacht S, Sager H, Müller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, et al. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Vet Rec.* 2005;156(17):542-5.
24. Nasereddin A, Salant H, Abdeen S. Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):364-9.
25. Trainor KE, Porter BF, Logan KS, Hoffman RJ, Snowden KF. Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Vet Pathol.* 2010;47(6):1076-81 .
26. Barnes JC, Stanley O, Craig TM. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;202(3):416-8.
27. Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q, Fallah E, Motazedian MH, Sadjjadi SM, et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10(3):313-6.
28. Sarkari B, Hatam GR, Adnani SJ, Asgari Q. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009;103(3):275-7.
29. Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Arechokchai D, Duang-ngern P, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007;38(1):8-12.
30. Morsy TA, Abou el Seoud SM. Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 1994;24(1):199-204.

31. Pennisi MG. Leishmaniosis felina. In: Miró-Corrales G. Leishmaniosis canina y felina. Madrid: Acalanthis; 2007. v.89, p.112-26.
32. Pennisi MG, Maxia L, Vitale F, Masucci M, Borruto G, Caracappa S. Studio dell'infezione da *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endêmica. Atti Soc Ital Sci Vet. 2000;54:215-6.
33. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological studies in cats. Vet Parasitol. 2007;145:267-73.
34. Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. Vet Ophthalmol. 2005;8(1):71-5.
35. Canese A, Garoso O, Ramírez J, Maidana M, Monti M, Santacruz R, et al. Focos de Leishmaniasis visceral canina en las ciudades de Lambaré y Villa Elisa. Rev Parag Microbiol. 1998;18(1):18-24.
36. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american tripanosmosiasis technical modification employing preserved culture form in a slide test. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1966;8(5):227-34.
37. Braga ARC. Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia de la Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para Leishmaniose □dissertação□. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2009.
38. Savani ESMM, Camargo MCGO, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MGD, D'Áuria SRN, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;120(3):229-33.
39. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez M. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. Vet Parasitol. 2007;145(3-4):267-73.
40. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Northern Portugal based on DAT and ELISA. Vet Parasitol. 2010;174(1-2):37-42.
41. Sherry K, Miró G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C, et al. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(3):239-45.
42. Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Sobrinho LSV, et al. Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. Braz J Vet Res Anim Sci. 2010;47(3):213-7.

Recebido em: 15/03/11

Aceito em: 15/03/11