MARIA LUANA ALVES

**Identificação e caracterização de
tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos
(*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose
visceral**

São Paulo

2021

MARIA LUANA ALVES

Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

De acordo:

Orientadora

São Paulo
2021

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4049
FMVZ

Alves, Maria Luana
Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos
(*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral / Maria Luana Alves. – 2021.
133 p. ; il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2021.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. *Crithidia fasciculata*. 2. *L. infantum*. 3. *Lu. longipalpis*. 4. Gatos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação e caracterização de Tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral", protocolada sob o CEUA nº 3737090317 (ID 004946), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Maria Luana Alves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/05/2018.

We certify that the proposal "Identification and characterization of Trypanosomatids that infect domestic cats (*Felis catus*) from an endemic area for visceral leishmaniasis", utilizing 100 Cats (males and females), protocol number CEUA 3737090317 (ID 004946), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Maria Luana Alves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **12/2019**

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 60 meses**

N: **100**

Linhagem: **Sem distinção de raça**

Peso: **2500 a 6000 g**

Local do experimento: Partes dos experimentos dar-se-ão em campo no momento das coleta de amostras biológicas (município de Ilha Solteira), após, o material biológico coletado seguirá para o laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), onde parte das amostras serão congeladas e outra parte utilizada para testes específicos do projeto como por exemplo ELISA, RIFI e hemocultura. As últimas etapas dos experimentos serão na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) localizada em Pirassununga.

São Paulo, 05 de fevereiro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Maria Luana

Título: Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Diva, que me proporcionaram a melhor educação e lutaram para que eu estivesse concluindo mais esta etapa.

Aos meus irmãos, Maria Fernanda e Arnaldo, que me encorajaram e me apoiaram, fazendo com que esta fosse uma das melhores fases da minha vida.

Ao meu sobrinho, Miguel, que tem o melhor abraço do mundo.

À minha namorada, Camila, pelo incentivo através de palavras que me ajudaram a acreditar em mim.

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu energia, coragem e discernimento para enfrentar todos os obstáculos.

Aos gatos que participaram deste estudo, tenho total gratidão por todos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ, USP) e a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), por ter me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionaram dias de aprendizagem que irei levar para o resto da vida.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo (FZEA, USP) e ao Departamento de Medicina Veterinária (ZMV), pelo apoio estrutural na realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado (Processo nº 2017/14855-9), pois sem ela não seria possível a realização do estudo.

Sou grata pela confiança depositada na minha proposta de projeto pela minha orientadora Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo, sem mencionar que durante estes quatro anos estava disposta a enfrentar os desafios comigo, sempre mantendo o ambiente acolhedor. Sem sua orientação, este caminho seria muito mais árduo. Tenho total admiração e respeito pela profissional e pessoa que você é.

À Professora Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, pela paciência, por acreditar em meu trabalho e por todo o aprendizado desde a época da graduação. Sou grata pela gentileza de oferecer o laboratório para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Diogo Tiago e Julio Spada, que me ajudaram nos momentos difíceis, que me mostraram que um pouco de diversão também é necessário e me colocaram para cima quando mais precisei. Sempre acreditaram em mim e sou quem sou porque vocês estiveram e estão, sempre ao meu lado.

Às estagiárias do Laboratório de Imunoparasitologia de Ilha Solteira (LIPAIS): Nathália Frigo, Carla Maciel, Denise e Vanessa Capelleti, pelo auxílio durante tantas

coletas e análises de amostras do estudo. Sentirei muita falta das nossas reuniões (com bastante comida, haha), presepadas e da convivência no laboratório.

À maravilhosa Julia Benassi, pelo auxílio nas análises e pelos conselhos dados. Muito obrigada por ter me acolhido tanto no laboratório, quanto em sua casa. Você é uma pessoa com o coração enorme e de agradável convivência.

Ao João Augusto, pela gentileza em me receber em sua casa e pela ajuda nas análises dos flebotomíneos. Vou sentir falta dos momentos turísticos que tínhamos durante as viagens de disciplinas.

À médica veterinária Danielle Passarelli, do Laboratório Clínico da Unidade Didático Clínico Hospitalar da FZEA, por ter realizado as análises bioquímicas e hematológicas nas amostras dos animais do estudo.

Ao Laboratório de pesquisas em leishmaniose, do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ- Rio de Janeiro, RJ; pela caracterização da cepa oriunda do trabalho.

Aos responsáveis pelos abrigos: Marcelo Cilim, Michele Perez e Daniele Perez, pela disponibilidade em ajudar no projeto e pela dedicação pelos animais. Sempre foram muito agradáveis conosco, e dispostos a fazerem de tudo para minimizarem o sofrimento dos animais abandonados.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA), Geovanna Vioti, Nuno Wolfgang, Alex Kazuo, Pedro Armando e Ana Flávia pela oportunidade do convívio e pela cooperação mútua durante estes anos. Sou muito grata a todos vocês.

Aos professores Dr. Rodrigo Martins Soares, Dra. Helena Lage Ferreira e Dra. Deise Carla Almeida Leite Dellova pela enorme ajuda no desenho do projeto no exame de qualificação.

À professora Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati, pelas valiosas contribuições dadas durante as análises das amostras de flebotomíneos.

Ao Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), por disponibilizar o laboratório, assim como os seus funcionários, em especial ao técnico Sidival, por emprestar equipamentos importantes para o projeto.

À professora Dra. Simone Baldini Lucheis, por ceder materiais que foram essenciais para o andamento do projeto.

Ao Hospital Veterinário da Fundação Educacional de Andradina (FEA), por ceder o espaço para análises hematológicas.

Aos alunos do curso de Medicina Veterinária, da FEA, pela ajuda durante a coleta de amostras biológicas dos animais do estudo, com muita eficiência e bom humor.

Aos docentes e funcionários da FZEA e FMVZ da USP, principalmente ao secretário Danival, que sempre esteve a disposição para sanar todas as dúvidas.

Meu eterno agradecimento aos meus amigos (Aline Marchetti, Patrick Ferreira, Philippe Toledo, Thays Couto e Ana Paula) que deram uma contribuição valiosa para a minha jornada acadêmica. Obrigada pelos conselhos, palavras de apoio, puxões de orelha e risadas.

Aos meus cunhados, Kátia e Roger, pela consideração e carinho.

Agradeço meus treinadores, Ana Galan e Hugo Henrique, que contribuíram com minha saúde física e mental, que me proporcionaram a chance de expandir os meus horizontes e me fazer enxergar o mundo por outra perspectiva.

“Um líquido é um estado da matéria sem formato específico. Ele muda facilmente e se molda ao recipiente que o contém. O corpo humano é 70% água.”

Vis a Vis

RESUMO

ALVES, M. L. **Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral.** 2021. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Um total de 100 gatos procedentes de dois abrigos de animais domésticos de Ilha Solteira, SP, participaram do estudo. Pelas técnicas sorológicas 74% e 34% dos gatos apresentaram anticorpos anti- *Leishmania* spp. pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), respectivamente. No parasitológico direto, dois animais (2%) apresentaram formas amastigotas no interior de macrófagos de linfonodo e medula óssea, enquanto na hemocultura, oito gatos (8%) apresentaram flagelados. Pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das amostras de sangue dos gatos do estudo, oito (8%) foram positivos por esta técnica e verificou-se a presença de sequências de DNA com 100% de identidade com *L. infantum* em cinco gatos, e sequências de DNA com ao menos 80% de identidade com *L. major* em dois animais. Dois dos quatro animais positivos pela cultura de aspirado de linfonodo e medula óssea apresentaram fragmentos de DNA de tripanossomatídeos, e quando sequenciados, revelaram a presença de DNA de *L. infantum* e *Crithidia fasciculata*. Um mesmo gato apresentou três espécies de tripanossomatídeos (*L. infantum*, *C. fasciculata* e *L. major*), detectadas pelo sequenciamento de amostras de DNA de sangue e DNA de cultura de aspirado de linfonodo, e caracterização de espécie pela Eletroforese Enzimática Multilocus (MLEE) de cepa obtida do isolado de aspirado de linfonodo, respectivamente. A maioria dos animais do estudo (74%) apresentou ao menos uma alteração clínica. Em relação aos parâmetros hematológicos, o grupo dos gatos positivos para *L. infantum* apresentou redução das plaquetas ($p=0,01076$ $p<0,05$), quando comparado ao grupo dos animais negativos, mostrando uma associação entre infecção por *L. infantum* e trombocitopenia. Sessenta animais (60%) foram positivos pela reação intradérmica de Montenegro (RIM), mas a maioria (80%) dos gatos positivos para *L. infantum* pelos testes moleculares e parasitológicos, não respondeu à RIM. Das sete espécies de flebotomíneos capturadas no estudo, *Lu. longipalpis* foi a mais frequente, sendo encontrado DNA de *L. infantum* em uma das fêmeas.

Palavras-chave: *Crithidia fasciculata*. *L. infantum*. *Lu. longipalpis*. Gatos.

ABSTRACT

ALVES, M. L. **Identification and characterization of the trypanosomatids infecting domestic cats (*Felis catus*) in endemic area for visceral leishmaniasis**. 2021. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A total of 100 cats from two domestic animal shelters in Ilha Solteira, SP, participated in the study. By serological techniques 74% and 34% of cats presented antibodies against *Leishmania* spp. by Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), respectively. In the parasitological test, two animals (2%) had amastigote forms inside lymph node and bone marrow macrophages, while in blood culture, eight cats (8%) had flagellates. By the Polymerase Chain Reaction (PCR) of the blood samples of the cats in the study, eight (8%) were positive by this technique and the presence of DNA sequences with 100% identity with *L. infantum* was verified in five cats, and DNA sequences with at least 80% identity with *L. major* in two animals. Two of the four animals positive for the lymph node and bone marrow aspirate culture presented DNA fragments of trypanosomatids, and when sequenced, they revealed the presence of *L. infantum* and *Crithidia fasciculata* DNA. The same cat presented three species of trypanosomatids (*L. infantum*, *C. fasciculata* and *L. major*), detected by sequencing blood DNA samples and culture DNA from lymph node aspirate, and species characterization by Multilocus Enzymatic Electrophoresis (MLEE) strain obtained from the lymph node aspirate isolate, respectively. Most of the animals in the study (74%) had at least one clinical alteration. Regarding hematological parameters, the group of cats positive for *L. infantum* showed a reduction in platelets ($p = 0.01076$ $p < 0.05$), when compared to the group of negative animals, showing an association between infection by *L. infantum* and thrombocytopenia. Sixty (60%) animals were Montenegro Skin Test (MST) positive, but the majority (80%) of cats positive for *L. infantum* by molecular and parasitological tests, did not respond to MST. Of the seven species of sandflies captured in the study, *Lu. longipalpis* was the most frequent, and DNA of *L. infantum* was found in one of the females.

Keywords: *Crithidia fasciculata*. *L. infantum*. *Lu. longipalpis*. Cats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotos aéreas indicando as áreas onde os dois abrigos de animais do estudo estavam localizados no município de Ilha Solteira. A: Abrigo A (retângulo vermelho) próximo à um fragmento de mata (seta vermelha), B: Abrigo B (retângulo vermelho) próximo à um fragmento de mata. Ilha Solteira, SP, 2021.....33
- Figura 2 – Pontos selecionados de armadilhas CDC para captura de flebotomíneos nos abrigos de animais. A: Ponto 1- Próximo à fossa; B: Ponto 2- Anexado à mangueira; C: Ponto 3- Próximo à baía dos filhotes de gatos; D: Ponto 4- Próximo à baía dos gatos. Ilha Solteira, SP, 2021.....34
- Figura 3 – Processo de triagem de flebotomíneos capturados em abrigo de animais domésticos. A: Espécime fêmea de flebotomíneo visualizada em lupa, B: Flebotomíneos capturados com armadilhas do tipo CDC. Ilha Solteira, SP, 2021.....35
- Figura 4 – Condições das baias onde os animais dos abrigos de animais que participam do estudo são mantidos. A) Abrigo situado na área rural e B) Abrigo situado na área urbana. Ilha Solteira, SP, 2021.....36
- Figura 5 – Produção de meio LIT em capela de fluxo laminar. A: Manipulação dos tubos com meio LIT em condições totalmente estéreis, B: Processo de filtração do meio LIT com auxílio de bomba a vácuo, Ilha Solteira, SP, 2021.....43
- Figura 6 – Inoculação por via intradérmica de antígeno de *L. infantum* em gatos procedentes de abrigos de animais. A: Inoculação do controle e antígeno na área dorsal da orelha do animal; B: Formação imediata de uma bolha contendo a substância injetada (hora zero). Ilha Solteira, SP, 2021.....50
- Figura 7 – Flebotomíneos capturados no estudo. A: Etapa do processo de clarificação dos flebotomíneos; B: Cabeça e C: Tórax e abdômen de Macho de *Lu. Longipalpis* capturado no estudo e montado em lâmina de microscopia de luz. Ilha Solteira, SP, 2021.....52
- Figura 8– Número de flebotomíneos capturados de acordo com o mês de captura e parâmetros climáticos, em um abrigo de animais domésticos. Ilha Solteira, SP, 2021.....54
- Figura 9 – Fotos de gatos de abrigos de animais com alterações clínicas. Lesões cutâneas em: A: Plano nasal, B: Pescoço, C: Atrás da orelha, D: Ponta de orelha, E: Pescoço, F: Atrás da orelha. Outras alterações: G: Caquexia; H: Lesão ocular; I: Áreas alopecias distribuídas em todo o corpo. Ilha Solteira, SP, 2021..... 56
- Figura 10 – Número (N) e porcentagem (%) de gatos de acordo com o score corporal no momento da coleta de amostras biológicas. Ilha Solteira, SP, 2021.....57
- Figura 11 – Foto da placa utilizada no diagnóstico sorológico ELISA. Ilha Solteira, SP, 2021.....58

Figura 12 – Lâmina de RIFI com antígeno de *L. infantum* de gato positivo para o teste (Gato 75), na diluição 1:40. Aumento de 400x. Barra= 50µm. Ilha Solteira, SP, 2021.....60

Figura 13 – Esfregaço de material coletado por PAAF de linfonodo de gato, corado em panótico rápido, mostrando formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de macrófago (seta vermelha). Aumento de 1.000x. Barra=50µm. Ilha Solteira, SP, 2021.....61

Figura 14 – Esfregaço de material coletado por PAAF de medula de gato, corado em panótico rápido, mostrando formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de dois macrófagos. Aumento de 1.000x. Barra=50µm. Ilha Solteira, SP, 2021.....61

Figura 15 –Fotos de lâminas de hemocultura com presença sugestiva de protozoários. A: Flagelado em cultura de porção leucocitária do gato 30; B: Flagelado em cultura de porção plasmática do gato 32; C e D: Flagelados (seta vermelha) em cultura de sedimento de hemácias do gato 75. Aumento de 1.000x. Ilha Solteira, SP, 2021.....62

Figura 16 – Fotos de lâminas de culturas de sedimento de hemácias com presença de protozoários ciliados circulando livremente. A: Inúmeros ciliados se movimentando rapidamente (Aumento de 400x), B: Três ciliados na mesma região (Aumento de 1000x); C e D: Esfregaço contendo ciliados corados em panótico rápido (Aumento de 1000x). Ilha Solteira, 2021.....63

Figura 17 – Esfregaço de Cultura de aspirado de linfonodo de gato em meio LIT, após 15 dias de inoculação corado em panótico rápido com presença de promastigotas. Aumento de 1.000x. Barra=50µm. Ilha Solteira, SP, 2021.....64

Figura 18 – Culturas in vitro coradas em lâmina pelo Giemsa com presença de promastigotas. A e B: Promastigotas encontradas em cultura de aspirado de medula óssea do gato 75, C e D: Promastigotas encontradas em cultura de aspirado de linfonodo do gato 13, com flagelo curto em relação aos achados do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021.....65

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LITSR/L5.8S, obtidos pela PCR de sangue de gatos, com fragmentos de 300-350pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021.....66

Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LITSR/L5.8S, obtidos pela PCR de suabe conjuntival de gatos, com fragmentos de 300-350pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostra do gato positivo. Ilha Solteira, SP, 2021.....67

Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LITSR/L5.8S, obtidos pela PCR de hemocultura e cultura de aspirados de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, AL13: Aspirado de linfonodo do gato 13, PL75: Porção plasmática do gato 75, SH75: Sedimento de hemácias do gato 75 e AM75: Aspirado de medula do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021.....67

Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-2 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de sangue de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021.....68

Figura 23 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-2 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de sangue de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostra do gato positivo. Ilha Solteira, SP, 2021.....69

Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-2 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de suabe conjuntival de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostra do gato positivo. Ilha Solteira, SP, 2021.....69

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de hemocultura e cultura de aspirados de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, AL13: Aspirado de linfonodo do gato 13, PL75: Porção plasmática do gato 75, SH75: Sedimento de hemácias do gato 75 e AM75: Aspirado de medula do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021.....70

Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os primers 13A/13B, obtidos pela PCR de sangue de gatos, com fragmentos de 120pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021.....71

Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os primers 13A/13B, obtidos pela PCR de suabe de gatos, com fragmentos de 120pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021.....71

Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os primers 13A/13B, obtidos pela PCR de hemocultura e cultura de aspirados de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, AL13: Aspirado de

linfonodo do gato 13, PL75: Porção plasmática do gato 75, SH75: Sedimento de hemácias do gato 75 e AM75: Aspirado de medula do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021.....72

Figura 29 – Ilustração do possível funcionamento da resposta imune dos gatos do estudo ao antígeno de *L. infantum* inoculado pela técnica de RIM. Ilha Solteira, SP, 2021.....85

Figura 30 – Reação intradérmica de Montenegro com antígeno de *L. infantum* em gatos procedentes de abrigos de animais. A: Gato negativo para o teste, sem a formação de nódulo; B, C e D: Gatos positivos para o teste, com formação de nódulo no local de inoculação do antígeno (Seta vermelha). Ilha Solteira, SP, 2021.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número (N) e porcentagem (%) de gatos de acordo com o sexo, tipo de pelagem e localização em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2021.....	36
Tabela 2 – Número e identificação de espécies de flebótomos capturados em um abrigo de animais domésticos, no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2020. Ilha Solteira, 2021.....	53
Tabela 3 – Número (N) e porcentagem (%) de alterações clínicas encontradas em gatos procedentes de abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2021.....	55
Tabela 4 – Níveis ELISA (NE), intervalos de densidade óptica (D.O.) e número de animais (Dos gatos 01 a 50) durante levantamento sorológico de gatos procedentes de abrigos de animais. Ilha Solteira, 2021.....	59
Tabela 5 – Níveis ELISA (NE), intervalos de densidade óptica (D.O.) e número de animais (Dos gatos 51 a 100) durante levantamento sorológico de gatos procedentes de abrigos de animais. Ilha Solteira, 2021.....	59
..	
Tabela 6 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-1 de amostras de sangue de gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021.....	74
Tabela 7 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-2 de amostras de sangue de gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021.....	75
Tabela 8 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-1 de amostras de culturas positivas de gatos. Ilha Solteira, SP, 2021.....	76
.	
Tabela 9 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-2 de amostras de culturas positivas de gatos. Ilha Solteira, SP, 2021.....	77
Tabela 10 – Classificação de acordo com o índice Kappa da concordância entre técnicas diagnósticas empregadas em estudo de LV em gatos de abrigo de animais domésticos. Ilha Solteira, SP, 2021.....	79
Tabela 11 – Diagnóstico de cinco gatos positivos para para <i>L. infantum</i> pela PCR de uma área endêmica de leishmaniose visceral por diagnóstico sorológico e parasitológico. Ilha Solteira, SP, 2021.....	82
Tabela 12 – Comparação entre parâmetros hematológicos e bioquímicos de gatos infectados por <i>L. infantum</i> (positivos) e não infectados (negativos). Ilha Solteira, SP, 2021.....	84

Tabela 13 – Frequência de animais de acordo com os perfis de resposta imune da infecção por <i>L. infantum</i> em gatos de uma área endêmica de leishmaniose visceral, Ilha Solteira, SP, 2021.....	88
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina Transferase

AST: Aspartato Aminotransferase

CAC: Gene Cacophony

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CYT B: Gene Citocromo B

D.O: Densidade Óptica

ELISA: Ensaio Imunoenzimático Indireto

FA: Fosfatase Alcalina

FeLV: Vírus da Leucemia Felina

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina

GGT: Gamma Glutamyltransferase

G6PDH: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

GP63: Glicoproteína 63

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

ITS-1: Internal Transcribed Spacer 1

ITS-2: Internal Transcribed Spacer 2

kDNA: DNA do Kinetoplasto

LF: Leishmaniose Felina

LIT: Liver Infusion Tryptose

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

MLEE: Eletroforese Enzimática Multilocus

NE: Nível do ELISA

PAAF: Punção Aspirativa por Agulha Fina

PB: Pares de Base

PBS: Tampão Salino Fosfato

PBS-T: Tampão Salino Fosfato em Tween

PC: Ponto de Corte

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA: DNA ribossomal

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

RIM: Reação Intradérmica de Montenegro

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

TCBS: Tampão Carbonato-Bicarbonato de Sódio

TCBS-T: Tampão Carbonato-Bicarbonato de Sódio com Tween

TMB: Tetrametilbenzindina Dihidroclorada

VCM: Volume Corpuscular Médio

VG: Volume Globular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO...	23
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVO	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	ÁREA DE ESTUDO	33
4.2	FLEBOTOMÍNEOS.....	34
4.2.1	Captura de flebotomíneos	34
4.2.2	Identificação de flebotomíneos	35
4.3	ANIMAIS.....	35
4.3.1	Caracterização dos animais dos abrigos.....	35
4.3.2	Coleta de materiais biológicos e aspectos éticos.....	37
4.4	AVALIAÇÃO CLÍNICA	38
4.4.1	Avaliação clínica e identificação dos animais	38
4.4.2	Hemograma	38
4.4.3	Diagnóstico diferencial de sangue.....	38
4.4.4	Perfil bioquímico.....	39
4.4.5	Detecção de FIV e FeLV	39
4.5	DIAGNÓSTICO PARA TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	39
4.5.1	Exames sorológicos.....	39
4.5.1.1	Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA).....	39
4.5.1.2	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	41
4.5.2	Exame parasitológico direto: Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)	42
4.5.3	Exames de cultura celular	42

4.5.3.1	Hemocultura	42
4.5.3.2	Cultura de aspirado de linfonodo/medula óssea.....	44
4.5.3.3	Isolamento de cultura e caracterização taxonômica de espécies	44
4.5.4	Exames moleculares	45
4.5.4.1	Extração de DNA.....	45
4.5.4.2	Controles negativos e positivos	45
4.5.4.3	PCR dos genes do Internal transcribed spacer 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) - Para detecção de tripanossomatídeos.....	45
4.5.4.4	PCR para <i>Leishmania</i> spp. (13A/13B).....	46
4.5.4.5	PCR do gene endógeno nos flebotomíneos	47
4.5.4.6	PCR para Estudo da fonte Alimentar dos Flebotomíneos	47
4.5.4.7	Sequenciamento genético	48
4.5.5	Teste intradérmico	48
4.5.5.1	Reação intradérmica de Montenegro.....	48
4.5.5.1.1	<i>Produção de antígeno</i>	48
4.5.5.1.2	<i>Aplicação do antígeno</i>	49
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS	52
5.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS.....	52
5.2	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS.....	54
5.3	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DOS ANIMAIS.....	58
5.3.1	ELISA	58
5.3.2	RIFI	60
5.4	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....	60
5.5	EXAMES DE CULTURA CELULAR	62
5.5.1	Hemocultura	62

5.5.2	Cultura de aspirado de linfonodo/medula óssea	63
5.5.3	Isolamento de cultura e caracterização taxonômica de espécies	65
5.6	PCR DAS AMOSTRAS DOS GATOS	66
5.6.1	PCR das regiões ITS-1 e ITS-2.....	66
5.6.2	PCR do kDNA de <i>Leishmania</i> spp. (13A/13B)	70
5.7	PCR DAS AMOSTRAS DE FLEBOTOMÍNEOS	72
5.7.1	PCR de gene endógeno (gene cacophony-IVS6)	72
5.7.2	Deteção de DNA de tripanossomatídeos em flebotomíneos	72
5.7.3	PCR para estudo da fonte alimentar dos flebotomíneos	73
5.8	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DAS AMOSTRAS DOS GATOS	73
5.9	SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE FLEBOTOMÍNEOS.....	78
5.10	COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE LF	78
5.11	COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENTRE GATOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LV	81
5.12	REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO	85
5.13	RIM E OUTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.....	87
5.14	EXPRESSÃO IMUNE DOS ANIMAIS DO ESTUDO PARA <i>L. INFANTUM</i> ..	87
6	DISCUSSÃO	89
6.1	CAPTURE E PCR DE FLEBOTOMÍNEOS	89
6.2	ALTERAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO.....	95
6.3	REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO	105
7	CONCLUSÕES	108
8	REFERÊNCIAS	109
9	APÊNDICES	128

1 INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos apresentam uma ampla distribuição geográfica e de acordo com a taxonomia tradicional (baseada em morfologia, tipo de hospedeiro de origem e ciclo de vida), essa família inclui nove gêneros. Os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Rhyncoidomas* são parasitos monoxênicos de insetos, e os outros quatro gêneros são parasitos heteroxênicos, sendo o gênero *Phytomonas* parasito de insetos e plantas, e os gêneros *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma*, parasitos de invertebrados e vertebrados (MCGHEE; COSGROVE, 1980; CAMARGO, 1998; BORGHESAN, 2013).

A classificação a nível de gênero de tripanossomatídeos monoxênicos ainda é realizada, na maioria das vezes, baseada em características taxonômicas tradicionais, e o fato de possuírem baixa especificidade ao hospedeiro e grande diversidade morfológica, dificulta a diferenciação (WALLACE, 1966; PODLIPAEV, 2001). Apesar de somente os tripanossomatídeos heteroxênicos serem normalmente encontrados em humanos, desde 1995, vêm sendo relatado em literatura a ocorrência de tripanossomatídeos monoxênicos infectando inúmeros pacientes HIV-positivos (CHICHARRO; ALVAR, 2003).

Outro fator que dificulta a identificação de tripanossomatídeos é a existência de infecções mistas nos insetos e nas culturas obtidas. As formas isoladas em cultura podem não ser as mesmas formas observadas diretamente nos hospedeiros, ou seja, podem ser inclusive de espécies diferentes de tripanossomatídeos. Além do mais, um hospedeiro pode estar infectado com inúmeras espécies de tripanossomatídeos (WALLACE, 1966; WALLACE et al., 1983; PODLIPAEV, 1985, 2001).

É fato que os tripanossomatídeos possuem características compartilhadas, e até mesmo já foi demonstrada a existência de imunorreatividade cruzada entre tripanossomatídeos de interesse médico, por exemplo, entre os gêneros *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. (CAMARGO; REBONATO, 1969; VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; LUCIANO et al., 2009).

Em regiões onde coexistem gêneros de *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. circulando nas populações de animais e humanos, o diagnóstico é atribulado, principalmente em inquéritos sorológicos. Não há certeza de que o animal está infectado com uma espécie ou mais de tripanossomatídeos, ou se tiver apenas uma espécie o infectando, apresentar reação cruzada (LUCIANO et al., 2009; ALVES et

al., 2012). Savani et al. (2004), utilizando a técnica de PCR, descreveram uma co-infecção natural por *Leishmania* e *Trypanosoma* em um cão no sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul. Coelho et al. (2013) também relataram um cão que era positivo para *Leishmania* e que apresentava formas flageladas de *Trypanosoma evansi* em esfregaço sanguíneo.

Da mesma forma, tripanossomatídeos de plantas e insetos compartilham um maquinário celular semelhante aos tripanossomatídeos patogênicos, demonstrado em vários estudos. Souza et al. (1974) induziram uma resposta imune celular por *Leptomonas pessoai* contra *Trypanosoma cruzi* em camundongos, assim como Breganó et al. (2003) demonstraram que soros de pacientes com doença de Chagas apresentaram forte reatividade com antígenos de *Phytomonas serpens* em ensaios sorológicos, confirmando a reatividade cruzada e compartilhamento de antígenos, entre o *T. cruzi* e o tripanossomatídeo que infecta tomate.

No estudo de análise de um gene da *Crithidia fasciculata*, parasita de insetos, realizada por Inverso et al. (1993) verificou-se a presença de protease homóloga ao gene GP63 de *Leishmania* spp. sugerindo que esta molécula poderia desempenhar um papel na sobrevivência do parasita no intestino do inseto. O fato das espécies de tripanossomatídeos não-patogênicas compartilharem moléculas homólogas às patogênicas, tais como as leishmanias, reforça a importância do cuidado na detecção do parasita no hospedeiro, a fim de se evitar reações cruzadas e identificar co-infecções.

As leishmanioses são doenças de alta prevalência em regiões tropicais e subtropicais, pois são áreas favoráveis ao desenvolvimento dos seus vetores (BRASIL, 2014). Estas doenças afetam pessoas que vivem em regiões pobres do planeta e está fortemente associada à desnutrição, moradias precárias e falta de recursos financeiros (WHO, 2021a).

Estima-se que mais de um bilhão de humanos vivem em áreas de risco de infecção, assim como 92 e 83 países possuem relatos de casos ou foram incriminados endêmicos para a leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), respectivamente (WHO, 2020). Anualmente ocorrem cerca de 30.000 casos de LV e mais de 1 milhão de casos de LT (WHO, 2020). Nas Américas, uma média de 55.000 casos de LT e 3.500 casos de LV são registrados a cada ano, com uma taxa média de letalidade de 7% (PAHO, 2021).

Essas enfermidades são responsáveis por 50.000 mortes por ano, sendo classificadas em nono lugar do ranking das doenças infecciosas. O Brasil, junto com Índia, Nepal, Bangladesh e Sudão detêm 90% dos casos de leishmanioses, tanto da forma cutânea, quanto da visceral (BRASIL, 2006; ALVAR et al., 2012; WHO, 2015; CARDIM et al., 2016).

Seus agentes etiológicos pertencem à ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, que causam a doença em sua forma tegumentar e visceral, que por sua vez, apresentam um caráter multifacetado (ROSS, 1903; MURRAY et al., 2005). As leishmanioses apresentam, em humanos, dois padrões clínicos, que irão diferenciar de acordo com a espécie de *Leishmania* e sua relação com o hospedeiro (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GRAMICCIA; GRADONI et al., 2005).

Essas zoonoses acometem o ser humano e outras espécies de mamíferos silvestres (SOBRINO et al., 2008; TENÓRIO et al., 2011) e domésticos (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; ALVES, 2016). Entre os hospedeiros das leishmanioses no Brasil, já foram relatados cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (TENÓRIO et al., 2011), felídeos (ALVES-MARTIN et al., 2017), marsupiais (CORREDOR et al., 1989), roedores (TONELLI et al., 2017) e equinos (BENASSI et al., 2018).

Os vetores das leishmanioses são os flebotomíneos, que são insetos pertencentes à ordem Díptera; família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, e são conhecidos popularmente como mosquitos palha ou Birigui (LUTZ; NEIVA, 1912; GALATI, 2018). Dois gêneros são incriminados como vetores de *Leishmania* spp., sendo eles, o *Phlebotomus* spp., no Velho Mundo e *Lutzomyia* spp., no Novo Mundo (MAROLI et al., 2013).

Aproximadamente 1.000 espécies de flebotomíneos foram descritas mundialmente, sendo 530 delas ocorrendo no continente Americano e destes, 265 encontradas no Brasil (SHIMABUKURO; ANDRADE; GALATI, 2017; GALATI, 2018). Em relação ao estado de São Paulo, 69 espécies de flebotomíneos estão descritas, incluindo vetores de LT e LV (SHIMABUKURO; GALATI, 2011).

Os flebotomíneos medem de 1,5 a 3 mm, possuem olhos grandes, corpo coberto de pelos e coloração palha. São encontrados em locais úmidos com temperaturas altas e na presença de matéria orgânica. Os insetos são mais ativos ao amanhecer e entardecer. Apenas as fêmeas são hematófagas, e possuem longevidade de 20 dias, aproximadamente (SHARMA & SINGH, 2008; BRASIL, 2014).

A LT apresenta uma ampla distribuição mundial, e dos dez países do mundo com maior número de casos de LT, quatro estão nas Américas: Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (PAHO, 2021). No Brasil, formas de leishmanias em úlceras cutâneas já eram documentadas em 1909, em trabalhadores de áreas de desmatamentos. Desde então, a transmissão da LT vem sendo relatada em muitos municípios, apresentando inclusive, mudanças no padrão de transmissão, atingindo não só animais silvestres, mas também pessoas em contato com áreas florestais e moradores rurais. A partir da década de 80, observa-se aumento de número de casos de LT, e somente entre os anos de 1995 a 2014, foi constatada uma média anual de 25.763 casos novos registrados (BRASIL, 2017).

A LT é fortemente caracterizada pela presença de lesões nodulares ulcerativas, apresentando ou não, graves lesões destrutivas e desconfigurantes que podem afetar o campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Entre os anos de 2007 e 2017, 235.489 casos humanos de LT foram registrados no Brasil (BRASIL, 2019), e somente no ano de 2019, 15.484 casos foram notificados (WHO, 2021b).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 12 espécies causadoras de LT humana e oito espécies descritas somente em animais (BRASIL, 2017). No Brasil, já foram identificadas oito espécies que causam a LT, entre elas: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania shawi*, *Leishmania linderberg* (GONTIJO; CARVALHO, 2003) e, mais recentemente, a espécie *Leishmania major* infectando equinos na região sul do País (ESCOBAR et al., 2019). Já as espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da doença no Brasil são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomia whitmani*, *Nyssomia umbratilis*, *Nyssomia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (BRASIL, 2017).

Os testes de hipersensibilidade cutânea são utilizados para o diagnóstico de diversas doenças, como tuberculose (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 1993) e leishmaniose. A reação intradérmica de Montenegro (RIM) é considerada o exame complementar mais importante no diagnóstico da LT humana, sendo utilizado desde a década de 1920 (MONTENEGRO, 1926).

A RIM é baseada na hipersensibilidade do tipo tardio, que é caracterizada por reações inflamatórias iniciadas pelos linfócitos, respondendo especificamente aos alérgenos pela liberação de linfócitos e pelo desenvolvimento de citotoxicidade específica, sem a participação de anticorpos livres (GODFREY; GELL, 1978).

Localmente, manifesta-se por infiltração de células linfocíticas e mononucleares no local onde o antígeno é injetado (WECK, 1998).

A RIM pode ser uma ferramenta útil para avaliar a prevalência de infecção inaparente por *Leishmania*, quantificar a taxa de transmissão ao longo do tempo (SOUZA; SABROZA; SANTOS, 1992) e acompanhar programas de vacinação (MAYRINK et al., 1979).

A LV é considerada a forma mais severa das leishmanioses, e que pode acarretar óbito se não for tratada adequadamente. Devido à sua alta incidência e letalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos e crianças desnutridas, esta é uma das doenças mais importantes atualmente (BRASIL, 2014). Possui dois ciclos de transmissão: antroponótico (os humanos são os únicos e mais importantes reservatórios do parasita), ocorrendo na Índia e África; e o ciclo zoonótico (Inclui outros mamíferos no ciclo da doença), ocorrendo no Mediterrâneo, Américas e Ásia (WERNECK, 2014).

De todos os casos descritos na América Latina, 90% ocorrem no Brasil, principalmente na região nordeste (BRASIL, 2014). No estado de São Paulo, a LV é descrita desde 1999 nos municípios de Birigui e Araçatuba e nos anos seguintes, a doença foi se expandindo por outras cidades paulistas, particularmente em cidades cortadas pela rodovia Marechal Rondon e suas vias subjacentes (CARDIM et al., 2016). Além disso, entre os anos de 2016 e 2018, houve 333 casos humanos notificados de LV e 26 óbitos, somente no estado de São Paulo (CVE, 2018).

No Brasil, essa enfermidade tem como agente etiológico a *L. infantum* (*syn. L. chagasi*). A transmissão do parasita se dá principalmente pela picada da fêmea de flebotomíneo das espécies *Lu. longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912), e *Lu. cruzi*, esta última incriminada como vetora da LV nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (GALATI et al., 1997). Em estudos recentes, a espécie *M. migonei* foi incriminada como possível vetora da LV na América Latina (GUIMARÃES et al., 2016) e *Pintomyia fischeri* como vetora potencial da *L. infantum* na grande São Paulo, pois existem casos de leishmaniose visceral canina (LVC) na região, mas a presença da espécie *L. longipalpis* não foi confirmada (GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Ao realizar um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere formas amastigotas de *Leishmania* presentes no interior dos macrófagos. No intestino médio do inseto sofrem divisão binária e modificam-se em promastigotas, migrando para o intestino anterior. Na parede do intestino anterior,

sofrem multiplicação e diferenciação, transformando-se em promastigotas metacíclicas infectantes que posteriormente serão inseridas no próximo hospedeiro. Essas formas promastigotas inoculadas serão fagocitadas e transformadas em amastigotas, que irão se multiplicar nas células fagocíticas do hospedeiro (MARZOCHI, 1992; KILLICK-KENDRICK, 2002).

O cão é considerado o principal reservatório urbano da *L. infantum*, devido à alta taxa de registros da doença e pelo elevado grau de parasitismo encontrado na pele desses canídeos, se comparado com humanos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No município de Ilha Solteira, Paulan et al. (2012) verificaram prevalência de 10% a 14,5% de LVC em bairros da área urbana, enquanto que na área rural a prevalência foi de 31,3% de casos caninos (SPADA et al., 2014).

A infecção de felinos domésticos por *L. infantum* geralmente não apresenta sinais clínicos, e quando presentes, geralmente são alterações cutâneas (VIDES et al., 2011), e além disso, seu papel como fonte de infecção para vetores de *Leishmania* spp. também já foi demonstrado por Maroli et al. (2007), Silva et al. (2010), Mendonça et al. (2020) e Vioti (2020). No entanto, a importância epidemiológica dos gatos na manutenção da doença ainda é controversa, já que alguns autores os consideram hospedeiros acidentais e outros, os consideram como hospedeiros reservatórios secundários ou alternativos (MAROLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2011).

O primeiro relato de infecção por *Leishmania* spp. em gato doméstico foi em 1912, na Argélia, no qual o felino convivia com uma criança e um cão acometidos por LV. O diagnóstico só ocorreu após o falecimento do gato, por meio de identificação de formas amastigotas do parasito na medula óssea do animal (SERGENT; LOMBARD; QUILICHINI, 1912). E desde então, já foram identificadas sete espécies em gatos no novo e velho mundo, entre elas, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. venezuelensis* (PENNISI et al., 2015b), *L. major* e *L. tropica* (PAÇA et al., 2015).

As alterações dérmicas e aumento de linfonodos são os sinais mais relatados na leishmaniose felina (LF), independente da espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (PENNISI et al., 2015b; SILVEIRA NETO et al., 2015). Os outros sintomas relatados de LF são: anorexia, emaciação, desidratação, lesões cutâneas, lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras, dermatite seborréica,

alopecia difusa e uveíte, assim como hipertermia e desidratação (MANCIANTI, 2004; PENNISI et al., 2004; SILVA, 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

No entanto, os felinos infectados por *L. infantum* podem apresentar sinais clínicos brandos ou até mesmo não apresentar sinais clínicos durante toda a vida (PENNISI et al., 2015b). Além disso, em regiões endêmicas para LV, e prevalência de infecção felina por *L. infantum* utilizando métodos sorológicos e moleculares são menores quando comparados com cães (CARDOSO et al., 2010; PENNISI et al., 2012).

Alguns autores acreditam que gatos são subdiagnosticados devido à grande variedade de sinais clínicos e pelo fato de se tratar de achados clínicos inespecíficos que podem ser confundidos com outras doenças, tais como a leucemia felina (FeLV), imunodeficiência felina (FIV), histoplasmose e esporotricose (SOUZA et al., 2005; PENNISI et al., 2015b).

Acredita-se que os gatos possuem resistência à doença, provavelmente relacionada a fatores genéticos (MANCIANTI, 2004). Em recente estudo, Silva (2019) ao analisar as respostas imunes de gatos domésticos de região endêmica para LV, verificou que animais infectados por *L. infantum* e doentes apresentaram aumento de linfócitos T CD4⁺ e ausência de expressão ativa de linfócitos T CD8⁺, assim como o aumento de Imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) em relação aos gatos não infectados. Demonstrando que a imunidade celular deve ser determinante na resistência à doença também nessa espécie.

Pelo fato de não existirem técnicas de diagnóstico oficiais para a LF, as técnicas de diagnóstico de LV que estão disponíveis para cães também são empregadas em gatos, sendo eles, métodos sorológicos, citológicos, histológicos, de cultura e moleculares (PENNISI et al., 2015b). Entre os métodos sorológicos, a RIFI e o ELISA são os mais empregados em estudos epidemiológicos (PERSICHETTI et al., 2017). No entanto reações cruzadas com outras espécies família Trypanosomatidae podem ocorrer (PENNISI et al., 2015a).

Empregando o diagnóstico citológico, mais precisamente por meio de exame parasitológico direto de punção de aspirado de linfonodo poplíteo de gato infectado, formas amastigotas foram visualizadas em microscópio (COELHO et al., 2010; SILVA, 2019). Utilizando-se técnica histológica, Navarro et al. (2010) descreveram alterações microscópicas, entre elas uma inflamação granulomatosa difusa com macrófagos em

biópsias de tecido de gatos com LF. Esses achados enfatizam o valor de técnicas histopatológicas e imuno-histoquímicas no diagnóstico da LF.

Em relação às técnicas moleculares, já foi detectado DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue e suabes conjuntivais de gatos em alguns estudos (OLIVEIRA et al., 2015; PENNISI et al., 2015b; ALVES-MARTIN et al., 2017; BENASSI et al., 2017; SILVA, 2019).

Embora a RIM seja indicada para auxiliar no diagnóstico de LT, alguns estudos comprovam sua eficácia na identificação de humanos e cães com LV (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; CRESCENTE et al., 2009). Em estudos de LV humana, a RIM é uma ferramenta útil para o diagnóstico clínico, onde o teste é negativo durante a fase aguda, mas torna-se positivo após a resolução dos sintomas clínicos (PEARSON; SOUSA, 1996).

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes humanos com LV aguda não tratada, quando estimuladas com extrato de *L. infantum*, apresentam resposta proliferativa inferior às obtidas em indivíduos de grupo controle ou curados de LV (CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON, 1981); assim, a LV está associada à imunidade mediada por células prejudicada (BRYCESON, 1970; ALEXANDER; PHILLIPS, 1980)

O conhecimento sobre os tripanossomatídeos que infectam gatos ainda é muito pequeno. Consequentemente, a participação dessa espécie nas cadeias epidemiológicas dos diferentes tripanossomatídeos existentes em nosso país também não é conhecida. A descrição e caracterização desses agentes infectantes que podem ser albergados por gatos se fazem necessárias para uma maior compreensão das doenças que podem causar nessa espécie e a importância dessa infecção em gatos para a Saúde Pública.

2 JUSTIFICATIVA

A infecção concomitante de diferentes espécies de tripanossomatídeos em humanos e a semelhança entre os gêneros da família Tripanossomatidae dificulta o diagnóstico preciso das doenças causadas por estes parasitos. Em áreas em que há a presença de infecções por diferentes espécies de tripanossomatídeos, por exemplo, não há como determinar se o reservatório está infectado com uma espécie ou mais, de protozoário, fato já registrado em cães. Além disso, a proximidade filogenética entre gêneros patogênicos e não-patogênicos da família dos tripanossomatídeos permite imunorreatividade cruzada entre estes grupos.

Assim como o cão doméstico, os gatos são reservatórios de tripanossomatídeos, porém nem sempre apresentam alterações clínicas e, quando apresentam, são inespecíficos, de modo que exames sorológicos de rotina não conseguem detectar ou apresentam reações cruzadas entre espécies da família dos tripanossomatídeos. Desta forma, seria essencial investir em diagnóstico mais preciso, por meio de aprimoramento e combinação de técnicas de detecção dos parasitos no hospedeiro felino.

A LV, por exemplo, é uma doença considerada problema de saúde pública no Brasil, apresentando alta prevalência e afinidade com inúmeros hospedeiros da *L. infantum*, incluindo o gato. Apenas recentemente, a literatura vem desvendando os mecanismos de defesa imunológica do gato doméstico infectado por *L. infantum* onde foi demonstrado que a imunidade celular pode ser determinante na resistência à doença nesta espécie de mamífero. Diante desta possibilidade, a utilização de um método diagnóstico que avalia a resposta celular, como a RIM, seria fundamental para compreender a LV em gatos.

Pela escassez de trabalhos sobre tripanossomatídeos e o papel dos gatos para sua manutenção, a presente pesquisa busca identificar e caracterizar os principais protozoários tripanossomatídeos que parasitam naturalmente gatos de área endêmica para LV.

3 OBJETIVO

Identificar e caracterizar os principais protozoários da família Trypanossomatidae que parasitam naturalmente gatos domésticos oriundos de área endêmica para LV.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização clínica e laboratorial de gatos pertencentes a abrigos de animais domésticos para identificação de animais infectados por tripanossomatídeos;
- Detectar a resposta humoral e celular para *L. infantum* por meio de técnicas sorológicas (ELISA e RIFI) e a RIM;
- Realizar exames parasitológicos para detecção de possíveis tripanossomatídeos;
- Realizar a detecção de DNA de tripanossomatídeos em amostras de sangue, suabe conjuntival, culturas utilizando a técnica de PCR;
- Realizar o sequenciamento genético das amostras positivas pela PCR para identificação da espécie;
- Realizar a captura e identificação de espécies de flebotomíneos no local de confinamento dos animais;
- Detectar em flebotomíneos a presença de DNA de *L. infantum* e DNA de gato doméstico para estudo de hábito alimentar do inseto;
- Comparar as técnicas diagnósticas empregadas no estudo e correlacionar os aspectos clínicos com a positividade para determinar o papel do gato na manutenção destes tripanossomatídeos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Ilha Solteira situado na Mesorregião de Araçatuba, localizando-se a uma latitude 20°38'44" Sul e a uma longitude 51°06'35" Oeste, em uma altitude de 335 metros a nível do mar. Esse município é considerado como uma área endêmica para LVC (PAULAN et al., 2012). Os animais do estudo pertenciam a dois abrigos de animais domésticos localizados no município de Ilha Solteira- SP. Os gatos eram contactantes com cães, mantidos em baias com chão cimentado e totalmente cercadas, e separados por idade e sexo.

O abrigo A é localizado na área rural denominada “Cinturão verde”, onde existe uma forte produção agropecuária, além de estar próxima de fragmentos de mata. A população felina neste abrigo era de aproximadamente 25 animais, mantida em uma única baia, separada das baias dos cães. Já o abrigo B é localizado na área urbana do município, próximo de residências e fragmentos de mata. A população felina neste abrigo era de 300 animais, distribuídos em três baias grandes (Figura 01).

Figura 1 – Fotos aéreas indicando as áreas onde os dois abrigos de animais do estudo estavam localizados no município de Ilha Solteira. A: Abrigo A (retângulo vermelho) próximo à um fragmento de mata (seta vermelha), B: Abrigo B (retângulo vermelho) próximo à um fragmento de mata. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: GOOGLE EARTH MAPAS® (2016)

O número de gatos que se encontrava no interior dos abrigos variava de acordo com a quantidade de resgates, mortes naturais e adoções. A maioria dos felinos era oriunda do próprio município, sendo em grande parte, animais abandonados pelos donos e vítimas de maus tratos. Os abrigos recebiam uma pequena verba mensal da prefeitura para custeio de medicamentos, produtos de limpeza, pagamento de

funcionárias da limpeza e ração. Os responsáveis pelos abrigos eram ilhenses voluntários que se comprometiam a cuidar dos animais, realizar feiras de adoção trimestralmente e arrecadar fundos para complementar o orçamento dos abrigos.

4.2 FLEBOTOMÍNEOS

4.2.1 Captura de flebotomíneos

Entre janeiro de 2018 e janeiro de 2020 foram realizadas capturas de flebotomíneos em ambos os abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, por meio de armadilhas luminosas do tipo Center for Disease Control and Prevention (CDC), em dois pontos distintos, em cada abrigo, das 17 às 07 horas, durante cinco dias consecutivos de cada mês (Figura 02).

Além disso, foi verificada a sazonalidade onde foram observadas mensalmente: a quantidade de insetos capturados, a temperatura média mensal e pluviosidade entre os meses de janeiro de 2018 e janeiro de 2020.

Figura 2 – Pontos selecionados de armadilhas CDC para captura de flebotomíneos nos abrigos de animais. A: Ponto1- Próximo à fossa; B: Ponto 2- Anexado à mangueira; C: Ponto 3- Próximo à baia dos filhotes de gatos; D: Ponto 4- Próximo à baia dos gatos. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

4.2.2 Identificação de flebotomíneos

Após as capturas, os insetos foram levados para o laboratório e eutanasiados por congelamento a -20°C . Foi realizada a triagem dos espécimes, onde os flebotomíneos encontrados foram separados de acordo com o sexo, data e ponto de captura (Figura 03) e acondicionados em microtubos com álcool 70%.

Figura 3 – Processo de triagem de flebotomíneos capturados em abrigo de animais domésticos. A: Espécime fêmea de flebotomíneo visualizada em lupa, B: Flebotomíneos capturados com armadilhas do tipo CDC. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Os machos e as fêmeas (cabeça e terminália) foram submetidos a bateria de clarificação, montados em lâminas de vidro (FORATTINI, 1973) e identificados utilizando a chave de identificação taxonômica proposta por Galati (2018). O tórax e o abdômen das fêmeas foram preservados individualmente em microtubos com álcool absoluto a -20°C para posterior extração do DNA e análises moleculares.

4.3 ANIMAIS

4.3.1 Caracterização dos animais dos abrigos

Um total de 100 gatos distintos participaram do estudo, sendo 34 animais pertencentes ao abrigo A e 66 animais oriundos do abrigo B (Figura 04). Durante a

coleta de amostras biológicas os animais foram agrupados de acordo com as características como sexo, tipo de pelagem e localização no abrigo. O sexo mais representativo foi de fêmeas, correspondendo à 56% (56/100) dos animais coletados, enquanto foi observada uma quantidade de 44% (44/100) de machos. Quanto ao tipo de pelagem dos gatos, a maioria era curta (90%), assim como a maior parte dos animais era mantida em baias (99%) (Tabela 01).

Figura 4 – Condições das baias onde os animais dos abrigos de animais que participam do estudo são mantidos. A) Abrigo situado na área rural e B) Abrigo situado na área urbana. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Tabela 1 – Número (N) e porcentagem (%) de gatos de acordo com o sexo, tipo de pelagem e localização em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2021

Número (N) e porcentagem (%) de gatos		
Categorias		Total (N=100)
Sexo	Fêmea	56 (56%)
	Macho	44 (44%)
Pelagem	Curta	90 (90%)
	Longa	10 (10%)
Local	Abrigo A	34 (34%)
	Abrigo B	66 (66%)
Condição	Solto	1 (1%)
	Preso	99 (99%)

Fonte: Alves (2021).

4.3.2 Coleta de materiais biológicos e aspectos éticos

Participaram do estudo 100 gatos pertencentes a dois abrigos de animais. Para a colheita das amostras biológicas dos gatos foi realizada a captura com puçá e contenção química, na dosagem de 11 mg/kg de cetamina + 1,1 mg/kg de xilazina, associados na mesma seringa. Após a sedação, foi realizada a tricotomia, lavagem e antissepsia prévia da área puncionada com álcool iodado.

A venopunção foi feita pela veia jugular onde foi coletado 5 mL de sangue, o qual foi armazenado a 4°C em tubos a vácuo sem anticoagulante para a obtenção do soro imune para realização do exame bioquímico, ELISA e RIFI, e em tubos com anticoagulante (EDTA) para preservação do sangue para o exame de hemograma, PCR e hemocultura.

As amostras de células epiteliais da conjuntiva ocular foram coletadas, por meios de suabes estéreis, condicionados em microtubos de 1,5 ml livres de DNase e RNase e armazenados a 4°C até o momento da extração de DNA, para realização da PCR.

Foi feita a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) de linfonodos poplíteos ou da medula óssea do esterno dos gatos, dando preferência para a primeira opção, por ser menos traumática e invasiva. Primeiramente, havia a tentativa da coleta de material dos linfonodos, e se caso não houvesse amostra biológica, era realizada a punção aspirativa da medula óssea do osso esterno do animal. O aspirado obtido foi depositado em uma lâmina de vidro para realização de esfregaço e coloração, e agulha foi lavada em meio de cultura para realização de cultura celular.

Após a coleta do material biológico, os animais ainda anestesiados, foram submetidos à RIM. Posteriormente, os animais foram colocados em caixas de transporte individuais e acompanhados por veterinários até o despertar e recuperação total dos reflexos.

As coletas de amostras biológicas foram autorizadas por meio do termo de consentimento livre esclarecido assinado pelos tutores responsáveis pelos abrigos (Apêndice 01). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil sob o número de protocolo 3737090317 e realizados em conformidade com a legislação nacional brasileira sobre experimentação animal (Lei Federal 11794, de 10 a 8-2008).

4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

4.4.1 Avaliação clínica e identificação dos animais

Antes da coleta do material biológico, todos os animais foram avaliados clinicamente por um médico veterinário, fotografados (face e corpo), e identificados com cordões numerados. Todas as informações obtidas durante a avaliação foram inseridas em fichas individuais. Nestas foram descritas informações como: características físicas (coloração do gato, tamanho e tipo de pelagem), aspectos clínicos (score corporal, inspeção de pele, palpação de linfonodos e presença de anormalidades) e localização do animal no abrigo (Apêndice 02). A condição do score corporal dos gatos foi de acordo com o preconizado por Laflamme (1997).

4.4.2 Hemograma

O sangue obtido durante a coleta de material biológico foi processado em analisador hematológico automático (Sysmex pochH-100iVTM), para obtenção do valor de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas. O valor do Volume Globular (VG) foi obtido pela leitura de microcapilar, após centrifugação do sangue total em microcentrífuga (Microline®, Laborline). Os índices hematimétricos como o Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de VG, hemoglobina, eritrócitos e comparados com valores normais para gatos.

4.4.3 Diagnóstico diferencial de sangue

Após a coleta do sangue, uma gota foi inserida em lâminas de vidro, em duplicata, para realização de esfregaço sanguíneo, e posteriormente, foram coradas com Giemsa (4%) e com Kit panótico rápido® (CÓD: 657- LAB HOUSE). A leitura do material foi realizada sob microscopia óptica pelo Laboratório Clínico Veterinário, da Unidade Didático Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- FZEA/USP.

4.4.4 Perfil bioquímico

O sangue de gatos foi centrifugado após a formação do coágulo, em centrífuga, a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi levado ao analisador automático (Mindray BS 120, China), para determinação do perfil hepático por meio da determinação de atividade da alanina transferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), assim como foi determinado o perfil renal pelas dosagens de ureia e creatinina.

As concentrações de proteínas totais, albumina, globulina, fosfatase alcalina (FA) e gamma glutamiltransferase (GGT) também foram avaliadas. Cada análise foi determinada utilizando-se kits específicos, seguindo a metodologia estabelecida de acordo com o fabricante.

4.4.5 Detecção de FIV e FeLV

Todos os gatos foram submetidos ao diagnóstico para FIV e FeLV por meio do teste rápido (SNAP Combo FIV/FeLV, IDEXX Laboratories- Código 99-08354). Esse teste rápido realizou a detecção simultânea do antígeno da FeLV e dos anticorpos da FIV no soro dos gatos do estudo.

4.5 DIAGNÓSTICO PARA TRIPANOSSOMATÍDEOS

4.5.1 Exames sorológicos

4.5.1.1 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)

O teste ELISA indireto para leishmaniose foi realizado segundo a técnica preconizada por Lima et al. (2005). O antígeno foi produzido em laboratório a partir de promastigotas desenvolvidas em cultivo celular de amastigotas provenientes de cães sintomáticos para LV. Esse material foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP Jaboticabal, SP.

Para o teste ELISA, em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa

por 18 horas em câmara úmida, a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS; 0,01M, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (TCBS-T). As placas foram bloqueadas com TCBS-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C, por duas horas. Após quatro lavagens com TCBS-T, para a retirada da solução de bloqueio, foi adicionado 100 µL por poço, em duplicata, das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos a serem testados na diluição 1:400 em TCBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas quatro vezes com TCBS-T.

Em seguida, 100µL do conjugado anti-IgG (HPP Conjugated- BETHYL) total de gato ligado à peroxidase na diluição 1:40000 em Tampão Salino Fosfato em Tween (PBS-T), foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C, por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada (TMB) em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N, e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm.

Os valores das D.O.(s) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (1980) e Oliveira et al. (2008). A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos, de acordo com a seguinte equação:

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

4.5.1.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A RIFI foi realizada conforme a técnica descrita por Oliveira et al. (2008). Para esta técnica, foram utilizadas lâminas com antígeno fixado (formol 2%) para o diagnóstico in-vitro de *L. infantum* (Imunodot® diagnósticos), cedidas gentilmente pelo Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP Jaboticabal, SP.

Microplacas foram utilizadas para a diluição inicial de 190 µL de solução de Tampão Salino Fosfato (PBS) 0,01M com pH 7,2 e 10 µL do soro para uma diluição inicial (primeira diluição) de 1:20. Posteriormente, foi distribuído 100 µL da primeira diluição em 100µL de solução de PBS para obter uma diluição de 1:40 (segunda diluição), a qual foi utilizada para a triagem da reação. Da mesma forma, foram diluídos soros controles positivo e negativo. Nas lâminas fixadas com o antígeno de *L. infantum*, foi distribuído 10 µL de soro diluído (segunda diluição), incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS por 10 minutos, e secadas em estufa.

O conjugado espécie-específico (Anti gato IgG FITC, Sigma®, USA), foi diluído segundo título pré-estabelecido (1:100) em solução de Azul de Evans a 20%, no qual foi previamente diluído em PBS na proporção de 1:5. foram distribuídos 10 µL do conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C, por 30 minutos, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 10 minutos e secas em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5; cobrindo-se com lamínulas de 24x60mm, examinando-se em microscópio de imunofluorescência (Olympus®, BX-FLA) na objetiva de 40x.

Após leitura dos controles, foi realizada a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se positivas as amostras de soro com titulação igual ou maior que 1:40. Os soros positivos na diluição 1:40 foram avaliados em diluições maiores (1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em gatos.

4.5.2 Exame parasitológico direto: Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)

Uma agulha foi introduzida nos linfonodos poplíteos ou na medula óssea do osso esterno, e o material biológico obtido foi depositado em uma lâmina de vidro e com auxílio de outra lâmina de vidro foi realizado um esfregaço. Após a secagem das lâminas, em laboratório, foi realizada a coloração dos esfregaços usando o kit panótico rápido® (CÓD: 657- LAB HOUSE). As amostras foram submetidas a ação de um fixador (por 10 segundos), e duas soluções corantes, submergidas por 8 segundos em solução básica e 12 segundos em solução ácida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e secadas em temperatura ambiente.

O material foi visualizado em microscópio de luz (aumento de 1000x), e a amostra foi considerada positiva se fossem encontradas formas amastigotas no interior de macrófagos depois de observados pelo menos 100 campos visuais.

4.5.3 Exames de cultura celular

4.5.3.1 Hemocultura

Após a coleta das amostras biológicas dos animais, o tubo com sangue foi mantido em repouso por pelo menos 60 minutos até que houvesse uma clara divisão entre as frações do sangue: porção plasmática, porção leucocitária e sedimento de hemácias, respectivamente. Para a hemocultura, foram separados três tubos de vidro, contendo em cada um, 5 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril (Apêndice 03) (Figura 05).

Figura 5 – Produção de meio LIT em capela de fluxo laminar. A: Manipulação dos tubos com meio LIT em condições totalmente estéreis, B: Processo de filtração do meio LIT com auxílio de bomba a vácuo, Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

A manipulação das amostras foi realizada em capela de fluxo laminar, higienizada com álcool 70% e sob ação de luz ultravioleta por 15 minutos. Os tubos foram devidamente identificados com a devida fração do sangue cultivada e numeração do animal. Com uma pipeta, retirou-se a porção plasmática, que imediatamente foi transferida para o tubo 01. O mesmo procedimento foi repetido para a porção leucocitária, a qual foi transferida para o tubo 02 e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o tubo 03. As culturas foram mantidas em estufa a 26°C, até dois meses após a inoculação.

As leituras das hemoculturas foram feitas 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação da amostra, em capela de fluxo laminar. Para o procedimento, aproximadamente 10µL de cada tubo de cultura inoculado foi retirado e depositado em lâmina de vidro, juntamente com lamínula. As culturas foram observadas sob microscopia óptica (aumento de 1000X) e a amostra foi considerada positiva se apresentasse formas flageladas. As amostras positivas foram lavadas em PBS (pH 7,2) e centrifugadas. O sedimento obtido foi colocado em microtubos estéreis livres de DNases e RNases, a uma temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA para a PCR.

4.5.3.2 Cultura de aspirado de linfonodo/medula óssea

Durante a coleta das amostras biológicas, foi realizada a PAAF do linfonodo/medula óssea de cada animal e a seringa utilizada foi lavada em 5mL de meio de cultura LIT, permitindo que todo o líquido celular remanescente na coluna e agulha da seringa entrasse em contato com o meio. Previamente, todos os tubos haviam sido higienizados com álcool 70% e identificados com a numeração do animal.

Ao chegar no laboratório, os tubos foram higienizados novamente e acondicionados em estufa a 26°C. As leituras foram feitas 15, 30, 45 e 60 dias após a inoculação da amostra, em capela de fluxo laminar. Para o procedimento, aproximadamente 10µL de cada tubo de cultura inoculado foi retirado e depositado em lâmina de vidro, juntamente com lamínula.

As culturas foram observadas sob microscopia óptica (aumento de 1000X) e a amostra foi considerada positiva se apresentasse formas flageladas. As amostras positivas foram lavadas em PBS (pH 7,2) e centrifugadas. O sedimento obtido foi colocado em microtubos estéreis livres de DNases e RNases, a uma temperatura de -20°C até o momento da extração do DNA para a PCR.

4.5.3.3 Isolamento de cultura e caracterização taxonômica de espécies

Todos os achados do cultivo celular foram repicados em novos tubos com LIT estéril e observados semanalmente para verificação de crescimento celular. Os repiques das culturas foram realizados até que obtivesse uma razoável concentração de parasitos. As cepas obtidas do isolamento foram separadas em alíquotas, acondicionadas em tubos de criogenia, e congeladas em nitrogênio líquido (-196°C).

Para a caracterização de espécie, os isolados foram recuperados e expandidos em meio LIT e enviados para o Laboratório de pesquisas em leishmaniose, do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ- Rio de Janeiro, RJ. A técnica utilizada foi a MLEE, no qual foi utilizada o loci enzimático a enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), em géis a 1%. Os géis foram analisados determinando a mobilidade eletroforética das bandas com base nas posições padrão das cepas de leishmanias de referência, conforme descrito por Cupolillo et al. (1995).

4.5.4 Exames moleculares

4.5.4.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA do sangue, DNA da hemocultura e DNA de cultura de aspirado foi utilizado o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (Ref:69506, QIAGEN, GERMANY), conforme recomendações do fabricante. A extração de DNA das amostras de suabe conjuntival foi pela técnica de salting-out descrita por John et. al (1991) e modificada por Lahiri; Nurnberger (1991).

Para a extração de DNA dos flebotomíneos, o tórax e abdômen das fêmeas foram macerados com auxílio de pistilo em 50 µL de água ultrapura autoclavada seguido de homogeneização em vórtex por 15s e centrifugação a 13000 g por 15s. A extração foi realizada utilizando kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE, Healthcae, Piscataway, NJ), de acordo com as recomendações do fabricante (CARVALHO et al., 2017).

4.5.4.2 Controles negativos e positivos

Como controle negativo foi utilizada água deionizada estéril, e como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *L. infantum* da cepa MCAN/BR/1984/CCC-17.481 e *L. amazonensis* IFLA/BR/1967/Ph8 cedidas gentilmente pela FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ.

4.5.4.3 PCR dos genes do Internal transcribed spacer 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) - Para detecção de tripanossomatídeos

A PCR para detecção de DNA de tripanossomatídeos foi realizada em todas as amostras de sangue, suabe conjuntival, culturas positivas e fêmeas de flebotomíneos, conforme El Tai et al. (2000).

Foi feita a amplificação da região ITS-1 do DNA ribossomal (rDNA) utilizando os primers LITSR- Forward (5`-CTGGATCATTTTCCGATG-3`) e L5.8S- Reverse (5`TGATACCACTTATCGCACTT-3`), que se anelam nas sequências conservadas SSU e 5.8S. Já para a amplificação da região do ITS-2 do rDNA, foram utilizados os

primers L5.8SR- Forward (5'- AAGTGCGATAAGTGGTA-3') LITSV- Reverse (5'- ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'), que se anelam nas sequências conservadas 5.8S e LSU.

Para a mistura da PCR: tampão de PCR (50mM KCl, 10mM de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 2U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 400mM de cada iniciador e 5µL da amostra de DNA. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por quatro minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 30s, 53°C durante 30s e 72°C durante um minuto e uma extensão final de 72°C durante cinco minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel agarose 1,5% (m/v) corados com SYBR® safe (Invitrogen®) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100bp - DNA Molecular Weight Marker (Amresco®) foi utilizado para estimarmos o tamanho do amplicon. Os produtos foram visualizados em luz ultravioleta em transiluminador e fotografado com o auxílio de fotodocumentador Photo Doc-It (UVP®).

4.5.4.4 PCR para *Leishmania* spp. (13A/13B)

A PCR para detecção de DNA de *Leishmania* spp. foi realizada em todas as amostras de sangue, suabe conjuntival, culturas positivas e fêmeas de flebotomíneos, conforme descrita por Rodgers et al. (1990).

Os oligonucleotídeos utilizados nesta reação tem como alvo a região do kinetoplasto do DNA (kDNA) do parasito, sendo utilizado os primers 13A: (5'- AACTTTTCTGGTCCTCCGGG-3') e 13B: (5'- CCCCCAGTTTCCCGCCC-3').

Para a mistura da PCR: Tampão da PCR (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl), 0,75µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de dNTP's (10 mM cada), 1,5 µL de cada primer (10pmol/ µL), 0,15 µL de Taq (5U/ µL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5 µL e 2,5 µL de DNA (10ng/ µL), com volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial em um ciclo de 94°C por três minutos seguido de 35 ciclos a 94°C durante 40s, 56°C durante 30s, 72°C durante 30s, e uma extensão final de 72°C durante cinco minutos. O produto amplificado da reação positiva para *Leishmania* spp. foi de 120 pb, que foram visualizados em gel de agarose a 2%.

4.5.4.5 PCR do gene endógeno nos flebotomíneos

A fim de avaliar a qualidade da extração de DNA e excluir falsos negativos oriundos de inibição de PCR ou degradação da amostra foi realizado uma PCR para a região IVS6 do gene Cacophony (*cac*) de flebotomíneos de acordo com Pita-Pereira (2005).

Os primers utilizados foram 5Llcac 5'-GTGGCCGAACATAATGTTAG-3' e 3Llcac 5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-3, descritos por Lins et al. (2002) que amplificam um segmento de 220 pares de base (pb). Água deionizada estéril foi usada como controle negativo e amostras de DNA extraído de *Lu. longipalpis* da colônia do LESP-FSP/USP foram utilizadas como controle positivo.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel agarose 2% (m/v) corados com SYBR® safe (Invitrogen®) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100bp - DNA Molecular Weight Marker (Amresco®) foi utilizado para estimarmos o tamanho do amplicon. Os produtos foram visualizados em luz ultravioleta em transiluminador e fotografado com o auxílio de fotodocumentador Photo Doc-It (UVP®).

4.5.4.6 PCR para Estudo da fonte Alimentar dos Flebotomíneos

A detecção de fontes de repasto sanguíneo em flebotomíneos foi realizada através da PCR para o gene Citocromo b (CYT-B), seguido de sequenciamento genético. Os primers utilizados foram CYT-B1 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') e CYT-B2 (5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'), conforme Steuber et al. (2005).

As condições para a reação foram: 1x Tampão de PCR, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 10 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U/ml Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 5 µL de DNA (10 ng/ µL) e água Milli-Q o suficiente para completar 25 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®).

O produto amplificado pelos primers Cyt 1 e Cyt 2 da reação positiva para o gene alvo é de 359 pb, um segmento conservado do DNA mitocondrial de mamíferos e aves. Como controle positivo, foi utilizada amostra de DNA extraído de sangue de

ção (*Canis lupus familiaris*) e como controle negativo, DNA extraído de machos de *Lu. longipalpis*.

4.5.4.7 Sequenciamento genético

Foi realizado o sequenciamento genético nas amostras de DNA de sangue, culturas e fêmeas de flebotomíneos que geraram bandas na eletroforese das PCR ITS-1, ITS-2 e CYT-B.

Nas amostras de DNA de sangue e de cultura, os produtos de PCR foram retirados do gel de agarose e purificados usando o kit Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare, New York, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando 20ng/μL de produto purificado da PCR e 5μM de cada primer. As amostras foram enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Instituto Biológico (IB) da Universidade de São Paulo (USP).

Já nas amostras de flebotomíneos, foi realizada uma segunda amplificação para atingir a concentração de 30ng/μl e os produtos amplificados foram enviados para a empresa PROTEOBRAS - DESENVOLVIMENTO BIOTECNOLÓGICO-Campinas, SP, onde foram purificados e sequenciados.

O software Chromas foi utilizado para verificar manualmente os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse*. O *BioEdit Sequence Alignment Editor* foi usado para alinhar e gerar sequências consenso, que foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados GenBank através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

4.5.5 Teste intradérmico

4.5.5.1 Reação intradérmica de Montenegro

4.5.5.1.1 Produção de antígeno

Para realização da reação de hipersensibilidade tardia foi cultivado em laboratório *L. infantum* da cepa IOC/L2906 (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) cedidas

gentilmente pela Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios- APTA- Bauru/SP. A cepa-mãe é originária do Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ. Os parasitos foram cultivados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) (LEMESRE et al.,1988).

A suspensão de células foi mantida em meio RPMI (1640 MEDIUM-SIGMA®), pH=7,0 suplementado com soro fetal bovino a 10%, urina humana masculina fresca (centrifugada por 10 minutos, 3500 rpm) a 2%, solução de antibióticos (pentabiótico). Foi feita uma filtração posteriormente, e o meio RPMI completo foi distribuído no volume de 10 mL em tubos de ensaios auto clavados e estocados em geladeira. Uma pequena parte (2 tubos) foi mantida em estufa a 37°C (48 horas) para observar se houve contaminação do meio.

A cada 7 dias foi realizado o repique das promastigotas de *L. infantum*, em capela de fluxo laminar após observação do crescimento destas em microscópio óptico. O meio de cultura de interesse foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos.

Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se de 5 a 6 mL de PBS (pH 7,2), e centrifugou-se novamente a 3.000 rpm, por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 400x). A suspensão de parasitos foi lavada por mais três vezes em PBS e fixada em solução salina de digluconato de clorexidina (1:10.000) com concentração final de aproximadamente 4. 10⁷ promastigotas/mL. A suspensão foi submetida a um ciclo de congelamento (-70°C), aquecimento (37°C) e vortexação (1 minuto) por sete vezes e estocadas em freezer a 20°C.

4.5.5.1.2 Aplicação do Antígeno

A reação de Montenegro foi realizada conforme a técnica descrita por Silveira et al. (2012) com algumas modificações.

Antes do procedimento foi feita uma leve tricotomia e desinfecção do local de inoculação e foi aplicado um volume de 0,1 mL do antígeno, por via intradérmica, na região dorsal da orelha direita de cada animal. Como controle negativo, foi aplicada a solução salina de digluconato de clorexidina (1:10.000) intradermicamente na orelha esquerda de cada gato (Figura 06).

A observação da reação dérmica foi realizada após 24, 48 e 72 horas, com auxílio de paquímetro, e o animal foi considerado positivo se houvesse formação nodular com diâmetro $\geq 5\text{mm}$ em até 72 horas após a aplicação do antígeno (SOKAL, 1975).

Figura 6 – Inoculação por via intradérmica de antígeno de *L. infantum* em gatos procedentes de abrigos de animais. A: Inoculação do controle e antígeno na área dorsal da orelha do animal; B: Formação imediata de uma bolha contendo a substância injetada (hora zero). Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de correlação de Pearson (r) para avaliar a relação entre os fatores climáticos (temperatura média mensal, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar) e a quantidade de flebotomíneos capturados durante o estudo. Os dados climáticos foram obtidos no site da Estação Agrometeorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP – Campus de Ilha Solteira, SP.

Os métodos diagnósticos foram submetidos à análise estatística, para verificar a concordância entre eles pelo índice Kappa com 95% de confiança. Os valores obtidos foram classificados: péssima concordância ($k < 0$), concordância ruim ($0 < k < 0,2$), concordância razoável ($0,2 < k < 0,4$), boa concordância ($0,4 < k < 0,6$), concordância muito boa ($0,6 < k < 0,8$) e concordância excelente ($k > 0,8$), de acordo com Landis e Koch (1977).

Entre os gatos positivos e negativos, os métodos estatísticos foram realizados de acordo com a natureza dos dados: os paramétricos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste-t de Student, quando avaliado dois grupos, ou o teste de Tukey para comparação de médias com mais de três parâmetros. Para os testes estatísticos foi respeitado o intervalo de confiança de 95%. As análises foram feitas no programa R versão 2.15.3 (R CORE TEAM, 2020).

5 RESULTADOS

5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS

Um total de 193 flebotomíneos (Figura 07) foram coletados no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2020, sendo 64,2% (124/193) machos e 35,8% (69/193) fêmeas indicando uma razão M/F de 1,8. Todos os flebotomíneos foram achados em apenas um dos abrigos de animais: abrigo A, que é situado na zona rural de Ilha Solteira- SP.

Em relação aos pontos estratégicos onde foram montadas as armadilhas luminosas, o ponto 1, localizado próximo à fossa do abrigo, foi o local onde houve maior número de capturas de flebotomíneos representando 60,1% (116/193) do total. No ponto 2, que estava próximo a uma árvore frutífera, mangueira, foram encontrados 39,9% dos flebotomíneos.

Figura 7 – Flebotomíneos capturados no estudo. A: Etapa do processo de clarificação dos flebotomíneos; B: Cabeça e C: Tórax e abdômen de Macho de *Lu. longipalpis* capturado no estudo e montado em lâmina de microscopia de luz. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Em relação à identificação de fauna, 15 machos não foram identificados pois foram utilizados como controle no diagnóstico molecular. Dos flebótomos processados para identificação de espécies (N=178), foram encontradas sete espécies, distribuídas em três subtribos quatro gêneros: BRUMPTOMYIINA – *Brumptomyia avellari* (COSTA LIMA, 1932); LUTZOMYIINA- *Evandromyia* (*Aldamia*) *carmelinoi* (RYAN et al., 1986), *Ev. (Ald.) lenti* (MANGABEIRA, 1938), *Ev. (Barretomyia) cortelezzi* (BRÈTHES, 1923), *Lutzomyia longipalpis* (LUTZ; NEIVA, 1912); PSYCHODOPYGINA- *Nyssomyia neivai*

(PINTO, 1926), *Ny. Whitmani* (ANTUNES; COUTINHO, 1939). Oito espécimes foram danificados durante a manipulação das amostras e, por conta disso, a identificação foi feita até nível de gênero. Os flebotomíneos foram: *Brumptomyia* spp. (n=3), *Nyssomyia* spp. (n=3) e *Evandromyia* (*Aldamyia*) spp. (n=2) (Tabela 01).

Dos flebótomos identificados, as espécies que tiveram o maior número de espécimes coletados foram *Lu. longipalpis* (41%; n=73), sendo 42 machos e 31 fêmeas, *Ny. whitmani* (20,8%; n=37) e *Ev. (Ald.) carmelinoi* (16,8%; n=30). A quantidade de outros espécimes capturados foram: *Br. avellari* (5,6%; n=10), *Ev. (Bar.) cortelezzi* (5%; n=9), *Ev. (Ald.) lenti* (4,5%; n=8) e *Ny. Neivai* (1,6%; n=3) (Tabela 02).

Tabela 2 – Número e identificação de espécies de flebótomos capturados em um abrigo de animais domésticos, no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2020. Ilha Solteira, 2021

Identificação de Flebótomos em abrigos de animais	
Espécie	Número
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	73
<i>Nyssomyia whitmani</i>	37
<i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) <i>carmelinoi</i>	30
<i>Brumptomyia avellari</i>	10
<i>Evandromyia</i> (<i>Barretomyia</i>) <i>cortelezzi</i>	9
<i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) <i>lenti</i>	8
<i>Nyssomyia neivai</i>	3
<i>Brumptomyia</i> spp.	3
<i>Nyssomyia</i> spp.	3
<i>Evandromyia</i> (<i>Aldamyia</i>) spp.	2
TOTAL	178

Fonte: Alves (2021).

A sazonalidade dos flebotomíneos durante o estudo está representada na Figura 08, nos quais foram considerados: o número total de insetos coletados mensalmente em todos os pontos de captura, a precipitação total mensal, temperatura média mensal e umidade relativa do ar, de cada mês.

O mês de janeiro de 2020 foi o período que apresentou o maior número de flebotomíneos capturados, correspondendo a 10,4% (20/193) do total, seguido dos

meses de março de 2018 (8,8%; 17/193), fevereiro de 2018, maio e junho de 2019 com 7,7% (15/193) dos flebotomíneos.

O teste de correlação de Pearson (r) evidenciou correlação moderada estatisticamente significativa, entre o número de flebotomíneos capturados e a umidade relativa do ar ($r=0,5243$; $p=0,007136$). No entanto, não houve correlação significativa entre o número de flebotomíneos e a temperatura ($r=0,32$; $p>0,05$) e a precipitação ($r=0,31$; $p>0,05$).

Figura 8– Número de flebotomíneos capturados de acordo com o mês de captura e parâmetros climáticos, em um abrigo de animais domésticos. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Pela avaliação clínica realizada, os gatos foram classificados em: sem sinais clínicos, quando não apresentavam qualquer alteração durante o exame clínico, e com presença de sinais clínicos, quando apresentava um ou mais sinais clínicos. Dos 100 animais avaliados, foi verificada a presença de alterações clínicas em 74% (74/100) dos gatos e 26% (26/100) não apresentavam sinais clínicos. Os sinais clínicos mais

frequentes foram lesões cutâneas, magreza, linfonodomegalia, lesões oculares e em cavidade oral, diarreia e desidratação (Tabela 03 e Figura 9).

Em relação aos animais que exibiram sinais clínicos (N=74), 51,4% (38/74) apresentavam um, 29,7% (22/74) dois e 18,9% (14/74) três ou mais alterações durante o exame clínico no momento da coleta de material biológico.

Tabela 3 – Número (N) e porcentagem (%) de alterações clínicas encontradas em gatos procedentes de abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2021

Avaliação Clínica de gatos de abrigos de animais		
Sinais Clínicos	Região/Tipo	Total (N=74)
Lesões cutâneas	Face	8 (10,8%)
	Orelha	13 (17,5%)
	Corpo	12 (16,2%)
	Alopecia	26 (35,1%)
		59 (79,7%)
Lesões em cavidade oral	Língua	1 (1,35%)
	Gengivite	2 (2,7%)
		3 (4%)
Score corporal baixo	Magreza (Score 2)	20 (27,1%)
	Caquexia (Score 1)	13 (17,5%)
		33 (44,6%)
Linfonodomegalia	Sub-mandibular	20 (27,1%)
	Poplíteo	7 (9,5%)
	Pré-escapular	1 (1,35%)
		28 (37,9%)
Lesões oculares		4 (5,4%)
Diarreia		1 (1,35%)
Desidratação		1 (1,35%)

Fonte: Alves (2021).

Figura 9 – Fotos de gatos de abrigos de animais com alterações clínicas. Lesões cutâneas em: A: Plano nasal, B: Pescoço, C: Atrás da orelha, D: Ponta de orelha, E: Pescoço, F: Atrás da orelha. Outras alterações: G: Caquexia; H: Lesão ocular; I: Áreas alopécicas distribuídas em todo o corpo. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

O score corporal dos animais foi avaliado, onde foi feita uma comparação da condição corporal do gato no momento da coleta do sangue com ilustrações impressas na ficha clínica, conforme o apêndice 1. Desta forma, a classificação estabelecida foi de: Score 1- Caquético; Score 2- Magro; 3- Ideal; 4- Sobrepeso e 5- Obeso.

Conforme a Figura 10 mostra, a maioria dos animais estava com condição corporal ideal, ou seja, 60% (60/100) apresentaram Score 3, seguido de Score 2 (20%), Score 1 (13%) e por último Score 4 (7%).

Figura 10 – Número (N) e porcentagem (%) de gatos de acordo com o score corporal no momento da coleta de amostras biológicas. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Em relação as análises de hemograma completo e o leucograma diferencial, as principais alterações encontradas foram: redução do número de plaquetas (79%) e neutrófilos (84%), leucocitose (67%) e eosinofilia (65%). Além disso, 13 (13%) animais apresentaram anemia, pela redução da taxa de eritrócitos (n=2) e hematócritos (n=11). Já nas análises bioquímicas, verificou-se, aumento de globulinas (76%), proteínas totais (50%), AST (32%) e ureia (21%). Além disso, foi verificada a diminuição da concentração de GGT em 64% dos animais.

Todos os animais do estudo foram submetidos ao teste rápido de FIV/FelV exceto o gato 34, pois a amostra de soro foi insuficiente e ao voltar ao abrigo para uma nova coleta de material biológico, o animal havia falecido. Desta forma, dos 99 animais diagnosticados, 23,2% (23/99) foram positivos para FIV enquanto que somente 1,1% (1/99) foi positivo para FelV. Dos 24 animais, somente seis não apresentaram alterações clínicas. Vale ressaltar que todos os animais que foram positivos no parasitológico direto e PCRs eram FIV/FelV negativos.

5.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DOS ANIMAIS

5.3.1 ELISA

Do total de gatos analisados durante o estudo, 34% (34/100) foram positivos para *Leishmania* spp. pelo método ELISA (Figura 11).

Figura 11 – Foto da placa utilizada no diagnóstico sorológico ELISA. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

O diagnóstico foi inicialmente realizado nos gatos de 01 a 50, onde o ponto de corte (PC) foi determinado ($D.O = 0,220$), permitindo que os animais fossem considerados positivos, pela técnica, a partir do NE3. A Tabela 04 ilustra o número de animais de acordo com o NE determinado durante a técnica diagnóstica. Posteriormente, o ELISA foi realizado na outra metade dos animais (do 51 a 100), apresentando $PC=0,297$, permitindo que os animais fossem considerados positivos, pela técnica, a partir do NE3 (Tabela 05).

Tabela 4 – Níveis ELISA (NE), intervalos de densidade óptica (D.O.) e número de animais (Dos gatos 01 a 50) durante levantamento sorológico de gatos procedentes de abrigos de animais. Ilha Solteira, 2021

Intervalo de níveis ELISA (NE) durante levantamento sorológico		
Níveis ELISA	Intervalo D.O.	Número de animais
0	0-0,119	17
1	>0,119- 0,161	5
2	>0,161- 0,217	4
3*	>0,217- 0,293	6
4	>0,293- 0,396	7
5	>0,396- 0,535	4
6	>0,535- 0,723	3
7	>0,723- 0,976	0
8	>0,976- 1,318	2
9	>1,318	2

*Ponto de corte

Fonte: Alves (2021).

Tabela 5 – Níveis ELISA (NE), intervalos de densidade óptica (D.O.) e número de animais (Dos gatos 51 a 100) durante levantamento sorológico de gatos procedentes de abrigos de animais. Ilha Solteira, 2021

Intervalo de níveis ELISA (NE) durante levantamento sorológico		
Níveis ELISA	Intervalo D.O.	Número de animais
0	0- 0,134	32
1	> 0,134- 0,180	3
2	>0,180- 0,243	4
3*	> 0,243- 0,328	5
4	>0,328- 0,442	2
5	>0,442- 0,596	1
6	>0,596- 0,804	0
7	>0,804- 1,085	1
8	>1,085- 1,464	0
9	>1,464	2

*Ponto de corte

Fonte: Alves (2021).

5.3.2 RIFI

Dos 100 animais que foram submetidos à RIFI, 74% (74/100) reagiram positivamente (Figura 12).

Figura 12 – Lâmina de RIFI com antígeno de *L. infantum* de gato positivo para o teste (Gato 75), na diluição 1:40. Aumento de 400x. Barra= 50µm. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Dos 74 animais que reagiram na RIFI, 49 apresentaram positividade somente até a titulação 1:40, 22 animais permaneceram positivos até a titulação 1:80, dois animais apresentaram positividade até a titulação 1:160 e somente um gato apresentou positividade até a titulação 1:320 (gato75).

5.4 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Dois animais (gatos 13 e 75) apresentaram formas amastigotas sugestivas de *L. infantum* no interior de macrófagos (Figura 13 e 14).

Figura 13 – Esfregaço de material coletado por PAAF de linfonodo de gato, corado em panótico rápido, mostrando formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de macrófago (seta vermelha). Aumento de 1.000x. Barra=50µm. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 14 – Esfregaço de material coletado por PAAF de medula de gato, corado em panótico rápido, mostrando formas amastigotas de *Leishmania* spp. no interior de dois macrófagos. Aumento de 1.000x. Barra=50µm. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.5 EXAMES DE CULTURA CELULAR

5.5.1 Hemocultura

Dos 100 gatos avaliados, foram encontradas estruturas sugestivas de tripanossomatídeos em culturas de oito animais distintos. Em um dos animais (gato 75), ficou evidente que o achado em cultura de sedimento de hemácias, era de fato um tripanossomatídeo (Figura 15).

As formas flageladas foram encontradas nas culturas da porção plasmática dos gatos 32 e 39; porção leucocitária dos gatos 02, 04, 14, 30 e 75 e de sedimento de hemácias do gato 10 e 75.

Figura 15 – Fotos de lâminas de hemocultura com presença sugestiva de protozoários. A: Flagelado em cultura de porção leucocitária do gato 30; B: Flagelado em cultura de porção plasmática do gato 32; C e D: Flagelados (seta vermelha) em cultura de sedimento de hemácias do gato 75. Aumento de 1.000x. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Além disso, suspeita-se que na cultura de sedimento de hemácias de dois animais (gato 42 e gato 52), após 30 dias da inoculação, havia protozoários ciliados com rápida movimentação (Figura 16).

Figura 16 – Fotos de lâminas de culturas de sedimento de hemácias com presença de protozoários ciliados circulando livremente. A: Inúmeros ciliados se movimentando rapidamente (Aumento de 400x), B: Três ciliados na mesma região (Aumento de 1000x); C e D: Esfregaço contendo ciliados corados em panótico rápido (Aumento de 1000x). Ilha Solteira, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.5.2 Cultura de aspirado de linfonodo/medula óssea

Dos 100 gatos avaliados, foram encontradas estruturas sugestivas de tripanossomatídeos em culturas de 4 animais distintos, sendo eles: Cultura de aspirado de linfonodo do gato 13 e de medula óssea dos gatos 17, 30,75.

Após 15 dias da inoculação, a cultura de aspirado de linfonodo do gato 13

apresentava várias formas promastigotas, que foram visualizadas em microscópio óptico (Figura 17). O mesmo aconteceu com a cultura do gato 75.

Figura 17 – Esfregaço de Cultura de aspirado de linfonodo de gato em meio LIT, após 15 dias de inoculação corado em panótico rápido com presença de promastigotas. Aumento de 1.000x. Barra=50µm. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Comparando as promastigotas encontradas durante o exame microscópio das culturas de aspirado de linfonodo do gato 13 e de aspirado de medula óssea do gato 75, aparentemente o gato 13 apresentava promastigotas com flagelo mais curto e um crescimento em cultura rápido, em comparação com as promastigotas encontradas na cultura do gato 75 (Figura 18).

Figura 18 – Culturas in vitro coradas em lâmina pelo Giemsa com presença de promastigotas. A e B: Promastigotas encontradas em cultura de aspirado de medula óssea do gato 75, C e D: Promastigotas encontradas em cultura de aspirado de linfonodo do gato 13, com flagelo curto em relação aos achados do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.5.3 Isolamento de cultura e caracterização taxonômica de espécies

Em relação às hemoculturas, foi obtido o isolamento da cultura das porções leucocitária e do sedimento de hemácias do gato 75. Já da cultura de aspirado, foi feito o isolamento celular de culturas de aspirado de linfonodo do gato 13, assim como da cultura de aspirado de medula do gato 75. As culturas celulares dos gatos 13 e 75 estão todas armazenadas em nitrogênio líquido, e a cultura do gato 13 foi caracterizada geneticamente.

O resultado da caracterização da cultura do gato 13, pela técnica de MLEE, indicou que amostra era uma cepa de *L. major* (Apêndice 04). A amostra foi denominada como *L. major*- IOCL 3773 e está sob cuidados na Coleção de Leishmania (CLIOC)- FIOCRUZ-RJ.

5.6 PCR DAS AMOSTRAS DOS GATOS

5.6.1 PCR das regiões ITS-1 e ITS-2

Nesta etapa, realizou-se a PCR com DNA extraído de sangue, de suabe conjuntival, de hemocultura positiva e de cultura de aspirado positivas.

Sete animais foram positivos pela PCR ITS-1 com DNA de sangue. Destes, cinco (Gatos 10, 13, 17, 20 e 75) apresentaram fragmentos de DNA de 300-350 pares de base (pb) (Figura 19), e os outros dois animais (Gatos 12 e 30), apresentaram fragmentos de DNA de 200-250 pb.

Já pela PCR ITS-1 com DNA de suabe, somente um animal (gato 75) foi positivo pela técnica, apresentando fragmentos de DNA de 300-350pb (Figura 20). Em relação a PCR ITS-1 com o DNA de hemoculturas e culturas de aspirados no qual foram encontradas estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, foram positivas as culturas: de aspirado de linfonodo do gato 13 (450-500pb), assim como a cultura de medula óssea, da porção leucocitária e do sedimento de hemácias do gato 75 (300-350pb) (Figura 21).

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LITSR/L5.8S, obtidos pela PCR de sangue de gatos, com fragmentos de 300-350pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LITSR/L5.8S, obtidos pela PCR de suabe conjuntival de gatos, com fragmentos de 300-350pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostra do gato positivo. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LITSR/L5.8S, obtidos pela PCR de hemocultura e cultura de aspirados de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, AL13: Aspirado de linfonodo do gato 13, PL75: Porção plasmática do gato 75, SH75: Sedimento de hemácias do gato 75 e AM75: Aspirado de medula do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Três animais foram positivos pela PCR ITS-2 com DNA de sangue. Destes, dois (Gatos 14 e 30) apresentaram fragmentos de DNA de 700pb (Figura 22) e o outro animal (Gato 75) apresentou fragmentos de DNA de 700-800pb (Figura 23).

Na técnica de PCR ITS-2 com DNA de suabe, somente um animal (gato 75) foi positivo, apresentando fragmentos de DNA de 700-800pb (Figura 24). Em relação a PCR ITS-2 com o DNA de hemoculturas e culturas de aspirados no qual foram encontradas estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, foram positivas as culturas: de aspirado de linfonodo do gato 13 (600-700pb), assim como a cultura de medula óssea, da porção leucocitária e do sedimento de hemácias do gato 75 (700-800pb) (Figura 25).

Figura 22 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-2 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de sangue de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 23 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-2 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de sangue de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostra do gato positivo. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-2 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de suabe conjuntival de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostra do gato positivo. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers L5.8SR/LITSV, obtidos pela PCR de hemocultura e cultura de aspirados de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, AL13: Aspirado de linfonodo do gato 13, PL75: Porção plasmática do gato 75, SH75: Sedimento de hemácias do gato 75 e AM75: Aspirado de medula do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.6.2 PCR do kDNA de *Leishmania* spp. (13A/13B)

Nesta etapa, realizou-se a PCR com DNA extraído de sangue, de suabe conjuntival, de hemocultura positiva e de cultura de aspirado positivas.

Cinco animais foram positivos (Gatos 10, 13, 17, 20 e 75) pela PCR 13A/13B com DNA de sangue, apresentando fragmentos de DNA de 120 pb (Figura 26). Já pela PCR 13A/13B com DNA de suabe, quatro animais (Gatos 10, 13, 20 e 75) foram positivos, apresentando fragmentos de DNA de 120 pb (Figura 27).

Em relação a PCR 13A/13B com o DNA de hemoculturas e culturas de aspirados no qual foram encontradas estruturas sugestivas de tripanossomatídeos, foram positivas as culturas: de aspirado de linfonodo do gato 13 (100pb), assim como a cultura de medula óssea, da porção leucocitária e do sedimento de hemácias do gato 75 (120pb) (Figura 28).

Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os primers 13A/13B, obtidos pela PCR de sangue de gatos, com fragmentos de 120pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os primers 13A/13B, obtidos pela PCR de suabe de gatos, com fragmentos de 120pb. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, Numeração: amostras dos gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os primers 13A/13B, obtidos pela PCR de hemocultura e cultura de aspirados de gatos. L: Ladder (100pb- KASVI), C+: Controle positivo (DNA de *L. infantum*), C-: Controle negativo, AL13: Aspirado de linfonodo do gato 13, PL75: Porção plasmática do gato 75, SH75: Sedimento de hemácias do gato 75 e AM75: Aspirado de medula do gato 75. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.7 PCR DAS AMOSTRAS DE FLEBOTOMÍNEOS

5.7.1 PCR de gene endógeno (gene cacophony-IVS6)

Sessenta e nove amostras de DNA de tórax e abdômen de fêmeas de flebotomíneos que foram capturadas durante o estudo foram submetidas a PCR de gene endógeno para confirmar a qualidade de extração de DNA. Todas as amostras de DNA apresentaram amplificação e foram analisadas para detecção de DNA de *Leishmania* spp.

5.7.2 Detecção de DNA de tripanossomatídeos em flebotomíneos

Das 69 fêmeas avaliadas, duas fêmeas de *Lu. longipalpis* capturadas no mês de janeiro de 2020 foram positivas para DNA de *Leishmania* spp. pela PCR 13A/13B, apresentando fragmentos de 120pb. Esses dados demonstram uma taxa natural de PCR positiva de 2,9% das fêmeas do abrigo A. Ao realizar as PCR ITS-1 e ITS-2,

somente uma das fêmeas foi positiva, apresentando fragmentos de DNA de 350pb (ITS-1) e de 700pb (ITS-2).

5.7.3 PCR para estudo da fonte alimentar dos flebotomíneos

Foi realizada a PCR para o gene CYT-B nas amostras de tórax e abdômen de fêmeas ingurgitadas, parcialmente ingurgitadas ou grávidas. Um total de 42 fêmeas foram analisadas, e destas, oito amostras foram positivas para a PCR do gene CYT-B, apresentando fragmentos de DNA de tamanho de 359pb.

5.8 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DAS AMOSTRAS DOS GATOS

Foi realizado o sequenciamento genético nas amostras de DNA de sangue, culturas e fêmeas de flebotomíneos que apresentaram fragmentos na PCR ITS-1, ITS-2 e CYT-B.

Dos sete animais positivos nas amostras de sangue pela PCR ITS-1, cinco gatos (Gatos 10, 13, 17, 20 e 75) apresentaram 100% de identidade com *L. infantum*. Com relação aos outros gatos positivos pela PCR, a sequência obtida no sangue do gato12 apresentou 97,8% de identidade com *L. major*. Não foi possível identificar a espécie com o amplicon obtido na PCR de sangue do gato 30 (Tabela 06).

Tabela 6 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-1 de amostras de sangue de gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021

Nome da amostra	Análise do sequenciamento (Sequência consenso)	% de identificação	Tamanho da amostra
Gato 10	CGATGATTACACCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATAT ATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGTACTCAAAATTTGCAGT AAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAAT GTCCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTG CGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTC CTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAA	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb
Gato 13	AAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAAT GTCCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTG CGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTC CTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAGTGCATAA	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb
Gato 17	TACACCCAAAAACATATACAACCTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGG CCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAA GGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAATGTCCGTT TATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGT GGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGAT	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb
Gato 20	ACTCGGGGAGACCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAA AGTTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACG CACCGCCTATACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAAAATATACGGCGT TTCGGTTTTTGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGT GTCGCGATGGATGACTTGGCT	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb
Gato 75	GACCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAAAGTTTGT CTCAAAATTTGCAGTAAAAAAAAGGCCGATCGACGTTATAACGCACCGCCTA TACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTT GGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATG GATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGTAAAG	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb
Gato 12	CCGCCGGGGGACGCCGAACAGGTTTGAGACCCAGGTTTTCTGGATCAT TTTCCGATGATCAAAAAAACAAACCCAAACCTGTTCCGCGTTCCCTCCC CGGGGGGGCGCTCGGACGCAACTCTCTTACTTTTCCGCTCGAGCCTT CTTGACACACCACCGTGTCTGTCTGCTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGT CGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCG ATAAAGTGGTATCAA	Query cover= 84% Identidade=97,8% <i>Leishmania major</i>	200-250pb
Gato 30	NÃO GEROU FITA CONSENSO		200-250pb

Fonte: Alves (2021).

Dos três animais positivos nas amostras de sangue pela PCR ITS-2, um animal apresentou 100% de identidade com *L. infantum* (Gato 75). Um dos outros animais (Gato 14) tinha 86,1% de identidade com *L. major*. Não foi possível identificar a espécie no caso do gato 30 (Tabela 07).

Tabela 7 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-2 de amostras de sangue de gatos positivos. Ilha Solteira, SP, 2021

Nome da amostra	Análise do sequenciamento (Sequência consenso)	% de identificação	Tamanho da amostra
Gato 75	ACGCAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCCCCGTGCATGCCA TATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACGCCGCTCCTCTCTTCTGCACAT ATATATATTATACCATACACAGTATATATAATTATGTGTTGGAAGCCAAGA GGAGGCGTGTGTTGTGTTGTGCGCATATTATATGTATATATGCTGTGTGCA CACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAAATACACACATGCACTCTCTTTTGTGT GGGTGCGCGCGTGGAACCTCCTCTCTGGTGCTTGCAAAGCAGTCTTTTTCT CTTTCTCTTTTCTCTCTCCATTCTCTCTCTCTTTTTCATCAAAAAGGGGG GAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTCGAGGGAGAGAGGCTGTGACCA GGATTATTAACAAAAAACCAAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTT TTTGCTTAATGGGGGGAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGTGGCTCTCTCTGT GTGGTATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGTGTGTGTGTATGTGTTT TACACATATATATATCCGCGCCCTCACTCTCTCATATATAATTTATATGTACG CACAGAGAAAAAGAGAGGCGCT	100% <i>L. infantum</i>	700-800pb
Gato 14	GGCCCAGGCAAAATGAAGTGAAGGGCGCGCCCCCCCCCGAAAAGAC GCCCCGGCGCGTTGGGTTTTGTTGTTCTGGATCATTTCCGATGATCAAAA CAACAAAACCAACCCAGCCTCGGCGTCTCTCTTTTGGGGGGGCGGCG TTCGAGCTCAACACCCCTTCCAATTACATTTTGGCGCTCGAGCCTGCAGTG TGTGACAACAAAACAGCCAGTGTGTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTC GCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTGTTGAAGAACGAGCAAGTGCGA TAAAGTGGTATCAAA	Query cover=80% Identidade=86, 1% <i>Leishmania major</i>	700pb
Gato 30	Sem qualidade		700pb

Fonte: Alves (2021).

Em relação às culturas sequenciadas, duas amostras de um mesmo gato (Gato 75) apresentaram 100% de identidade com *L. infantum*, enquanto a cultura do gato 13 revelou 100% de identidade com *Crithidia fasciculata*. Estes resultados foram semelhantes tanto para amostras amplificadas pela PCR ITS-1 (Tabela 08) quanto pela PCR ITS-2 (Tabela 09).

Tabela 8 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-1 de amostras de culturas positivas de gatos. Ilha Solteira, SP, 2021

Nome da amostra	Tipo de cultura	Análise do sequenciamento (Sequência consenso)	% de identificação	Tamanho da amostra
Gato 13	Aspirado de linfonodo	TTTGTGCGCGCGTGTGCCGGAACAAGGCCAATCGATG CACGTGTGTGTATTGTATTGTTCTTTCTTAGAGAACGAT ATAAAAACCGCGTGCATGGATGACGGCTCAAATAACGT GTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATCTCGTTGAAGA ACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTATCAA	100% <i>Crithidia fasciculata</i>	450-500pb
Gato 75	Aspirado de medula óssea	ACCTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAG CAAAGTTTTGTAAGTCAAAATTTGCAGTAAAAAAGGCC GATCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAA ATGTCCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTT TGGCGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACAT AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTT GAAGAACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTAT	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb
Gato 75	Sedimento de hemácias	CTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCA AAGTTTTGTAAGTCAAAATTTGCAGTAAAAAAGGCCGA TCGACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAAATG TCCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTTGG CGGGGTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAAC GTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAA GAACGCAGTAAAGTGCATAAGTGGTAT	100% <i>L. infantum</i>	300-350pb

Fonte: Alves (2021).

Tabela 9 – Resultado do sequenciamento genético de produtos de PCR amplificados a partir da PCR ITS-2 de amostras de culturas positivas de gatos. Ilha Solteira, SP, 2021

Nome da amostra	Tipo de cultura	Análise do sequenciamento (Sequência consenso)	% de identificação	Tamanho da amostra
Gato 13	Aspirado de linfonodo	CCGAATGCGCGCGTATGTACCACACACAAAAATGCGGA TACACACGCGCGCTTCGCTATCGCCAGAGAGAACTGCGC CACAGTATATATACAAATATGGCCACGTATTTGCATACATG AACATATCCTTCTATACACACAGCTTTGCCCAACTCCAAT AGTACGGCACACACAACAGAATTGCGTGTGTACACCTGC GTGCGTGAGAGTATAGAAGTGTATATAAATAAATATACAC ACCACACACAAGCACACACAAAAACAGGCGTATGTTGTTTT TTGGTTCGACACTGAGAATATGGCATGCACGGGGATGAC TCAAAGAGCTTCTCCCATGCGCCGTTTGC GTTCAAAGAT TCGGTAATTGAATGATTCTGCAATTGATACCA	100% <i>Crithidia fasciculata</i>	600-700pb
Gato 75	Aspirado de medula óssea	GAATCTTTGAACGCAAACGCGCATGGGAGAAGCTCTATT GTGTCATCCCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAA AAAACAACACGCGCGCTCCTCTCTTCTGCACATATATAT TATACCATACACAGTATATATAATTATGTGTTGGAAGCC AAGAGGAGGCGTGTGTTGTGTTGTGCGCATATTATATGT ATATATGCTGTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGAC AAATACACACATGCACTCTCTTTTGTGTTGGTGCGCGCGT GGAAACTCCTCTCTGGTGCTTGCAAGCAGTCTTTTCTC TTTCTCTTTTCTCTCCTTCTCTCTCTCTCTTTTTCATC AAAAAGGGGGGAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTC GAGGGAGAGAGGCTGTGACCAGGATTATTAACAAAAA CCAAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTGCT TAATGGGGGGAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGGCTCTCT CTCTGTGTGGTATATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGT GTGTGTGTGTATGTGTTTACACATATATATCCGCGCC CTCACTCTCATATATAATTATATGTACGCACAGAGAAA AAAGAGAGCGCTC	100% <i>L. infantum</i>	700-800pb
Gato 75	Sangue (interface)	ACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCC CCGTGCATGCCATATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACA CGCCGCCTCCTCTCTCTGCACATATATATTATACCATA CACAGTATATATAATTATGTGTTGGAAGCCAAGAGGAG GCGTGTGTTGTGTTGTGCGCATATTATATGTATATATGCT GTGTGCACACGTAGACAAGTTAGAGTTGGACAAATACACA CATGCACTCTCTTTTGTGTTGGTGCGCGCGTGGAAGTCTC CTCTCTGGTGCTTGCAAAGCAGTCTTTTCTCTTTCTCTTT TTCTCTCTCATTCTCTCTCTCTTTTTCATCAAAAAGGG GGGAGAGAAAAAGAGAGAGGAGGGGGGGTCGAGGGAGA GAGGCTGTGACCAGGATTATTAACAAAAAACCAAAACGA GAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTGCTTAATGGGGG GAGGTGGGTGTGGGTGGTGTGGCTCTCTCTCTGTGTG GTATATATATATGTATATTAGAAGTAGGTTGTGTGTGTG TATGTGTTTACACATATATATCCGCGCCCTCACTCTCT CATATATAATTATATGTACGCACAGAGAAAAAGA	100% <i>L. infantum</i>	700-800pb

Fonte: Alves (2021).

Vale ressaltar que pela PCR do sangue, o gato 13 apresentou DNA de *L. infantum* enquanto na PCR de cultura de aspirado de linfonodo, foi verificada a presença de DNA de *C. fasciculata*. Além disso, a cepa obtida pela cultura de aspirado de linfonodo deste animal indicou a presença de *L. major* pela técnica de MLEE.

5.9 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE FLEBOTOMÍNEOS

Os sequenciamentos genéticos obtidos revelaram que a fêmea de *Lu. longipalpis* positiva pela PCR ITS-1 estava infectada com *L. infantum*.

Em relação ao sequenciamento genético para identificação do hospedeiro vertebrado envolvido no repasto sanguíneo, das oito fêmeas positivas pela PCR CYT-B nenhuma apresentou DNA de gato doméstico em seu tórax e abdômen. No entanto, cinco destes flebotomíneos se alimentaram do sangue de *Sus scrofa domesticus* (porco doméstico) e as amostras de DNA dos outros três insetos foram descartadas pois o sequenciamento detectou amplificação do DNA de inseto.

5.10 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE LF

Para esta etapa, consideramos animais positivos aqueles que reagiram positivamente no ELISA, RIFI, e apresentaram amastigotas e formas flageladas no parasitológico direto e culturas de sangue/aspirados. Pela PCR, foram considerados positivos os animais que apresentaram fragmentos de DNA de tamanhos consistentes com *Leishmania* spp. e que quando sequenciados geneticamente, apresentaram sequência consenso com 100% de identidade com *L. infantum*.

A concordância entre a PCR de hemocultura e a PCR de cultura de aspirados foi considerada perfeita ($k=1$), já que somente um gato (1%, 1/100) foi positivo por ambas as técnicas, o restante dos animais do estudo (99%, 99/100) foram negativos tanto na PCR de hemocultura quanto pela PCR de cultura de aspirados. Desta forma, na análise de concordância entre as técnicas diagnósticas consideramos estas duas técnicas como se fosse uma só: PCR de cultura.

A classificação de acordo com o índice kappa da concordância entre as técnicas diagnósticas pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10 – Classificação de acordo com o índice Kappa (κ) da concordância entre técnicas diagnósticas empregadas em estudo de LV em gatos de abrigo de animais domésticos. Ilha Solteira, SP, 2021

Técnica	RIFI	ELISA	PCRsg	PCRs _u	Hemo.	Cult.Asp.	Parasitol.	PCRcult
RIFI	- $\kappa=0,2372$	Razoável $\kappa=0,2372$	Ruim $\kappa=0,0363$	Ruim $\kappa=0,0289$	Ruim $\kappa=0,0515$	Ruim $\kappa=0,0289$	Ruim $\kappa=0,0142$	Ruim $\kappa=0,0071$
ELISA	Razoável $\kappa=0,2372$	- $\kappa=0,1854$	Ruim $\kappa=0,1854$	Ruim $\kappa=0,1497$	Razoável $\kappa=0,2341$	Ruim $\kappa=0,1497$	Ruim $\kappa=0,0762$	Ruim $\kappa=0,0385$
PCRsg	Ruim $\kappa=0,0363$	Ruim $\kappa=0,1854$	- $\kappa=0,8837$	Excelente $\kappa=0,8837$	Razoável $\kappa=0,2623$	Muito boa $\kappa=0,6512$	Boa $\kappa=0,5588$	Razoável $\kappa=0,322$
PCRs _u	Ruim $\kappa=0,0289$	Ruim $\kappa=0,1497$	Excelente $\kappa=0,8837$	- $\kappa=0,2958$	Razoável $\kappa=0,2958$	Boa $\kappa=0,4792$	Muito boa $\kappa=0,6575$	Razoável $\kappa=0,3902$
Hemo.	Ruim $\kappa=0,0515$	Razoável $\kappa=0,2341$	Razoável $\kappa=0,2623$	Razoável $\kappa=0,2958$	- $\kappa=0,2958$	Razoável $\kappa=0,2958$	Ruim $\kappa=0,1736$	Razoável $\kappa=0,2081$
Cult. Asp.	Ruim $\kappa=0,0289$	Ruim $\kappa=0,1497$	Muito boa $\kappa=0,6512$	Boa $\kappa=0,4792$	Razoável $\kappa=0,2958$	- $\kappa=0,6575$	Muito boa $\kappa=0,6575$	Razoável $\kappa=0,3902$
Parasitol.	Ruim $\kappa=0,0142$	Ruim $\kappa=0,0762$	Boa $\kappa=0,5588$	Muito boa $\kappa=0,6575$	Ruim $\kappa=0,1736$	Muito boa $\kappa=0,6575$	- $\kappa=0,6622$	Muito boa $\kappa=0,6622$
PCRcult	Ruim $\kappa=0,0071$	Ruim $\kappa=0,0385$	Razoável $\kappa=0,322$	Razoável $\kappa=0,3902$	Razoável $\kappa=0,2081$	Razoável $\kappa=0,3902$	Muito boa $\kappa=0,6622$	- $\kappa=0,6622$

Legenda: PCR de sangue (PCRsg); PCR de suabe (PCRs_u); Hemocultura (Hemo.); Cultura de aspirados (Cult. Asp.); Parasitológico direto (Parasitol.); PCR de cultura (PCRcult).

Fonte: Alves (2021).

Entre as concordâncias classificadas como boas, destacam-se as comparações entre: PCR de sangue e parasitológico direto; e PCR de suabe e cultura de aspirado.

Ao compararmos a PCR de sangue e parasitológico direto, dois gatos (2%, 2/100) foram positivos em ambos testes, três gatos (3%, 3/100) foram positivos somente na PCR de sangue, noventa e cinco gatos (95%, 95/100) foram negativos nas duas técnicas simultaneamente e nenhum animal foi positivo somente no parasitológico direto. A concordância entre a PCR de sangue e parasitológico direto foi de 0,5588, revelando uma boa concordância.

Comparando a PCR de suabe e cultura de aspirados, verificou-se que dois gatos (2%, 2/100) foram positivos nas duas técnicas, dois gatos (2%, 2/100) foram positivos somente na PCR de suabe e outros dois gatos (2%, 2/100) foram positivos somente na cultura de aspirados. Um total de 94 animais (94%, 94/100) não foram considerados negativos em nenhuma das duas técnicas. A concordância entre PCR de suabe e cultura de aspirados foi de 0,4792, sendo assim, considerada uma boa concordância.

Já as concordâncias classificadas como muito boas, estão as comparações entre: PCR de sangue e cultura de aspirados; PCR de suabe e parasitológico direto; parasitológico direto e cultura de aspirados e parasitológico direto e PCR de cultura.

Quando comparamos a PCR de sangue a cultura de aspirados, a concordância foi de 0,6512, revelando uma concordância muito boa entre as duas técnicas. Três gatos (3%, 3/100) foram positivos em ambas técnicas e 94 animais (94%, 94/100) foram negativos em ambos diagnósticos. Dois animais (2%, 2/100) foram positivos somente na PCR de sangue e um gato foi positivo somente na cultura de aspirados.

Na comparação entre PCR de suabe e parasitológico direto, dois animais (2%, 2/100) foram positivos em ambas técnicas, dois gatos (2%, 2/100) foram positivos somente na PCR de suabe e nenhum animal foi positivo somente no parasitológico direto. A partir destes dados, a concordância entre PCR de suabe e parasitológico direto foi de 0,6575, considerada muito boa.

Quando comparamos a cultura de aspirados com o parasitológico direto, observamos uma concordância considerada muito boa ($k=0,6575$). Dois gatos (2%, 2/100) foram positivos somente na cultura de aspirado e nenhum animal foi positivo somente no parasitológico direto. Dois animais (2%, 2/100) foram positivos em ambos testes, assim como 96 gatos (96%, 96/100) foram negativos na cultura de aspirados e no parasitológico direto.

Na comparação entre o parasitológico direto e a PCR de cultura, um gato foi positivo (1%, 1/100) para as duas técnicas, 98 gatos (98%, 98/100) foram negativos

no parasitológico direto e na PCR de cultura. Apenas um gato (1%, 1/100) apresentou resultado divergente, sendo positivo no parasitológico direto e negativo na PCR de cultura. Desta forma, a concordância entre o parasitológico direto e a PCR de cultura foi de 0,6622, sendo classificada como muito boa.

Já a concordância entre PCR de sangue e PCR de suabe foi de 0,8837, portanto, considerada excelente. Um total de quatro gatos (4%, 4/100) foram positivos pelas duas técnicas simultaneamente, noventa e cinco animais (95%, 95/100) foram negativos nas duas metodologias e somente um animal (1%, 1/100) foi positivo na PCR de sangue, mas negativo na PCR de suabe.

5.11 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENTRE GATOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA LV

Para esta análise estatística, separamos nossos gatos em dois grupos: POSITIVOS e NEGATIVOS. O grupo dos POSITIVOS foi composto por cinco gatos, FIV e FeLV negativos, que apresentavam sinais clínicos sugestivos de LF, com diagnóstico sorológico e molecular positivos e sequenciamento genético com 100% de identidade com *L. infantum*. Além disso, dois animais foram positivos no parasitológico direto (Tabela 11). Já o grupo dos NEGATIVOS, era composto por onze animais que obtiveram diagnóstico negativo para LF em todos os testes.

Tabela 11 – Diagnóstico de cinco gatos positivos para *L. infantum* pela PCR de uma área endêmica de leishmaniose visceral por diagnóstico sorológico e parasitológico. Ilha Solteira, SP, 2021

Animais	Sinais clínicos	FIV/ FeLV	Diagnóstico sorológico		Diagnóstico molecular			PAAF
			ELISA /NE	RIFI/ Tit.	ITS-1	13A/ 13B	Seq.	
Gato 10	Lesão de pele, alopecia, caquexia	N	+ /6	+ /1:40	+	+	<i>L. infantum</i>	N
Gato 13*	Lesão de pele, alopecia, caquexia, aumento de linfonodo, lesão de orelha	N	+ /6	+ /1:80	+	+	<i>L. infantum</i>	+
Gato 17	Lesão de pele, alopecia, lesão de orelha	N	+ /5	+ /1:40	+	+	<i>L. infantum</i>	N
Gato 20	Aumento de linfonodo, lesão de orelha, magreza	N	+ /4	+ /1:40	+	+	<i>L. infantum</i>	N
Gato 75	Magreza	N	+ /9	+ /1:320	+	+	<i>L. infantum</i>	+

Legenda: positivo (+); negativo (N), Titulação (Tit.), Sequenciamento (Seq.), Animal também positivo para *C. fasciculata* e *L. major*, em PCR de cultura de aspirado de linfonodo e técnica de MLEE, respectivamente (*).

Fonte: Alves (2021).

Em relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos, ao comparar os valores médios do grupo dos gatos positivos com os valores de referência, foi observado que os animais infectados apresentaram trombocitopenia ($128,2 \times 10^3/\mu\text{l}$), leucocitose ($31,54 \times 10^3/\mu\text{L}$) e aumento de globulinas (5,59 g/dL).

Ao compararmos o grupo dos animais positivos com o grupo dos animais negativos, podemos observar o aumento do VCM ($p=0,00028$, $p<0,05$), redução de CHCM ($p=0,00178$, $p<0,05$), aumento de hematócrito ($p=0,03836$, $p<0,05$) e aumento

do valor da creatinina ($p=0,04311$, $p<0,05$), nos gatos positivos em relação aos gatos negativos, mas que estavam dentro do intervalo de referência da espécie. Além disso, houve redução das plaquetas ($p=0,01076$ $p<0,05$), no grupo dos gatos positivos em relação aos negativos, fora do intervalo de referência para a espécie (Tabela 12).

Tabela 12 – Comparação entre parâmetros hematológicos e bioquímicos de gatos infectados por *L. infantum* (positivos) e não infectados (negativos). Ilha Solteira, SP, 2021

Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos gatos				
Parâmetros	Referência	Positivos	Negativos	p- value
Eritrócitos (10 ⁶ /μl)	5 – 10	7,128 ± 0,63 ^a	7,236±0,67 ^a	0,7657
HCT (%)	24 – 45	31,22 ± 5,41 ^a	26,66± 2,71 ^b	0,03836*
Hemoglobina (g/dl)	8 – 15	9,74 ± 1,59 ^a	10,07 ± 1,23 ^a	0,6534
VCM (fl)	39 – 55	43,58 ± 4,29 ^a	37,14 ± 1,08 ^b	0,00028*
CHCM (%)	30 -36	31,44 ± 3,74 ^b	37,77 ± 2,73 ^a	0,00178*
HCM (pg)	12,5 – 17,5	13,62±1,40 ^a	13,91± 1,207 ^a	0,6695
Plaquetas (10 ³ /μl)	230 – 680	128,2 ± 79,96 ^b	319,63 ± 133,594 ^a	0,01076*
Leucócitos (10 ³ /μl)	5,5 -19	31,54 ± 13,98 ^a	22,8 ± 5,04 ^a	0,08061
Eosinófilos (10 ³ /μl)	0 -1,5	0,34 ± 0,19 ^a	0,26 ± 0,167 ^a	0,4536
Neutrófilos (10 ³ /μl)	2,5 - 12,5	2,38 ± 1,35 ^a	1,48 ± 0,537 ^a	0,07133
Linfócitos (10 ³ /μl)	1,5 – 7	4,66 ± 1,90 ^a	4,79 ± 1,66 ^a	0,8908
Monócitos (10 ³ /μl)	0 - 0,85	0,08 ± 0,04 ^a	0,04 ± 0,040 ^a	0,1446
Ureia (mg/dL)	42,8 - 64,2	55,22 ± 14,57 ^a	47,22 ± 10,40 ^a	0,2279
Creatinina (mg/dL)	0,8 - 1,8	1,23 ± 0,31 ^a	0,96 ± 0,16 ^b	0,04311*
ALT (UI/L)	06 – 83	54,6 ± 19,99 ^a	55,6 ± 30,96 ^a	0,9468
AST (UI/L)	26 – 43	42,4 ± 12,46 ^a	40,81 ± 10,9 ^a	0,8013
Proteína Total (g/dL)	5,4 – 7,8	7,38± 0,54 ^a	7,35 ± 0,60 ^a	0,9248
Albumina (g/dL)	2,1 - 3,3	2,38 ± 0,45 ^a	2,221 ± 0,19 ^a	0,315
Globulina (g/dL)	2,6 – 5,1	5,59 ± 0,62 ^a	5,13 ± 0,62 ^a	0,1876
ALP (UI/L)	04 – 81	52 ± 36,30 ^a	41,18 ± 17,62 ^a	0,426
GGT (UI/L)	1,3 – 5,3	1,2±0,84 ^a	2,27 ± 1,79 ^a	0,2289

Legenda: Hematócrito (HCT); volume corpuscular médio (VCM); concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM); hemoglobina Corpuscular Média (HCM); alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST); fosfatase alcalina (ALP); gamaglutamiltransferase (GGT); (*) Apresentou diferença estatística entre os grupos. Valores de referência como proposto por Feldman et al, (2000) e Kaneko; Harvey e Bruss (2008). Comparação de médias pelo teste-t. Diferentes letras minúsculas (a / b) indicam diferença estatística entre colunas a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Programa R, versão i386 4.0.3 (R CORE TEAM, 2020).

Fonte: Alves (2021).

5.12 REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO

De todos os animais avaliados, 60/100 (60%) apresentaram resposta celular (Figura 29) à inoculação de *L. infantum*, com formação de nódulos $\geq 5\text{mm}$ (Figura 30). Nenhum gato apresentou reação no local onde foi aplicado o controle negativo da reação. Observou-se que a maioria dos animais positivos apresentou nódulo em até 24 horas após a inoculação do antígeno, representando 60% (36/60) do total. Em seguida, 33,3% (20/60) reagiram após 48 horas, e 6,7% (4/60) após 72 horas de inoculação.

Figura 29 – Ilustração do possível funcionamento da resposta imune dos gatos do estudo ao antígeno de *L. infantum* inoculado pela técnica de RIM. Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

Figura 30 – Reação intradérmica de Montenegro com antígeno de *L. infantum* em gatos procedentes de abrigos de animais. A: Gato negativo para o teste, sem a formação de nódulo; B, C e D: Gatos positivos para o teste, com formação de nódulo no local de inoculação do antígeno (Seta vermelha). Ilha Solteira, SP, 2021

Fonte: Alves (2021).

5.13 RIM E OUTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Nesta etapa, foi feita a comparação dos resultados da RIM com os resultados da RIFI, ELISA, PAAF e PCR ITS-1/13A13B de sangue. Na PCR, foram considerados apenas os animais positivos com sequenciamento com 100% de identidade com *L. infantum*.

Em relação aos gatos positivos por outro diagnóstico e seu diagnóstico de RIM: dos gatos positivos para RIFI, 47 eram positivos para RIM e 27 eram negativos para RIM, enquanto dos gatos positivos por ELISA, 22 eram positivos e 12 eram negativos para RIM. Com relação ao diagnóstico molecular, apenas um gato foi positivo para RIM e os demais gatos foram negativos para RIM. Pelo diagnóstico de PAAF, os 2 gatos positivos foram negativos para RIM.

Dos gatos RIM-negativos (40/100), 11 animais apresentaram sinais clínicos e, destes, quatro eram animais doentes PCR-positivos que combinavam 100% com *L. infantum* e eram negativos para FIV e FeLV. Assim, em relação aos cinco gatos positivos para PCR cujo sequenciamento correspondeu a 100% com *L. infantum*, apenas um animal foi positivo para RIM. Dois dos 4 gatos PCR-positivos e RIM-negativos foram positivos para testes parasitológicos, e todos os 5 gatos PCR-positivos foram positivos para RIFI e ELISA com títulos variando de 1:40 a 1: 320 na RIFI.

Quanto à concordância entre a RIM e os demais métodos diagnósticos, foi classificada como péssima e ruim, com índices Kappa de PCR ($k = -0,0678$), PAAF ($k = -0,0403$), ELISA ($k = 0,0602$) e RIFI ($k = 0,1150$).

5.14 EXPRESSÃO IMUNE DOS ANIMAIS DO ESTUDO PARA *L. INFANTUM*

Através da combinação de diagnóstico sorológico e RIM, foi identificada uma taxa de frequência de 87% (87/100) por RIFI +RIM e 72% (72/100) por ELISA + RIM nesta população de gatos. Em relação à expressão imune, o diagnóstico sorológico e a reatividade RIM de gatos revelaram os seguintes perfis: (1) RIFI (+) / RIM (-) = 27 gatos, (2) RIFI (-) / RIM (+) = 13 gatos, (3) RIFI (+) / RIM (+) = 47 gatos,

(4) ELISA (+) / RIM (-) = 12 gatos, (5) ELISA (-) / RIM (+) = 38 gatos e (6) ELISA (+) / RIM (+) = 22 gatos (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência de animais de acordo com os perfis de resposta imune da infecção por *L. infantum* em gatos de uma área endêmica de leishmaniose visceral, Ilha Solteira, SP, 2021

Perfil de resposta imune n (%)						
Perfil	RIFI x RIM (tf=87%)			ELISA x RIM (tf=72%)		
	RIFI (+)/ RIM (-)	RIFI (-)/ RIM (+)	RIFI (+)/ RIM (+)	ELISA (+)/ RIM (-)	ELISA (-)/ RIM (+)	ELISA (+)/ RIM (+)
Frequência específica (n=100 gatos)	27 (27%)	13 (13%)	47 (47%)	12 (12%)	38 (38%)	22 (22%)

Legenda: Taxa de frequência (tf); positivo (+); negativo (-).

Fonte: Alves (2021).

6 DISCUSSÃO

6.1 CAPTURA E PCR DE FLEBOTOMÍNEOS

Inúmeros estudos sobre levantamento da fauna de flebotomíneos vêm sendo feitos com o objetivo de ampliar o conhecimento das áreas de ocorrência, além de ser uma ferramenta preciosa para auxiliar a implantação de políticas de controle epidemiológico. No presente trabalho foi realizado levantamento da fauna de flebotomíneos em abrigos de animais de Ilha Solteira, município situado na região Centro-Oeste do estado de São Paulo.

Todos os flebotomíneos do estudo foram capturados no abrigo localizado na área rural do município (Abrigo A). Nessa mesma área, Spada et al. (2014) detectaram a presença de *Lu. longipalpis* em 100% das propriedades visitadas, inclusive, este abrigo foi um dos locais de maior prevalência de *Lu. longipalpis*. Em seu estudo de ecótopos de flebotomíneos, Teodoro et al. (1993) observaram maior densidade de flebotomíneos em área domiciliar e peridomiciliar do que em área florestal.

A presença de matéria orgânica produzida pelos animais associada à proximidade do abrigo A a uma propriedade que possui criações de porcos e galinhas, podem ter sido responsáveis pela alta densidade dos flebotomíneos. A presença de animais domésticos, principalmente galinhas, parece ser um fator de risco para a manutenção da elevada densidade de flebotomíneos (GENARO et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2012). Outros trabalhos demonstraram a atratividade de flebotomíneos aos abrigos de animais domésticos (XIMENES et al., 1999; REINHOLD-CASTRO et al., 2008; SARAIVA et al., 2006).

Alexander et al. (2002) demonstraram que a galinha é fator de risco devido a atração de reservatórios potenciais para aquele determinado ambiente e pela liberação de dióxido de carbono que atraem o vetor. No entanto, a mesma é considerada refratária, pois não consegue sustentar infecções por *Leishmania*, por conta da temperatura corporal alta (ALEXANDER et al., 2002).

Na área rural onde o abrigo A é localizado, também foram encontrados fragmentos de mata nativa, animais silvestres e árvores frutíferas, que em conjunto, fornecem condições de reprodução, proliferação e desenvolvimento desses insetos (BRASIL 2014; SPADA et al., 2014; XIMENES et al., 1999). Por conta disso, o abrigo

do estudo poderia desempenhar um papel importante na manutenção da LV, por apresentar os animais infectados associados com a presença dos flebotomíneos. Tanto os animais quanto os humanos por possuírem acesso a estes ambientes podem estar vulneráveis à infecção por LV.

A maior proporção de machos de flebotomíneos encontrada neste estudo corrobora os resultados obtidos na maioria dos estudos que envolve coletas com uso de armadilhas CDC (BARATA et al., 2004; RESENDE et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; PENHA et al., 2013). Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que ao eclodir, a genitália do macho está invertida e são necessárias 12 horas para a rotação da mesma; por isso os machos eclodem antes das fêmeas (CHANOTIS, 1967); e também pela intensa atividade dos machos devido à liberação de dióxido de carbono e cairomônios pelos animais do abrigo, que atraem os machos e estimulam a formação de agregações para o acasalamento (KELLY; DYE, 1997).

Neste estudo, foi feito levantamento de fauna de flebotomíneos durante o período de dois anos, cinco dias por mês, entretanto, somente com armadilhas luminosas não é possível verificar a abundância de espécies (SHAW; LAINSON, 1972). Os dados obtidos oferecem uma ideia aproximada da diversidade de espécies (GALATI et al., 1997).

Foram encontradas sete espécies de flebotomíneos, e neste estudo, a espécie predominante foi a *Lu. longipalpis* (41%), principal vetor de LV no Brasil (BRASIL, 2014). A predominância de *Lu. longipalpis* em relação às outras espécies de flebotomíneos já foi relatada em inúmeras pesquisas no Brasil (XIMENES et al., 1999; BARATA et al., 2004; RESENDE et al., 2006; DIAS et al., 2007; NUNES et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; PENHA et al., 2013; GALVIS-OVALLOS et al., 2017b). Em um levantamento de fauna flebotomínea realizado em Três Lagoas-MS, município situado a 67 kms de Ilha Solteira, também se verificou a predominância de *Lu. longipalpis* em relação às outras espécies. Este número elevado de *Lu. longipalpis*, observado ao longo dos dois anos de capturas, poderia explicar a ocorrência de casos de LV canina, tanto no abrigo (SILVA et al., 2014; SPADA, et al., 2014) quanto no município (PAULAN et al., 2012).

A alta concentração de *Lu. longipalpis* neste estudo pode estar associada à presença de animais domésticos e de matéria orgânica, que são fontes sanguíneas e criam condições de aumento da densidade do vetor no ambiente antrópico. Esta predominância pode ser um indicativo da capacidade de adaptação do *Lu. longipalpis*

em ambiente antrópico, além de evidenciar seu papel na transmissão local da LV (TEODORO et al., 1993; XIMENES et al., 1999; DIAS; LOROSA; REBELO, 2003; MICHALSKY et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Ny. whitmani, a segunda espécie mais encontrada no estudo, não pode ser negligenciada, já que é considerada a principal vetora de LT (BRASIL 2017). Outras espécies que foram capturadas no presente estudo e que merecem destaque foram, *Ny. neivai*, que já foi descrita infectada por *L. infantum* (SARAIVA et al., 2009), e a *Ev. (Ald.) lenti* que foi encontrada infectada por *L. infantum* e *L. braziliensis* (LANA et al., 2015). Tanto a *Ny. whitmani* quanto a *Ny. neivai*, possuem alta capacidade de adaptação ao ambiente antrópico e são frequentemente encontradas próximas de domicílios e áreas degradadas (ANDRADE-FILHO et al., 2001; MARCONDES et al., 2005).

No município do estudo, a área rural é constituída predominantemente de habitações, com áreas de horticultura e pastagens, e quase não há vegetação original. O crescimento urbano e modificações intensas nos seus habitats, provocaram a restrição de espaços ecológicos para os flebotomíneos, favorecendo sua adaptação em outros ambientes e contribuindo para a aproximação dos vetores e dispersão das leishmanioses (TEODORO et al., 1993; XIMENES et al., 2007).

Em relação à sazonalidade dos flebotomíneos, eles estiveram presentes em todos os meses do estudo, exceto junho e outubro de 2020. O crescimento da população de flebotomíneos ao longo dos meses ocorreu após períodos de alta temperatura, chuvosos, e consequentemente, com a umidade relativa do ar mais alta. Observando-se o gráfico de sazonalidade, no mês de janeiro de 2020 foi o período em que houve maior captura de flebotomíneos, explicada pela alta temperatura média (27,1 °C), precipitação pluviométrica alta (203,4mm) e umidade relativa do ar alta (82,7%) do mês anterior, o que está de acordo com outros trabalhos que relataram o aumento do número de flebotomíneos após períodos de chuva (TEODORO et al., 1993; RESENDE et al., 2006; MICHALSKY et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; LANA et al., 2015).

Os flebotomíneos na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, no entanto, na fase larvária necessitam de um ambiente úmido e rico em matéria orgânica para seu desenvolvimento. A chuva possibilita a umidificação do substrato e matéria orgânica, oferecendo ótimas condições para o desenvolvimento da larva, e por este motivo, a frequência de flebotomíneos é maior após o período de chuva (BRASIL,

2006; PENHA et al., 2013).

A densidade de flebotomíneos e os fatores climáticos estão fortemente relacionados, Feliciangeli (1987) e Barata et al. (2004), verificaram que a taxa de precipitação e umidade relativa do ar foram os fatores mais importantes na sazonalidade de flebotomíneos. No presente estudo, houve uma correlação significativa entre o número de flebotomíneos capturados e a umidade relativa do ar ($r=0,5243$; $p=0,007136$). A temperatura média mensal não foi tão crucial, provavelmente por conta da pouca variação térmica entre os meses, que ficou entre 22 e 28 °C, ao longo do estudo.

A frequência elevada de *Lu. longipalpis* e *Ny. whitmani* no interior do abrigo é um alerta para a possibilidade de surtos de leishmanioses entre os cães e gatos que ali vivem, e até mesmo para a população humana do município. Os dados entomológicos obtidos no presente estudo, como frequência e padrão sazonal dos flebotomíneos, possibilitam aos órgãos competentes acompanhar o comportamento dos vetores, a fim de prever possíveis alterações, para que se possa implementar programas efetivos de controle dos flebotomíneos no município de Ilha Solteira.

A técnica de PCR vem sendo utilizada no diagnóstico molecular e é considerada sensível, permitindo detectar *Leishmania* em amostras clínicas com poucos parasitos, e as vantagens de sua utilização são evidentes em comparação com outras técnicas convencionais (RODGERS et al., 1990; WEIGLE et al., 2002). Rodríguez et al. (1994) conseguiram detectar DNA de *Leishmania* spp. em biópsias de úlceras de 98% dos pacientes com diagnóstico clínico de LT, enquanto pela cultura encontraram 42% e pelo esfregaço 64%.

No entanto, principalmente em países em desenvolvimento, o método de observação dos parasitos em microscopia óptica é o mais utilizado. Além de exigir experiência na leitura, a confirmação nos casos positivos só é feita através do isolamento em cultura do parasita, que frequentemente é vulnerável à contaminação por fungos e bactérias (RODRÍGUEZ et al., 1994).

Por conta da alta sensibilidade na detecção de DNA do parasito, a PCR seria uma ferramenta adequada na verificação de tripanossomatídeos em flebotomíneos (DE BRUJIN; BARKER, 1992), fato que já foi comprovado por Michalsky et al. (2002), que detectaram amplificação de DNA em amostras de flebotomíneos que tinham apenas dez leishmanias no seu interior. A técnica não é complexa e é rápida, adequada para uso em grandes quantidades de insetos.

Estudos de identificação de espécie da *Leishmania* encontradas em flebotomíneos e a taxa de flebotomíneos naturalmente infectados de uma região são pilares importantes em estudos epidemiológicos das leishmanioses (MICHALSKY et al., 2002). Além disso, estudos que determinam a carga parasitária de *Leishmania* em flebotomíneos capturados em natureza são indicadores importantes na intensidade de transmissão dos parasitos aos hospedeiros (GONZÁLEZ et al., 2017).

No presente estudo, foram encontrados DNA de *Leishmania* spp. em duas fêmeas (2/69) de flebotomíneos capturadas em janeiro de 2020, e para determinar a espécie infectante, utilizamos a PCR com alvo no rDNA de *Leishmania* spp. usando as regiões ITS-1 e ITS-2 e posteriormente o sequenciamento genético. Entretanto, só houve amplificação para os genes na amostra de DNA de somente um flebotomíneo, correspondendo à *L. infantum*.

A partir desse resultado, obtivemos uma taxa de infecção natural de flebotomíneos de 2,9% (2/69) por *Leishmania* spp. A taxa foi maior do que o índice de 0,4% encontrada por Oliveira-Pereira et al. (2006), de 1,2% verificada por Galvis-Ovallos et al. (2017b), de 1,23% em estudo de Savani et al. (2009) e de 1,9% detectada por Silva et al. (2008b), no entanto, menor do que a taxa de infecção natural de 3,9% em estudo realizado em João Antônio- MS (PAIVA et al., 2006).

Se considerarmos a taxa de infecção natural somente das fêmeas de *Lu. longipalpis* capturadas no nosso estudo, o valor subiria para 6,4%, ou seja, das 31 fêmeas de *Lu. longipalpis* capturadas, 6,4% (2/31) delas estavam infectadas por *Leishmania* spp. Esta taxa de infecção por *Leishmania* spp. foi maior que a encontrada por Savani et al. (2009) e Galvis-Ovallos et al. (2017b) As variações na especificidade e sensibilidade dos testes de PCR, aliados aos métodos de captura, quantidade de hospedeiros e prevalência do parasita no local, podem influenciar nesta diferença na taxa de infecção natural dos vetores (GALVIS-OVALLOS et al., 2017b).

Essa alta taxa de infecção natural do *Lu. longipalpis* pode ser explicada pela quantidade de animais que são mantidos no abrigo aliado à presença de cães. Em estudo anterior, a população canina apresentou uma taxa de 40,3% de positividade para LV em esfregaço de PAAF (SILVA et al., 2014). A presença do vetor e de animais infectados no interior do abrigo, demonstra que existe a circulação do parasita e é um risco potencial para os humanos, sendo necessário medidas de controle do inseto.

Para entendermos a epidemiologia das leishmanioses, também é essencial compreendermos o comportamento e hábitos alimentares dos insetos vetores

(BARATA et al., 2005). Induzida pela devastação de áreas de mata e processo de urbanização, a adaptação dos flebotomíneos a outros ambientes já é realidade, e esse comportamento os obriga a procurar novas fontes de repasto sanguíneo (TEODORO et al., 1993; XIMENES et al., 2007).

A identificação de repasto sanguíneo de flebotomíneos pode ser feita por técnicas sorológicas e moleculares, e em nosso estudo, utilizamos a PCR do gene citocromo B para identificação dos hospedeiros vertebrados, pois ela possui alto grau de sensibilidade e especificidade (PAIVA-CAVALCANTI; SILVA; GOMES, 2010). Das 42 fêmeas selecionadas para identificação do repasto sanguíneo, somente oito foram positivas na PCR CYT B. Essa baixa porcentagem de identificação de fonte de repasto pode estar relacionada com o baixo volume de sangue encontrado no flebotomíneo e ao tempo de digestão após o repasto sanguíneo (CARVALHO et al., 2017).

Das fêmeas positivas pela PCR CYT-B do presente estudo, nenhuma apresentou DNA de gato doméstico, o mesmo aconteceu em estudo realizado no Maranhão, mas por técnica sorológica, em que se avaliou o conteúdo estomacal de *Lu. longipalpis* encontrados em ambientes intradomiciliar e peridomiciliar (DIAS; LOROSA; REBELO, 2003). Apesar de não encontrarmos flebotomíneos com DNA de gato, Ogusuku et al. (1994) e Sales et al. (2015) detectaram flebotomíneos, que se alimentaram de felinos em municípios do Brasil e Peru.

Os gatos são fontes de alimentação (COLMENARES et al., 1995) e fonte de infecção para vetores flebotomíneos, Maroli et al. (2007), em seu estudo de xenodiagnóstico em um gato, verificaram taxas de 20% e 21%, respectivamente. Os felinos são predadores noturnos e são mais ativos justamente no mesmo período de alimentação dos flebotomíneos, e é provável que os flebotomíneos tenham mais dificuldade em se alimentar do sangue do animal naturalmente.

Nesse estudo, cinco flebotomíneos se alimentaram do sangue de *Sus scrofa domesticus* (porco doméstico), hábito alimentar relatado em outros estudos (BAUM et al., 2015; PATERNINA et al., 2016). Três espécies distintas se alimentaram em suínos sendo elas, *Lu. longipalpis* (vetor LV), *Ny. whitmani* (vetor LT) e *Ev. (Ald.) carmelinoi*. Em geral, *Lu. longipalpis* tem caráter oportunista e desta forma, pode se alimentar do sangue de inúmeras espécies de vertebrados, mas possui preferência por vacas e porcos (MORRISON; FERRO; TESH, 1993). Em estudo de flebotomíneos e animais domésticos de área endêmica para LT, conduzido por Muniz et al (2006), várias

espécies de flebotomíneos, incluindo *Ny. whitmani* não apresentavam preferência alimentar quanto aos animais estudados.

A ausência de sangue de cães e gatos nestes flebotomíneos, mesmo com populações densas desta espécie nos abrigos, é um achado interessante, que também foi observado no estudo de Leonel (2019). Os flebotomíneos aparentemente não estão se alimentando do sangue dos cães e gatos pertencentes ao abrigo, e desta forma, a criação de suínos em área próxima ao abrigo está contribuindo com fonte de sangue para os flebotomíneos.

Este resultado concorda com os achados em estudos anteriores que sugeriram que o sangue de outros mamíferos são mais atraentes que o sangue de cães (MAIA et al., 2015; PATERNINA et al., 2016). Esta ausência de alimentação em cães e gatos pode indicar que, nestes locais, nenhuma destas espécies foi a principal fonte alimentar dos flebotomíneos, devido à presença de outros vertebrados de porte maior (MAIA et al., 2015), como os suínos.

Sugere-se que após períodos de chuvas, o risco de transmissão de *Leishmania* spp. aumenta e, o encontro de fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas por *Leishmania* spp. e *L. infantum* que vivem próximos do local de estudo, corrobora a hipótese de que a transmissão da doença esteja ocorrendo nas dependências do abrigo. Estes dados levantados durante o estudo são importantes ferramentas para decidir quais medidas preventivas devem ser tomadas para controle da doença, desde o local em que o abrigo é construído e até mesmo a possibilidade de aplicação de inseticidas em épocas de reprodução dos flebotomíneos.

6.2 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

A área em que foi realizado o presente estudo é considerada endêmica para LV, com registros da doença em humanos, cães, gatos e animais silvestres (QUEIROZ, et al. 2010; TENÓRIO et al., 2011; ALVES-MARTIN, et al., 2017; CVE, 2018).

Apesar da maioria (60%) dos animais encontrados nos abrigos estarem com score corporal adequado, alguns apresentaram magreza (33%), assim como 74% dos animais do estudo possuíam alteração clínica, como presença de lesões cutâneas, magreza, linfadenomegalia, lesões oculares, diarreia e desidratação. Já em relação

as análises laboratoriais, como hemograma, leucograma diferencial, perfil hepático e bioquímico, grande parcela dos gatos apresentou alterações como redução do número de plaquetas e neutrófilos; leucocitose; eosinofilia; aumento: de globulinas; de proteínas totais, de AST e ureia.

Dos animais positivos para FIV e FeLV (n=23) do nosso estudo, 17 deles apresentam pelo menos uma alteração clínica. Alguns autores acreditam que alguns achados clínicos inespecíficos podem ser confundidos com outras doenças, tais como a leucemia felina (FeLV), imunodeficiência felina (FIV), histoplasmose e esporotricose (SOUZA et al., 2005; PENNISI et al., 2015b). Essas alterações clínicas podem até estar associadas à LF (PENNISI et al., 2015b), no entanto, não se pode afirmar que são decorrentes da infecção por *Leishmania* spp. É importante salientar que os gatos destes abrigos não eram todos castrados, a alimentação não era adequada e brigas eram recorrentes no interior das baias. Provavelmente, além de estarem portando tripanossomatídeos, esses gatos poderiam portar outras patologias crônicas (PENNISI et al., 2015b).

Em relação aos dados hematológicos, o grupo dos animais positivos para *L. infantum* do presente estudo apresentou redução do número das plaquetas em comparação com o grupo dos animais negativos ($p=0,01076$ $p<0,05$), concordando com achados de Pennisi et al (2004), Marcos et al (2009) e Silva (2019). Em seu estudo com gatos domésticos, Silva (2019) descreveu uma associação entre a infecção por *L. infantum*, trombocitopenia e hiperproteinemia com baixa albumina.

Ao realizar o tratamento da LF em um gato de dois anos, Basso et al. (2016) verificaram que o animal apresentava redução do número de plaquetas. Em cães, a trombocitopenia pode estar relacionada com a produção de anticorpos anti-plaquetários que são produzidos por cães infectados (TERRAZANO et al., 2006), e com o estágio clínico da doença, pois nas primeiras fases de infecção a *Leishmania* é capaz de interagir com as plaquetas por imunoaderência, formando grandes agregados de plaquetas (DOMINIQUEZ; TORANO, 2011).

O grupo dos animais positivos apresentou uma porcentagem maior de hematócritos ($p= 0,03836$, $p<0,05$) em relação ao grupo dos negativos, e como os valores de VCM e CHCM são calculados a partir dos valores das porcentagens de hematócritos, consequentemente os animais positivos apresentaram aumento do VCM ($p=0,00028$, $p<0,05$) e redução da CHCM ($p=0,00178$, $p<0,05$), mas que estavam dentro do intervalo de referência da espécie.

Em relação ao intervalo de referência da espécie estudada, o grupo dos animais positivos apresentou leucocitose ($31,54 \times 10^3/\mu\text{L}$) e hiperglobulinemia (5,59 g/dL). A leucocitose também foi observada em 33% dos cães com LV em estudo de Freitas et al. (2012), e sua ocorrência está relacionada a doenças infecciosas, inflamatórias, autoimunes, parasitárias, alérgicas ou neoplásicas, mas também pode estar associada a situações de estresse agudo em gatos (BUSH, 2004; FAM et al., 2010).

A hiperglobulinemia também foi relatada em todos os quatro gatos positivos para *Leishmania* spp. no estudo de Pennisi et al (2004) e nos dois gatos positivos para leishmaniose no trabalho de Rüfenacht et al (2005). Os gatos doentes possuem anticorpos específicos e desta forma, frequentemente é encontrada hiperglobulinemia nestes animais (PENNISI et al., 2013).

Por não existirem técnicas diagnósticas padronizadas para detecção de tripanossomatídeos em gatos domésticos, o diagnóstico neste estudo foi baseado em diferentes abordagens que são rotineiramente aplicados em estudos com cães. Existe uma dificuldade na detecção de LF, por exemplo, pela presença de poucas ou nenhuma alteração clínica em gatos infectados (PENNISI et al., 2015b) que poderiam estar associados a uma resistência à doença (KIRKPATRICK; FARRELL; GOLDSCHMIDT, 1984).

A prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em gatos varia entre 0 e 68,5%, e esta variação de prevalência é influenciada pelo nível de endemicidade, tipo de metodologia usada no estudo e população felina analisada (PENNISI, 2013, 2015a). No nosso estudo 74% dos animais apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela RIFI, índice tão elevado semelhante aos encontrados em estudos anteriores com os animais do abrigo A, onde Alves-Martin et al. (2017) detectaram soroprevalência de 62,7% em gatos e Silva et al. (2014) detectaram positividade de 65,7% entre os cães. Nossos valores, foram maiores do que os encontrados em outras áreas endêmicas do Brasil, que foram 10,9% no interior do estado de São Paulo (VIDES et al., 2011), 15,38% no Rio Grande do Norte (BEZERRA et al., 2019), 22,5% no Mato Grosso do Sul (SOUSA et al., 2014) e 25% no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2008a).

A maioria dos gatos positivos pela RIFI, apresentou positividade até a titulação 1:40, corroborando com os achados de Vides et al. (2011) e Leonel et al. (2020), e sugere-se que os felinos poderiam ter uma resposta imune celular predominante (DAY, 2016). Já pelo ELISA, 34% dos nossos animais foram positivos, semelhante a

taxa de 31,5% encontrada por Leonel et al. (2020) mas inferior à taxa de 72,5% encontrada por Alves-Martin et al. (2017), ambos na mesma área de estudo. Em contraste, foi encontrada uma soropositividade de 11,5% no município de Araçatuba-SP, região em que Ilha Solteira está inserida (COSTA et al., 2010).

Pela falta de validação no diagnóstico de *Leishmania* spp. em felinos, a comparação de testes sorológicos acaba sendo limitada pela falta de padrão na metodologia da técnica diagnóstica (PENNISI, 2015a). Apesar dessas técnicas sorológicas apresentarem boa concordância em estudo de LV canina (SILVA, et al., 2014), com nossos gatos, não obtivemos o mesmo resultado, pois foi observada concordância razoável entre RIFI e ELISA ($k=0,2372$).

Assim como foi encontrada baixa concordância entre as técnicas sorológicas e a PCR no presente estudo, outros autores vem verificando a falta de consistência entre a sorologia e as técnicas moleculares para o diagnóstico da LF (MARTÍN-SÁNCHEZ, et al., 2007; CAN, et al., 2016). Alguns autores já admitem não existir correlação entre a infecção por *L. braziliensis* e produção de anticorpos nos gatos, já que a soropositividade provavelmente pode ocorrer na fase final da infecção (SIMÕES-MATTOS et al., 2005). Por meio de inquéritos sorológicos, foi verificado que gatos infectados com *Leishmania* spp. geralmente desenvolvem baixo nível de anticorpos ou são soronegativos (POLI et al., 2002; MÁRTIN-SÁNCHEZ et al., 2007; MAIA et al., 2010). Estes dados corroboram com o nosso estudo, pois três gatos que estavam comprovadamente infectados por *L. infantum*, apresentaram baixa titulação de anticorpos pela RIFI (1:40).

Pennisi et al. (2012), sugeriram utilizar a diluição 1:80 como ponto de corte para a RIFI em gatos, porém nós discordamos, não só pela presença de gatos infectados por *L. infantum* com baixa titulação de anticorpos na RIFI mas aparentemente essas técnicas sorológicas não podem ser sensíveis e confiáveis o suficiente na detecção de LF. Essa falta de padronização das técnicas sorológicas pode subestimar a real prevalência da LF em áreas endêmicas e contribuir para a disseminação da doença (PORTÚS et al., 2002; MAIA et al., 2010).

Estes testes sorológicos possuem alta sensibilidade, mas oferecem pouca especificidade por conta da reatividade cruzada antigênica entre as espécies de tripanossomatídeos (LUCIANO et al., 2009). A soropositividade elevada encontrada no estudo sugere que esses gatos estão em constante contato com os tripanossomatídeos (MATOS et al., 2018), possivelmente pela coabitação com cães

infectados com *Leishmania* spp. (ROCHA et al., 2019), e pela presença de flebotomíneos vetores que eram atraídos pela matéria orgânica produzida pelos animais.

Apesar do estilo de vida e condições de vida não serem considerados fatores de risco para a LF (GIANNAKOPOULOS et al., 2017), em estudos com cães, da mesma área do nosso estudo, revelaram discrepância na taxa de soroprevalência, sendo de 65,7% em animais de abrigo e 13,6% em outras regiões do município de Ilha Solteira (SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2016). Esses abrigos detêm uma grande quantidade de gatos que em sua maioria, estava presa e concentrada em áreas de pequenas dimensões que não possibilitava o comportamento natural, e que de certa forma facilitava a picada do flebotomíneo.

Em relação ao parasitológico direto, dois gatos (2%) apresentaram formas amastigotas sugestivas de *Leishmania* spp. no interior de um macrófago, taxa considerada baixa em comparação com outros inquéritos em gatos, que variaram entre 3,84% a 18,2% (COSTA et al., 2010; COELHO et al., 2011; VIDES et al., 2011). Para este estudo, a PAAF de linfonodo foi a primeira escolha de coleta de amostra, pelo fato de apresentar maior sensibilidade e positividade em relação à medula óssea (COSTA et al., 2010).

Os dois animais positivos no parasitológico direto tinham alterações clínicas, foram positivos na RIFI e ELISA, apresentando os seguintes perfis sorológicos: 1:80/Nível 6 e 1:320/nível 9, e positivos na PCR de sangue, suabe conjuntival e cultura. Em geral, o parasitológico direto é considerado uma técnica rápida, simples, segura e pouco traumática para o animal (LAURENTI, 2009), possui 100% de especificidade, no entanto, em cães com *L. infantum* e assintomáticos, a sensibilidade é inferior a 30% (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). Em gatos domésticos, o parasitológico direto não é comumente utilizado na rotina clínica, apesar de ser frequente no diagnóstico de LV em cães (PENNISI et al., 2015a), mas no presente estudo ele demonstrou ser uma boa ferramenta na detecção de LF, já que apresentou uma boa concordância com a PCR de sangue ($k=0,5588$).

Outro teste parasitológico que utilizamos foi a hemocultura, que apesar de ter uma boa especificidade, apresenta baixa sensibilidade (CHIARI, 1999), e por este motivo, durante a técnica de hemocultura tivemos alguns cuidados, conforme o estudo de Luz (1999). Foi utilizado o meio LIT, separamos o sangue em camadas, demoramos o menor tempo possível entre a coleta do sangue e a inoculação da

amostra e manipulamos rapidamente as amostras de sangue. Entre os problemas encontrados nesta técnica diagnóstica foram: o tempo demandado para o resultado final e a contaminação por fungos e bactérias de algumas amostras, exigindo extremo cuidado no manuseio das amostras (JUNQUEIRA; CHIARI; WINCKER, 1996).

Um total de oito gatos apresentaram formas flageladas sugestivas semelhantes a tripanossomatídeos pela técnica de hemocultura. A porção leucocitária foi a camada em que foram achadas mais formas flageladas, concordando com os resultados obtidos por Luz (1999). A concentração de flagelados na porção leucocitária simplificaria a técnica, já que serão utilizados menos tubos por animal (LUZ, 1999).

A baixa positividade na hemocultura poderia estar relacionada à ação lítica de imunoglobulinas que estão presentes no plasma de pacientes crônicos ou devido à atividade macrofágica dos linfócitos (CHIARI et al., 1989). As estruturas não foram facilmente enxergadas e por isso, não se tinha 100% de certeza se eram tripanossomatídeos. De fato, quando a parasitemia é baixa a visualização em microscópio é dificultada (BRAGA, 2009). A Técnica de visualização de flagelados em meio de cultura é válida, porém não é possível a identificação da espécie do parasita apenas por análise microscópica (CHIARI, 1999).

Já a PCR é uma ferramenta sensível muito utilizada na detecção e caracterização de tripanossomatídeos, especialmente a *Leishmania* spp., em diferentes tipos de tecidos (SCHÖNIAN et al., 2003; BENASSI et al., 2017), no entanto, não existe um alvo de PCR padronizado para o diagnóstico de leishmaniose (KOLTAS, et al., 2016).

Utilizamos os iniciadores L5-8S/LITSR da região ITS-1 e L5-8SR/LITSV da região ITS-2, que amplificam sequências de tripanossomatídeos os quais podem ter variações entre os pares de bases, dependendo da espécie do parasito amplificada (EL TAI et al., 2000; DAVILA; MOMEN, 2002; SCHÖNIAN et al., 2003). Também foi utilizado os iniciadores 13A/13B do kDNA para detecção de espécies de *Leishmania* spp. e é considerada a melhor técnica de detecção deste gênero (KOLTAS et al., 2016).

A confirmação de que se tratava de tripanossomatídeos pela PCR foi verificada em somente dois tipos de cultivos de um mesmo gato, ou seja, de oito hemoculturas positivas, somente duas amostras de um mesmo gato apresentaram fragmentos de DNA. A concordância entre a hemocultura e a PCR de hemocultura foi razoável ($k=0,2081$). Martín-Sánchez et al. (2007) conseguiram detectar parasitos em cultura

de sangue de três animais, mas nenhuma amostra foi positiva pela PCR. Essa baixa taxa de positividade em hemocultura pode ser atribuída ao pequeno volume de sangue de gato inoculado associada à parasitemia baixa da espécie.

Após o sequenciamento genético, foi verificado que as promastigotas encontradas na porção leucocitária e na camada de hemácias, possuíam 100% de identidade com *L. infantum*. Este gato era positivo no exame parasitológico direto, na RIFI com titulação 1:320 e no ELISA, apresentando NE9. Além disso, as amostras de sangue e suabe conjuntival foram positivas na PCR, utilizando os três primers (ITS-1, ITS-2 e 13A/13B), e com sequenciamento genético do DNA de sangue com 100% de identidade com *L. infantum*.

Os outros quatro gatos que foram positivos pela PCR de sangue e no diagnóstico sorológico, apenas um deles apresentou formas sugestivas na hemocultura mas apresentando PCR de hemocultura negativa, ou seja, dos cinco animais positivos pela PCR de sangue, dois apresentaram positividade pela hemocultura. O mesmo ocorreu no estudo de Araújo et al. (2002) com diagnóstico de doença de Chagas em cães, dos animais positivos pela PCR de sangue somente 22% eram positivos pela hemocultura.

Em relação as formas flageladas encontradas nos cultivos que foram negativos pela PCR, todos os gatos, exceto um, eram positivos pela RIFI com titulações que variavam de 1:40 (5) a 1:160 (1). O mesmo aconteceu para o ELISA, todos os animais, exceto um, eram positivos pela técnica com níveis ELISA variando de três a oito. Dois gatos, além de manifestarem sorologia positiva, eram PCR positivos para amostras de sangue, onde um deles apresentou o sequenciamento genético com 86,1% de identidade com *L. major* e o outro animal, o sequenciamento não gerou fita consenso.

Esses animais positivos pela hemocultura, mas negativos pela PCR de hemocultura, provavelmente já tiveram contato com tripanossomatídeos mas apresentaram uma carga parasitária muito baixa no momento da coleta, que não foi detectável pela técnica molecular. Alguns autores evidenciaram o aumento da sensibilidade para o diagnóstico em pacientes crônicos por meio de repetições de hemoculturas (ALBUQUERQUE et al., 1972; LUZ, 1999), desta forma, novas coletas de sangue seriam necessárias para confirmar o diagnóstico.

Dois animais apresentaram protozoários ciliados em cultura de sedimento de hemácias. Provavelmente, esses protozoários eram parasitos de intestino e que de alguma forma, perfuraram a parede intestinal e invadiram a corrente sanguínea. A

presença destes parasitos em ambiente extraintestinal parece ser rara (DHAWAN; JAIN; MEHTA, 2013). Não foram encontrados relatos da presença destas formas em hemoculturas de gato doméstico, portanto, novas análises deverão ser feitas para determinarmos a espécie do parasita.

No diagnóstico por meio de cultura de aspirados de medula óssea e linfonodo, houve crescimento de formas flageladas em amostras de quatro animais. A baixa positividade pode ser atribuída à baixa parasitemia dos animais e a pouca quantidade de amostra obtida pela PAAF (MARODIN, 2011). Pela PCR de cultura de aspirado, duas amostras foram positivas pelo ITS-1, ITS-2 e 13A/13B, e quando sequenciadas, foram detectadas duas espécies de tripanossomatídeos com 100% de identidade com *L. infantum* e *C. fasciculata*. Em relação ao diagnóstico de LF, a concordância entre a cultura de aspirado e a PCR de cultura de aspirado foi razoável ($k = 0,3902$). Dos quatro gatos positivos na cultura de aspirados, só foi confirmada a presença de DNA de *L. infantum* em um animal.

Durante o exame microscópio das duas culturas com tripanossomatídeos, aparentemente as promastigotas de *C. fasciculata* apresentavam flagelo mais curto e um crescimento em cultura rápido, em comparação com as promastigotas de *L. infantum*. A *L. infantum* é uma das sete espécies que já foram identificadas parasitando gatos, e que é comum infectar cães e humanos (PENNISI et al., 2015b).

O animal que apresentou DNA de *C. fasciculata* em cultura de aspirado também apresentou positividade na PCR ITS-1 e 13A/13B de sangue, na PCR 13A/13B de suabe conjuntival, mas com sequenciamento dos amplificadores de PCR de sangue com 100% de identidade com *L. infantum*. Desta forma, obtivemos DNA de dois tripanossomatídeos diferentes em tecidos distintos do mesmo animal.

A *C. fasciculata*, é um tripanossomatídeo monoxenoso, no entanto, Pereira (2016) descreveu pela primeira vez a presença de *C. fasciculata* infectando cães da mesma área do presente estudo. A co-infecção de *Leishmania* spp. com este grupo de tripanossomatídeos já foi relatada em pacientes imunossuprimidos, que apresentaram quadros semelhantes à LV (JIMÉNEZ et al., 1996, PACHECO et al., 1998). Maruyama et al. (2019) identificaram parasitos, que possuíam parentesco próximo à *C. fasciculata*, isolados de um homem com doença semelhante à LV, e que eram refratárias ao tratamento da leishmaniose visceral.

Apesar da *C. fasciculata* ser transmitida por culicídeos, o seu DNA já foi encontrado em flebotomíneos da espécie *Ny. whitmani* (MACHADO et al., 2017). Este

achado pode esclarecer como ocorreu a infecção do gato por *C. fasciculata*, já que esta espécie de flebotomíneo foi encontrada no estudo. Existe a hipótese de que a transmissão ocorreu durante o repasto sanguíneo, onde o parasito sobreviveu no hospedeiro.

Devido a esse curioso achado, enviamos a cepa isolada para caracterização na FIOCRUZ e a espécie encontrada na cultura foi incriminada como *L. major*. No Velho Mundo, a *L. major* causa a leishmaniose cutânea humana e canina (AL-BAJALAN et al., 2018). O primeiro relato de infecção de *L. major* em gatos foi em 2015, na Turquia (PAŞA et al., 2015) e no Brasil, até o momento, só houve relato de infecção em equino (ESCOBAR et al., 2019).

Existe a possibilidade deste gato apresentar mais de uma espécie de tripanossomatídeo, assim como no estudo realizado no Irã, onde 5,4% dos casos clínicos encontrados eram de pacientes imunocompetentes co-infectados por *L. major* e *Crithidia* spp., além de ter paciente com co-infecções de *L. major*, *L. tropica* e *C. fasciculata*, por meio da análise da sequência do gene ITS-rDNA (SPOTIN; ROUHANI; PARVIZI, 2014).

É a primeira vez que foi descrito a presença de *C. fasciculata* em gatos de área endêmica e *L. major* em gatos procedentes do Brasil. Os resultados obtidos abrem a possibilidade de que as infecções podem ser causadas por outras espécies de tripanossomatídeos e as *Leishmanias* estão se adaptando a novas espécies e regiões. No entanto, estas descobertas devem ser analisadas em vários aspectos, mas de modo geral, seria necessário aprimorar as análises experimentais, caracterizar o isolado para investigarmos a presença de co-infecção, e encontrar provas suficientes que sustentem a *C. fasciculata* como um agente patogênico.

Pela PCR de sangue, oito animais foram positivos (8%, 8/100) para DNA de tripanossomatídeos. Destes, cinco apresentaram sequências de DNA com 100% de identidade com *L. infantum*, e em outros dois gatos, foi verificada a presença de DNA que apresentava pelo menos 80% de identidade com *L. major*. A detecção de DNA de *Leishmania* spp. pela PCR em amostras de sangue de felinos apresentou positividade que variou entre 20,3% a 60,7% em estudos na Itália (AYLLÓN et al., 2012), Portugal (MAIA et al., 2010) e Espanha (MÁRTIN-SÁNCHEZ et al., 2007), geralmente a prevalência de infecção por LF varia de 0 a 60,7% em regiões endêmicas (PENNISI et al., 2015b).

Apesar dos gatos apresentarem uma parasitemia no sangue, visto que já foi

provada a infecção de flebotomíneos pelo xenodiagnóstico (MAROLI et al., 2007), alguns estudos sugerem que amostras de sangue total são capazes de detectar um menor número de animais em comparação a outros tecidos, e desta forma, são consideradas inadequadas para detecção de LV em felinos de áreas endêmicas (MORAIS et al., 2013). Ao contrário do que já foi relatado, observou-se que durante a detecção da LV, a PCR de sangue conseguiu detectar mais animais positivos do que a PCR de suabe conjuntival.

Neste estudo a PCR de sangue detectou mais animais positivos do que a cultura de aspirado e parasitológico direto. A PCR é uma técnica que se mostrou sensível na detecção de DNA de *Leishmania*, sendo capaz de amplificar o DNA do parasita a partir de poucos exemplares de amastigotas (SCHÖNIAN et al., 2003; ASSIS et al., 2010). Ao avaliar a concordância da PCR de sangue e os testes parasitológicos, observou-se uma concordância muito boa com cultura de aspirados ($k=0,6512$) e boa com o parasitológico direto ($k=0,5588$), corroborando com os achados de Gomes et al. (2007), onde a concordância entre parasitológico e molecular foi alta (92%).

A PCR de suabe detectou um animal a menos que a PCR de sangue, mas a concordância entre elas foi classificada como excelente ($k= 0,8837$), além disso, ao compararmos a PCR de suabe com o parasitológico direto, a concordância foi considerada muito boa ($k=0,6575$), onde a PCR de suabe foi positiva para os dois gatos que apresentaram formas amastigotas, além de detectarem dois animais a mais.

De acordo com nossas observações a campo, seria muito mais conveniente utilizar suabe na coleta de amostras biológicas, pois é pouco invasiva e mais fácil de coletar. A utilização de suabe conjuntival em felinos pode ser uma alternativa prática e sensível no diagnóstico da LF (BENASSI et al., 2017) e em cães, mostra uma boa sensibilidade (92%) e especificidade (100%) na detecção da LV (STRAUSS-AYALI, et al., 2004) e sua positividade está associada à presença de sinais clínicos em cães (PEREIRA et al., 2016).

A PCR 13A/13B foi a técnica que detectou o maior número de gatos positivos em amostras de suabe ($n=4$). Fato que pode ser justificado por conta da sensibilidade elevada, e que muitas vezes é classificada como o melhor alvo de detecção de *Leishmania* spp. utilizando o kDNA de *Leishmania* spp. (KOLTAS et al., 2016; FERNANDES et al., 2019), sendo sensível o suficiente para detectar kDNA de um

único organismo (RODGERS et al., 1990). Já em cães, a PCR ITS-1 de suabe se mostrou uma técnica muito eficiente na detecção de *Leishmania* (STRAUSS-AYALI, et al., 2004).

Esses resultados contribuem para o conhecimento prévio de que diferentes espécies de tripanossomatídeos podem ser encontradas em gatos de área endêmica e reforça a necessidade de vigilância contínua da população felina nessas áreas. A performance dos testes variou muito, demonstrando a necessidade de uma associação de técnicas diagnósticas, para aumentar os níveis de positividade e contribuir para o melhor controle de doenças.

6.3 REAÇÃO INTRADÉRMICA DE MONTENEGRO

O presente trabalho representa o primeiro estudo realizado em uma área endêmica de LV que examinou 100 gatos para determinar a resposta RIM contra *L. infantum*. Para tanto, foi padronizado uma RIM para detecção da resposta celular de *Leishmania* em gatos. É importante destacar que os gatos aqui estudados pertencem a abrigos de animais, onde a ocorrência de *Lu. longipalpis*, LVC e LF, já foi relatada em estudos anteriores (SPADA et al., 2014; ALVES-MARTIN et al., 2017; FERNANDES et al., 2019; LEONEL et al., 2020).

Com relação à resposta celular, mais da metade da população de gatos neste trabalho foi positiva para a RIM ao antígeno de *Leishmania*, que foi superior aos 15% de cães positivos para RIM da Bahia (BALEEIRO; PARANHOS-SILVA; JULIANA et al., 2006), bem como 9,68% (31/320) e 11,2% (106/946) cães e humanos RIM positivos, respectivamente, ambos em uma área endêmica de LV na Amazônia, Brasil (CRESCENTE et al., 2009; SILVEIRA et al., 2012). Em outro estudo no Maranhão, a taxa de prevalência de infecção em crianças foi de 61,7% (NASCIMENTO et al., 2005) e 26,6% (CALDAS et al., 2001) medida pela RIM.

Em contraste, em um estudo conduzido na região endêmica de LV canina, 81% dos cães da raça Ibizan hound eram RIM positivos, enquanto apenas 48% dos outros cães eram RIM positivos. Assim, os cães da raça Ibizan hound apresentam uma resposta celular mais uniforme à infecção do que os cães de outras raças, o que pode explicar a maior resistência à infecção por *Leishmania* nessa raça (SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

Os gatos estão tão expostos quanto os cães e os humanos ao risco de infecção; no entanto, a resposta celular de gatos contra a infecção por *L. infantum* pode ser mais expressiva do que em cães (DAY, 2016) e pode diferir daquela de cães (PENNISI et al., 2015a). A imunidade protetora contra a leishmaniose é amplamente mediada por células T e está associada à produção de interferon γ (PINELLI et al., 1994); talvez a exposição a parasitos possa estimular o desenvolvimento de mecanismos de proteção imunológica na população felina.

No município de estudo, a frequência de LVC foi estimada em 13,1% por testes moleculares (PEREIRA et al., 2016) a 40,3% por exame parasitológico direto (SILVA et al., 2014), em comparação com os 5% de gatos PCR-positivos e 2% por exames parasitológicos no presente estudo. Essa diferença na resposta imune dessas duas espécies também pode explicar a maior prevalência de LV canina, o que também foi relatado em outros estudos (POLI et al., 2002; OTRANTO et al., 2017) em comparação com gatos.

Até recentemente, relatos de casos de gatos infectados por *Leishmania* spp. eram raros e os felinos eram considerados resistentes à infecção (PENNISI et al., 2015b). A hipótese mais interessante seria que os felinos controlavam geneticamente a resistência imunológica a uma variedade de proteínas salivares imunomoduladoras contidas na saliva dos artrópodes e em seu sistema imunológico competente (DAY, 2011, 2016).

Em relação à resposta humoral, os títulos de anticorpos encontrados nesses animais pela RIFI foram principalmente de 1:40, assim como em outros estudos com gatos (VIDES et al., 2011; LEONEL et al., 2020). A baixa taxa de anticorpos também pode estar relacionada ao fato de os gatos infectados ou expostos não sofrerem de desequilíbrio do estado imunológico (OTRANTO et al., 2017). Isso pode ser devido à resposta imune Th1 eficiente e predominante em gatos quando comparada a cães (DAY, 2016).

A expressão imune RIFI (+) / RIM (+) foi o tipo de resposta felina mais prevalente no presente estudo e sugere que a maioria dos gatos naturalmente infectados na área endêmica desenvolvem respostas celulares e humorais simultaneamente. Alexander; Phillips (1980) mostraram que a cooperação celular ocorre efetivamente com a sinergia entre as respostas imunes celular e humoral, mas esse mecanismo ainda não é preciso (BARBIÉRI, 2006).

Por outro lado, em uma área endêmica, o perfil RIFI (+) / RIM (-) foi o mais

prevalente na expressão imune canina (SILVEIRA et al., 2012). Além disso, o perfil RIFI (+) / RIM (-) foi a expressão imune mais frequente (80%) em gatos que foram positivos pelo parasitológico e PCR, observados aqui. Na LV, indivíduos doentes durante a fase ativa da doença apresentavam depressão da resposta imune mediada pelas células e níveis elevados de anticorpos anti- *Leishmania* (CARVALHO et al., 1981; CARVALHO; BADARÓ, 1985; BADARÓ et al., 1986), o que é consistente com a observação de que gatos PCR-positivos não respondem à injeção intradérmica de antígeno de *Leishmania*. Esse fenômeno também explicaria a baixa concordância entre a RIM e outros métodos diagnósticos usados neste trabalho.

A análise combinada de RIM e RIFI forneceu uma frequência geral de 87%, contrastando com a frequência humana (34,1%) e canina (43%) em uma área endêmica para LV pela análise combinada (CRESCENTE et al., 2009; SILVEIRA et al., 2012). Semelhante ao estudo com cães da raça Ibizan hound (77%), os gatos deste trabalho apresentaram uma taxa de alta frequência da combinação de ELISA e RIM (72%). Se considerarmos que animais com resposta celular ou humoral específica foram infectados, a taxa de infecção é muito alta (SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

A frequência de infecção de gatos aumenta com o uso de RIM para detectar imunidade celular específica para *Leishmania* em comparação com a frequência obtida com outras técnicas (CARDOSO et al., 1998), o que confirma a noção de que a frequência de exposição felina à *Leishmania* é subestimada e que esta espécie provavelmente desenvolve uma resposta imune celular eficiente que diminui o número de casos de LF em comparação com a leishmaniose canina.

Os resultados mostram que a maioria dos animais deste estudo apresentou reação positiva na RIM, o que pode estar associado à resistência a doenças. Sugerindo que gatos de uma área endêmica, uma vez expostos, provavelmente desenvolvem uma resposta celular significativa contra a infecção por *L. infantum*, evitando a progressão da doença. A depressão da resposta imune mediada por células é marcada na LV e, portanto, a maioria dos gatos doentes, PCR e parasitológicos positivos, conforme observado, não responderam à RIM.

7 CONCLUSÕES

- Das sete espécies de flebotomíneos capturadas no estudo, a espécie *Lu. longipalpis* foi a mais frequente;
- Houve uma correlação significativa entre a densidade de flebotomíneos e o aumento da umidade relativa do ar;
- Foi encontrado DNA de *L. infantum* em uma fêmea de *Lu. longipalpis*;
- Os dados hematológicos mostraram uma associação entre infecção por *L. infantum* e trombocitopenia;
- A RIFI foi a técnica diagnóstica que apresentou maior positividade no estudo e a maioria dos gatos infectados por *L. infantum* apresentou baixa titulação por esta técnica;
- Foram encontradas três espécies de tripanossomatídeos em um mesmo gato (*L. infantum*, *C. fasciculata* e *L. major*), detectadas pelo sequenciamento de amostras de DNA de sangue e DNA de cultura de aspirado de linfonodo, e caracterização de espécie pela MLEE de cepa obtida do isolado de aspirado de linfonodo, respectivamente.
- Pelo isolamento e caracterização de espécie por DNA um gato foi positivo para *L. infantum*;
- Pelo sequenciamento de amostras de DNA *L. major* foi detectada em dois gatos de Ilha Solteira;
- No diagnóstico de LV, a PCR de sangue detectou um animal a mais do que a PCR de suabe conjuntival e a concordância entre elas foi classificada como excelente ($k=0,8837$);
- A maioria dos gatos reagiu à RIM, evidenciando uma resposta imune do tipo celular à *L. infantum* em gatos de área endêmica para a LV;
- A maioria dos gatos infectados por *L. infantum*, PCR e parasitológico positivo, não respondeu à RIM, provavelmente por uma depressão da resposta imune celular.

8 REFERÊNCIAS

- AL-BAJALAN, M. M. et al. First identification of *L. major* in a dog in an endemic area of human cutaneous leishmaniasis in Iraq: Molecular and phylogenetic studies. **Parasitology Research**, Berlin, v.117, n.2, p. 585– 590, 2018.
- ALBUQUERQUE, R.D.R. et al. Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, p. 1-15, 1972.
- ALEXANDER, B. et al. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALEXANDER, J.; PHILLIPS, R.S. *Leishmania mexicana* and *Leishmania tropica major*. Adoptive transfer of immunity in mice. **Experimental Parasitology**, New York, v.49, p. 34–40, 1980.
- ALMEIDA, P. S. et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 723-727, 2010.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, San Francisco, v.7, n.5, e-35671, 2012.
- ALVES, A. S. et al. Evalution of sereological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. **Research in Veterinary Science**, London, v.93, n.3, p. 1329-1933, 2012.
- ALVES-MARTIN, M. F. et al. Detection of *Leishmania* spp. using parasitological, serological and molecular assays in asymptomatic and sick cats from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v.7, n.11, p.659-64, 2017.
- ALVES, M. L. Ocorrência da leishmaniose visceral em cães e gatos em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP. 2016. 111 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal)** – Departamento de Biologia e Zootecnia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/138242>>
- ANDRADE-FILHO, J. D. et al. Flebotomíneos do Estado de Tocantins, Brasil (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 4, p. 323-329, 2001.
- ARAÚJO, F. M. G. et al. Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. **Acta Tropica**, Basel, v.81, p.21-31, 2002.

ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.19, n.1, p. 17-25, 2010.

AYLLÓN, T. et al. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 12, n.12, p.143-150, 2012.

BADARÓ, R. et al. *Leishmania donovani*: An opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. **Lancet**, London, n. 327, p. 647–649, 1986.

BALEEIRO, C.O., PARANHOS-SILVA, M., JULIANA, C. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, 21–28, 2006.

BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 481-487, 2004.

BARATA, R. A. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, n.5, p. 421-425, 2005.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 62, p. 329–337, 2006.

BASSO, M.A. et al. Successful treatment of feline leishmaniasis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, London, v.2, n. 1, 2016.

BAUM, M. et al. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 143, p.8-12, 2015.

BENASSI, J.C. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, New York, v.177, p.93-97, 2017.

BENASSI, J. C. et al. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n.6, p. 1058-63, 2018.

BEZERRA, J.A.B. et al. Serological and molecular investigation of *Leishmania* spp. infection in cats from an area endemic for canine and human leishmaniasis in Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n.4, p. 790-796, 2019.

BORGHESAN, T. C. **Diversidade e filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros**. 2013. 51 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/T.42.2013.tde-03062014-105719. Acesso em: 2020-03-20.

BRAGA, A. R. C. Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para Leishmaniose. 165 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: [s.n.], 2006. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: [s.n.], 2014. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília [s.n.], 2017. 189 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar Americana: Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – 2007 a 2017 - São Paulo**. 2019. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgiexe?sinanet/cnv/ltaspdef>. Acesso em: 23 de junho de 2020.

BREGANÓ, J. W. et al. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p.257-264, 2003.

BRYCESON, A.D.M. Immunological aspects of clinical leishmaniasis, in: **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, London, p. 1056–1060, 1970.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004.

CALDAS, A.J.M. et al. Infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luis- MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, p. 445–451, 2001.

CAMARGO, E.P. *Phytomonas* and other Trypanosomatids parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**, London, v. 42, p. 29-112, 1998.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of

Trypanosoma cruzi in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 8, p. 227-234, 1966.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-Reactivity in Fluorescence Tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* Antibodies. A Simple Inhibition Procedure to Ensure Specific Results. [American Journal of Tropical Medicine and Hygiene](#), Baltimore, [v.18, n. 4](#), p. 500 – 505, 1969.

CAN, H. et al. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. **Experimental Parasitology**, New York, v. 167, p. 109-114, 2016.

CARDIM, M. F. M. et al. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.50, n.48, 2016.

CARDOSO, L. et al. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.174, p.37–42, 2010.

CARDOSO, L. et al. Use of a *leishmanin* skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Veterinary Journal**, London, v. 79, p. 213–220, 1998.

CARVALHO, E.M.; BADARÓ, R. Absence of Gamma Interferon and Interleukin 2 Production during Active Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 2066–2069, 1985.

CARVALHO, E.M.; TEIXEIRA, R.S.; JOHNSON, W.D. Cell-Mediated Immunity in American Visceral Leishmaniasis: Reversible Immunosuppression During Acute Infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 33, p. 498–502, 1981.

CARVALHO, G.M.L. et al. Bloodmeal Identification in Field-Collected Sand Flies From Casa Branca, Brazil, Using the Cytochrome b PCR Method. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 54, n. 4, p. 1049–1054, 2017.

CHANIOTIS, B.N. The Biology of California Phlebotomus (Diptera: Psychodidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 4, n. 2, p. 221–233, 1967.

CHATZIS, M. K. et al. Evaluation of clinicopathological abnormalities in sick cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Helyion**, Maryland Heights, v. 6, n. 10, 5p., 2020.

CHIARI, E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 299-300, 1999.

CHIARI, E. et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.22, n.1, p. 19-23, 1989.

CHICHARRO, C.; ALVAR, J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.97, n.1, p.75-78, 2003.

COELHO, W.M.D. et al. Detecção de coinfeções por *Leishmania (L.) chagasi*, *Trypanosoma evansi*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.29, n.3, p. 169-174, 2013.

COELHO, W.M.D. et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: Case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 256–258, 2010.

COELHO, W.M.D, et al. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 176, n.2-3, p.281-282, 2011.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984.

COLMENARES et al. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 32, p. 229-233, 1995.

CORREDOR, A. et al. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, n.2, p. 195, 1989.

COSTA, T.A.C. et al. Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 213–217, 2010.

CRESCENTE, J.A. et al. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, p. 1250–1256, 2009.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v.89, p.17-23, 1995.

CVE (Centro de vigilância epidemiológica), Leishmaniose Visceral Americana Humana. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação no Estado de São Paulo, 2016 a 2018**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/> . Acesso em: 13 de janeiro de 2020.

DAVILA, A.M.; MOMEN, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, Liverpool, v. 94, p. 651-654, 2002.

DAY, M.J. Cats are not small dogs: is there an immunological explanation for why cats are less affected by arthropod-borne disease than dogs? **Parasites & Vectors**, London, v.9, n. 507, 2016.

DAY, M.J. The immunopathology of canine vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, p. 1–13, 2011.

DE BRUJIN, M. H.; BARKER, D. C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v.52, n.1, p, 45-58, 1992.

DE PITA-PEREIRA, D. et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Transactions of Royal Society and Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 99, p. 905-913, 2005.

DHAWAN, S., JAIN, D., MEHTA, V. S. *Balantidium coli*: an unrecognized cause of vertebral osteomyelitis and myelopathy. **Journal of Neurosurgery**, Charlottesville, v.18, n.3, p. 310–313, 2013.

DIAS, E.S. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, n. 1, p. 49-52, 2007.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 1373-1380, 2003.

DOMINIQUEZ, M.; TORANO, A. *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. **Parasite Immunology**, Oxford, v.23, p. 259-265, 2001.

EL TAI, N.O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n. 94, p. 1–5, 2000.

ESCOBAR, T. A. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. in Brazilian cross-border south region mammalian hosts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.67, 2019.

FAM, A. L. P. D. et al. Alterações no leucograma de felinos domésticos (*Felis catus*) decorrentes de estresse agudo e crônico. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, Curitiba, v.8, n.3, p. 299-306, 2010.

FELDMAN, B. F.; ZINKI, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm'S Veterinary Hematology**. 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 1344p.

FELICIANGELI, M.D. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in Northern Venezuela: III. Seasonal fluctuation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, 167-176, 1987.

FERNANDES, M.A. et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 194–202, 2019.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica IV. Psychodidae: Phlebotominae**, Leishmaniose e Bartonelose. Edgar Blucher Ltda, São Paulo., p. 658, 1973.

FREITAS, J. C. C. et al. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n.1, p. 24-29, 2012.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas**. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo. 132p, 2018. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.31, n.4, p. 378-90, 1997.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. Canine visceral leishmaniasis in the Metropolitan Area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, 10p., 2017a.

GALVIS-OVALLOS, F. et al. Ecological parameters of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis* complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. **Parasites & Vectors**, London, v.10, n.1, p. 1-9, 2017b.

GENARO, O. et al. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.23, n.2, p.121., 1990.

GIANNAKOPOULOS, A. et al. Molecular investigation and geographical distribution of *Leishmania* spp. infection in stray and owned cats (*Felis catus*) in Thessaly, central Greece. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, Thessaloniki, v. 68, n.1, p. 27–34, 2017.

GODFREY, H.P.; GELL, P.G.H. Cellular and Molecular Events in the Delayed-Onset Hypersensitivities. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, Berlin, v.84, p.1–92, 1978.

GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.144, p. 234-241, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 01, p. 71-80, 2003.

GONZÁLEZ, E. et al. Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. **Acta Tropica**, Basel, v. 171, p. 68-73, 2017.

GOOGLE EARTH MAPAS. [Http://mapas.google.com](http://mapas.google.com). Consulta realizada em 05/03/2016.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, New York, v.35, p.1169-1180, 2005.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n.159, 2016.

INVERSO, J. A.; MEDINA-ACOSTA, E.; O'CONNOR, J.; RUSSEL, D. G.; CROSS, G. A. M. *Crithidia fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface proteinase (gp63) gene homologue. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 57, n.1, p. 47-54, 1993.

JIMÉNEZ, M. I. et al. HIV co-infection with currently non-pathogenic flagellate. **Lancet**, London, v. 347, n.8996, p. 264-265, 1996.

JOHN S.W. et al. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 192, p. 408-408, 1991.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of North-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.90 p. 129-132, 1996.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. Ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.

KELLY, D.W.; DYE, C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Animal Behaviour**, London, v. 53, n.4, p. 721-731, 1997.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly and transmission of leishmaniasis by bite. In: INTERNACIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002. Sevilla. **Proceeding**. Sevilla, p. 57-68, 2002.

KIRKPATRICK, C.E.; FARRELL, J.P.; GOLDSCHMIDT, M.H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, New York, v. 58, n. 2, p. 125-131, 1984.

KOLTAS, I. S. et al. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 164, p.43-48, 2016.

LAFLAMME, D. Development and Validation of a BCS for cats: A clinical tool. **Feline Practice**, Santa Barbara, v. 24, p. 13–18, 1997.

LAHIRI D.K.; NURNBERGER J.I. JR., A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, p. 5444-5444, 1991.

LANA, R. S. et al. Phlebotomine sand fly fauna and *leishmania* infection in the vicinity of the serra do cipó national park, a natural brazilian heritage site. **Biomed Research International**, Hindawi, v. 2015, 9 p., 2015.

LANDIS J. R.; KOCH G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Arlington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LAURENTI, M. D. **Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina**. BEPA, Boletim epidemiológico paulista (Online), São Paulo, v. 6, n. 67, 2009. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180642722009000700002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 26 set. 2020.

LEMESRE J. L. et al. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. **Acta Tropical**, Inglaterra, v. 45, n. 2, p. 99-108, 1988.

LEONEL, J.A.F. Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo. **(Dissertação) Mestrado em Ciências** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

LEONEL, J.A.F. et al. Leishmaniasis in cat shelters: A serological, molecular and entomological study. **Transboundary and Emerging Diseases**, p.1-7, 2020.

LIMA, V. M. F. et al. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 215-218, 2005.

LINS, R.M. et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 11, p.117-122, 2002.

LUCIANO, R. M. et al. Cross reaction evaluation of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antigens in dogs' serologic response by indirect immunofluorescence test (IIF). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.46, p.181-187, 2009.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 84-95, 1912.

LUZ, Z. M. P. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, p. 295-298, 1999.

MACHADO, T. D. O. et al. The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential *Leishmania* spp. vectors in the Brazilian savanna. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.112, n.10, p. 681-691, 2017.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.

MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.174, p.336-340, 2010.

MAIA, C. et al. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. **Parasites and Vectors**, London, v.8, n.173, 10p., 2015.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MARCONDES C.B. et al. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, p. 353-355, 2005.

MARODIN, N. B. Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana Distrito Federal. 69 f. **Tese (Doutorado em Saúde Animal)** - Universidade de Brasília, 2011.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.27, n.2, p.123-147, 2013.

MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n.3-4, p.267-273, 2007.

MARUYAMA, S. R. et al. Non-*Leishmania* Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.25, n.11, p.2088-2092, 2019.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MATOS, A. M. R. N. et al. Antibodies anti-trypanosomatides in domestic cats in Paraná: who is at highest risk of infection? **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v.27, n.2, p.232-236, 2018.

MAYRINK, W. et al. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 73, p.385–387, 1979.

MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W.B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological reviews**, Washington, v. 44, n. 1, p. 140-173, 1980.

MENDONÇA, I. L. et al. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 280, 2020.

MICHALSKY, E. M. et al. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n.5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M. et al. Phlebotominae distribution in Janaúba, na area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, n.1, p. 56-61, 2009.

MONTENEGRO, J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. **Archives of dermatology and syphilology**, Chicago, v.13, p.187–194, 1926.

MORAIS, R. C. S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam v. 59, p. 473-481, 2013.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 68-75, 1993.

MUNIZ, L. H. G. et al. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo , v. 40, n. 6, p. 1087-1093, 2006.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, 2005.

NASCIMENTO, M.D.S.B. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, p. 1801–1807, 2005.

NAVARRO, J.A. et al. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.143, p.297–302, 2010.

NUNES, V. L. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 446-451, 2008.

OGUSUKU, E. et al. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru, **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 88, n. 3, p.329-335, 1994.

OLIVEIRA, A.G. et al. Aspectos Ecológicos de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Área Endêmica de Leishmaniose Visceral, Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 49, n. 1, p. 43–50, 2012.

OLIVEIRA, G. M. G. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-amazonense de Saúde**, Anannindeua, v. 1, n. 3, p. 83-94, 2010.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N. et al. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural por *Leishmania* sp em flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) na região amazônica do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n.6, p.540-543, 2006.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. Study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v.17, n.1, p.7–11, 2008.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 220–222, 2015.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. Leishmaniose felina no Brasil. In: MELCHIOR, et al. **Atualidades em medicina tropical no Brasil: veterinária**. Rio Branco: Stricto Sensu, 2020. Cap. 7, p. 126–144.

OTRANTO, D. et al. Veterinary Parasitology Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 236, p. 144–151, 2017.

PACHECO, R. S. et al. Causing Opportunistic Infection in an HIV Positive Patient. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, N.4, P.531-537, 1998.

PAIVA, B.R. et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. **Acta Tropica**, Basel, v. 99, n.2-3, p. 252–259, 2006.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; SILVA, C.G.R.; GOMES, Y.M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.16, n.4, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniasis**. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

PAŞA, S. et al. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 212, p.389-392, 2015.

PATERNITA et al. Evidence for anthrophophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. **Acta Tropica**, Basel, v.153, p. 86-92, 2016.

PAULAN, S. C. et al. Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 765-774, 2012.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.D.Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p.1–13, 1996.

PENHA, T. A. et al. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área endêmica de leishmaniose visceral canina na região metropolitana de São Luís – MA, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 26, n.2, p. 121-127, 2013.

PENNISI, M. G. An update on feline leishmaniosis in Europe. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 23, n. 2, p.20-27, 2013.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, p. 35-47, 2015a.

PENNISI, M. G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-28, 2015b.

PENNISI, M.G. et al. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. **Journal Feline Medicine and Surgery** London, v.14, p.656–7, 2012.

PENNISI, M. G. et al. Case report of leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 28, suppl.1, p. 363-366, 2004.

PEREIRA, V. F. et al. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 49, n. 1, p.104-106, 2016.

PEREIRA, V. F. Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam cães em área endêmica para leishmaniose visceral canina. 79f. **Tese (Doutorado em Ciências)** -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PERSICHETTI, M.F. et al. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p.e119, 2017.

PINELLI, E. et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, p. 229–235, 1994.

PODLIPAEV, S. A. New species of lower trypanosomatids from the Heteroptera families Gerridae and Nabidae: their life cycle stages in nature and in culture. **Proceedings of the Zoological Institute RAS**, v.129, p. 35-47, 1985.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study- the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, New York, v.31, n.5, p.648-652, 2001.

POLI, A. et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, 181–191, 2002.

PORTÚS, M. et al. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). **Revista iberica de parasitologia**, Granada, v. 62, p. 72-76, 2002.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

R CORE TEAM: a language and environment for statistical computing, Vienna: R foundation for statistical computing, 2020. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

REINHOLD-CASTRO, K. R. et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n.3, p. 269-276, 2008.

RESENDE, M. C. D. et al. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n.1, p. 51-55, 2006.

ROCHA, A. V. V. O. et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 273, p. 80–85, 2019.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v.3, n.71, p.267-275, 1990.

RODRÍGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 3, n. 9, p. 2246–2252, 1994.

ROSS R. Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, Londres, v.2, n.2237, p. 1261-1262, 1903.

RÜFENACHT et al. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **Veterinary Record**, London, v.156, n. 17, p.542-545, 2005.

SALES, K. G. S. et al. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. **Parasites & Vectors**, London, v.8, n.230, 2015.

SARAIVA, L. et al. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n.1, p. 56-63, 2006.

SARAIVA, L. et al. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum* chagasi in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 46, n.5, p. 1159-1163, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.1, p.82-86, 2005.

SAVANI, E.S.M. et al. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n.1-2, p. 18-24, 2009.

SAVANI, E. S. M. et al. Ocorrência de co-infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 739-741, 2005.

SCHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 349-358, 2003.

SERGEANT, E., LOMBARD, J., QUILICHINI, M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**, v. 5, p.93–98. 1912.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control – review articles. **Journal of Vector Borne Diseases**, New Delhi, v. 45, p. 255-272, 2008.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). **Transactions of**

the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 66, p. 709-717, 1972.

SHIMABUKURO, P.H.F.; DE ANDRADE, A.J; GALATI, E. A. B. Checklist of American sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Genera, species, and their distribution. **Zookeys**, v. 660, p. 67–106, 2017.

SHIMABUKURO, P.H.F.; GALATI, E.A.B. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropical**, Campinas, v. 11, p.685–704, 2011.

SILVA, A. V. et al. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, Inglaterra, v. 105, n. 1, p. 92-94. 2008a.

SILVA, D.T. Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. 120f. **Tese (Doutorado em Ciências)** -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

SILVA, D. T. et al. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 17-25, 2014.

SILVA, E. A. et al. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental Parasitology**, New York, p. 119, p. 343-348, 2008b.

SILVA, S.M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, p.150–154, 2010.

SILVEIRA, F.T. et al. A cross-sectional study on canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v.111, p. 1513–1522, 2012.

SILVEIRA-NETO, L. et al. Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.3, p.1467–1480, 2015.

SIMÕES-MATTOS, L. et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 199-208, 2005.

SOBRINO R. et al. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 3-4, p. 198-203, 2008.

SOKAL, J. E. Measurement of delayed skin test responses. **New England Journal of Medicine**, Nova Inglaterra, v. 293, p. 501-502, 1975.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.102, p.163–166, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.130, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, London, v.4, n.86, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 1-2, p. 37–45, 2000.

SOUSA, K.C.M. et al. Serological detection of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* in cats from an area endemic for leishmaniasis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 4, p. 449-455, 2014.

SOUZA, A. L. et al. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

SOUZA, M. D. C. et al. Mechanism of Acquired Immunity Induced by “*Leptomonas pessoai*” against *Trypanosoma cruzi* in Mice. **Journal of Protozoology**, New York v. 21. n.4, p. 579–584, 1974.

SOUZA, W.J.S.; SABROZA, P.C.; SANTOS, C.S. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro , Brazil : an indicator of transmission risk. **Acta tropica**, Basel, v. 52, p. 111–119, 1992.

SPADA, J.C.P. et al. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) and canine visceral leishmaniasis in a rural area of Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, p. 456–462, 2014.

SPOTIN, A.; ROUHANI, S.; PARVIZI, P. The Associations of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* Aspects by Focusing Their Morphological and Molecular Features on Clinical Appearances in Khuzestan Province, Iran. **Biomed Research International**, Hindawi, v.2014, 13p., 2014.

STEUBER, S.; et al. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 97, n.3, p. 247-54, 2005.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1729-1733, 2004.

TENÓRIO, M. S. et al. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoo And Wildlife Medicine**, Yulee, v. 42, n. 4, p. 608-616, 2011.

TEODORO, U. et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 242-249, 1993.

TERRAZANO, G. et al. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 110, p. 331-337, 2006.

TONELLI, G.B. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 12, n.12, 2017.

VEXENAT, A.C. SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. RL. Reatividade cruzada de anticorpos em infecções humanas pelo protozoário cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VIDES, J.P. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 22-28, 2011.

VIOTI, G. Xenodiagnóstico em gatos domésticos (*Felis catus*) naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. 62 f. **Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. doi:10.11606/D.10.2020.tde-04082020-162738. Acesso em: 2021-02-18

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT A. Enzyme-linked immunoassorbent assay, p.359-371. In: Rose N. & Friedman H. (ed.) **Manual of Clinical Immunology**. American Society for Microbiology, South Carolina: American Society for Microbiology, 1980, 932 p.

WALLACE, F.G. et al. Guidelines for the Description of New Species of Lower Trypanosomatids. **The Journal of Protozoology**, New York, v.30, n.2, p. 308-313, 1983.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, New York, v.18, n.1, p-124-193, 1966.

WECK, A.L. **Delayed-type hypersensitivity**, in: Encyclopedia of Immunology, p. 738–742, 1998.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous

leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 601-606, 2002.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n.5, p. 851-855, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva, 191p., 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 Acesso em: 25 de novembro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> .Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported Data by country**. 2021b. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en> .Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

XIMENES, M. F. F. M. et al. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. 427-432, 1999.

XIMENES, M. F. F. M. et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e Leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil - Reflexos do Ambiente Antrópico. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 128-137, 2007.

ZIJLSTRA, E.E.; EL-HASSAN, A.M., Leishmanin and tuberculin sensitivity in leishmaniasis in the Sudan, with special reference to kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.87, p.425–427, 1993.

9 APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Seu (s) felinos (s) está (ão) sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa. O Sr. (Sra.) como responsável pelo animal (is), após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do professor responsável. Em caso de recusa o Sr. (Sra.) não será penalizado de forma alguma.

Título da pesquisa: Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral

Nome do pesquisador responsável: Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

1. **Natureza da pesquisa:** o Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu (s) animal (is) nesta pesquisa com a finalidade de detectar tripanossomatídeos em felinos.

2. **Envolvimento da pesquisa:** ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o pesquisador utilize o soro sanguíneo do animal, sangue e suabe conjuntival e oral retirado por veterinários capacitados, para realizar exames laboratoriais. Além disso, será realizada a reação intradérmica de Montenegro. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal.

3. **Sobre os dados necessários:** identificação do proprietário e do(s) animal(is) e data da coleta da amostra.

4. **Riscos e desconforto:** Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Conselho Nacional no Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008, não oferecem riscos e causam muito pouco desconforto aos animais.

5. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados individuais dos animais.

6. **Benefícios:** esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a existência de tripanossomatídeos em felinos e nos comprometemos a divulgar os resultados obtidos no meio científico.

7. **Pagamento:** o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Consentimento da participação do Animal

Eu, _____,

RG: _____, CPF _____, abaixo assinado responsável, permito que meu (s) felino (s) participe (em) do estudo: Identificação e caracterização de tripanossomatídeos que infectam gatos domésticos (*Felis catus*) de área endêmica para leishmaniose visceral.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação do animal na pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve à qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data:

Nome:

Assinatura do responsável:

Endereço:

Bairro:

CEP:

Cidade:

Telefone:

APÊNDICE 2 – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses Doutoranda Maria Luana Alves		
<u>FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS</u>		
Gato nº:		
Data da coleta:	Local:	
Sexo: () Macho () Fêmea	Pelagem: () Curta () Longa	
Características:		
<u>SCORE CORPORAL</u>
<u>SINAIS CLÍNICOS</u> () NÃO () SIM	<u>QUAIS?</u> () Caquexia () Linfonodo hipertrofiado () Lesões de pele () Rosto () Orelha () Corpo () Lesões oculares () Alopecia () Mucosas hipocoradas Outros:	<u>FOTOS:</u>

APÊNDICE 3 – MEIO LIVER INFUSION TRYPTOSE (LIT)

LIT (250 mL)

1) Dissolver em 100 mL de H₂O destilada em Kitassato (de 500 mL):

Na₂HPO₄.....2 g
 NaCl.....1 g
 KCl.....0,1g

2) Adicionar mais 44,5 mL de H₂O destilada ao Kitassato e fazer a montagem do filtro, conforme a figura abaixo:

3) Após autoclavar todos os materiais necessários, secá-los em estufa (60°C) overnight.

4) Na manhã seguinte, descongelar o soro fetal bovino

5) Colocar todos os materiais em luz UV (15 minutos) e iniciar os procedimentos abaixo:

6) Em um Erlenmeyer, dissolver 0,75 g de infusão de fígado em 100 mL de H₂O destilada aquecida.

* A água aquecida deve estar na temperatura que o dorso da mão suporte

7) Adicionar a esta solução (suspensão):

Dextrose.....0,5 g
 Triptose.....1,25 g

8) Ajustar o pH para 7,4

Base: 50mL de H₂O + 2,83g de Na₂HPO₄

Ácido: 50mL de H₂O + 2,39g de NaH₂PO₄

9) Adicionar 2,5 mL do pentabiótico

- 10) Quando a temperatura do kitassato diminuir de modo que o dorso da mão suporte, acoplar a bomba de vácuo e iniciar a filtração. Além disso, deve-se envolver o local onde a mangueira e a extremidade lateral do kitassato se une com um algodão embebido de álcool.
- 11) Ligar a bomba de vácuo a uma pressão de 300-400 mmHg e colocar a suspensão na parte superior do filtro para ser filtrada
- 12) Após a filtração, adicionar 5,5 mL de hemoglobina 2,2%
- 13) Homogeneizar o meio e deixar os materiais na luz UV (15 minutos)
- 14) Adicionar 30 mL de soro fetal bovino
- 15) Com a proveta, distribuir 5 mL de meio LIT em cada tubinho. Lembrando de fazer os tubinhos BHI inicial e final.
- 16) Manter todos os tubinhos com LIT sob controle de esterilidade (48 horas- 37°C)
 - * Meio claro com precipitado= ótimo/ Meio turvo e com pontos brancos= contaminado
- 17) Manter o meio LIT em geladeira (4°C) e a validade é de aproximadamente 1 mês.

RECEITA PENTABIÓTICO (Zoetis 1200000 UI- 1,7g):

Se basear na quantidade de Estreptomicina, por que ela é mais estável.

10000 µg-----1 mL
10 mL-----100000 µg

1,7g-----250mg
x-----100 mg

$x = 170/250 = 0,68\text{g ou } 680\text{mg}$

Portanto, a solução mãe será de 0,68 g ou 680mg do pentabiótico + 10 mL de água destilada

Colocar 1mL da solução mãe para cada 100mL de meio de cultura

APÊNDICE 4 – RELATÓRIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIE

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

LPL/LRNTL/CLIOC

**RELATÓRIO DE ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE LEISHMANIA
POR ELETROFORESE DE ENZIMAS**

Solicitação (s) nº: 009/2019

RE 008/2019

Solicitante: Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

Endereço Completo: Av. Duque de Caxias Norte, 225 - Jardim Elite

Data da entrada da amostra na CLIOC: 08/08/2019 Data da liberação do resultado: 04/11/2019

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
ISOLADO GATO 102 01/2019	158/19	Cultura	Leishmania major	3773

Obs:

Enzimas ensaiadas:

ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
☐	☐	☐	☒	☐	☒	☐	☐	☐
IDH	IDH	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) segundo protocolo descrito em Cupólio et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio:

Arquivo de ensaio isoenzimático 010 (NP) / 2019 (ANO)

Solicita-se a citação, na seção de metodologia, da "Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC" nos projetos científicos, teses, dissertações e artigos publicados, em função da utilização das amostras de Leishmania doadas por esse laboratório/coleção. Favor acessar <http://olico.fiocruz.br>, menu SERVIÇOS, para dados completos da citação.

A CLIOC informa que a amostragem enviada e a veracidade das informações associadas são de total responsabilidade do depositante/cliente.

Camila Patrício Braga Filgueira

Responsável LRNTL/CLIOC

Rio de Janeiro, 04 de novembro de 2019

Av. Brasil, 4.365 Marquês de São Paulo – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-360 – Brasil
Prédio Leônidas Deane, 5º andar – salas 509,502; 1º andar – sala 116
Tel.: (055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 – Fax: (055) (21) 3865-8195