



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

BRENDA FERNANDA SODRÉ MORENO

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania sp. EM GATOS DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

São Luís - MA
2017

BRENDA FERNANDA SODRÉ MORENO

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania sp. EM GATOS DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Pereira da Costa

São Luís - MA
2017

Moreno, Brenda Fernanda Sodré.

Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos de uma área endêmica para leishmaniose visceral / Brenda Fernanda Sodré Moreno. – São Luís, 2017.

46f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa.

1. Leishmaniose felina. 2. Sorologia. 3. São Luís. 4. Maranhão.
I. Título.

CDU 636.8:616.993.161(812.1)

BRENDA FERNANDA SODRÉ MORENO

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
Leishmania sp. EM GATOS DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE
VISCERAL**

Monografia de Graduação defendida e aprovada em: ____/____/____ pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Professora Dr.^a Andréa Pereira da Costa - UEMA
Mestrado em Ciência Animal/CCA/UEMA
Orientadora

Professor Dr. Francisco Borges Costa - UEMA
1º examinador

Professora Dr.^a Solange de Araújo Melo - UEMA
2º examinador

À minha mãe, Maria Antonia, ao meu pai,
Alberto (*in memoriam*), à minha irmã Alcione
e ao meu tio Jeovã, por serem a razão da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por ter me dado saúde e forças para que eu chegasse até aqui.

À mãe, Maria Antonia, por todo o amor, incentivo e apoio que sempre me deu, sem a senhora eu não teria conseguido chegar até aqui.

À minha irmã, Alcione Sodré, por toda a força dada ao longo da minha graduação, eu agradeço muito.

À minha madrinha, Louizianne Beckman, por todo o carinho e acompanhamento que me foi dado.

Agradeço à Carlos Alberto da Silva pela amizade e por sempre ter me encorajado quando pensei em desistir.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa, pela oportunidade, pela paciência, por todos os ensinamentos e por ter me guiado no decorrer deste trabalho.

Meu muito obrigada a Dra. Vivian, Ana Vitória Oliveira, Lygia Galeno, Renata Passos, Leandro Macêdo e ao Prof. Dr. Francisco Borges da Costa por terem me ajudado durante as coletas.

À toda a equipe do Hospital Universitário Veterinário da UEMA, do Laboratório de Imunodiagnóstico e do Laboratório de Parasitologia, onde este trabalho foi desenvolvido.

Às minhas amigas, Lygia e Andressa, pela amizade e companheirismo ao longo da graduação.

Às amigas Arlene dos Santos e Luciana Bastos por todo incentivo e por sempre estarem dispostas a me ajudar.

Aos colegas de turma, pelos bons momentos compartilhados, em especial à Thainara Freitas, Walkyria Fonseca, Douglas Marinho e Rodrigo Fucuta.

Agradeço ainda à Profa. Dra. Solange de Araújo Melo, ao Prof. Dr. Francisco Borges da Costa por aceitarem fazer parte da minha banca e pelas considerações feitas e ao Prof. Dr. Daniel Praseres Chaves por ter aceitado ser o meu suplente e sempre se mostrar disposto a ajudar quando é solicitado.

E por fim, agradeço a todos que não citei aqui, mas que contribuíram de alguma forma com este trabalho. Muito obrigada!!!

“É preciso se expor sem medo de dar vexame. É preciso colocar o trabalho na rua. É preciso saber ouvir um não e, depois de secar as lágrimas, seguir batalhando. Arriscar, é o nome do jogo. Muitos perdem, poucos ganham. Mas quem não tenta, não tem ao menos o direito de reclamar”.

RESUMO

As leishmanioses são doenças de grande impacto na saúde pública e de importância mundial que acomete o homem, animais silvestres e domésticos, sendo transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, e tendo o cão como o seu principal reservatório doméstico. Contudo, nos últimos anos, têm-se observado o aumento do número de casos de leishmaniose em gatos provenientes de áreas endêmicas, sugerindo que esta espécie já não pode ser considerada um hospedeiro acidental de *Leishmania* sp. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência da exposição por *Leishmania* sp. em gatos de uma área endêmica para leishmaniose visceral e sua associação com fatores de risco, a fim de conhecer o papel dos gatos como um reservatório do parasita nessa área. Foram amostrados 80 gatos provenientes do município de São Luís – MA, sendo estes avaliados por meio de exame clínico, pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e aplicação de questionários aos proprietários. Do total de gatos amostrados, 21 (26,25%) foram soropositivos para *Leishmania* sp., com títulos que variaram de 40 a 2560. As variáveis que se mostram estatisticamente significativas com a soropositividade dos gatos deste estudo foram o acesso à rua, a castração, o manejo ambiental e a coabitação com cães positivos para leishmaniose. Dessa forma, levando-se em consideração a ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos detectados neste estudo, faz-se necessário alertar a comunidade veterinária de que a leishmaniose felina é um diagnóstico diferencial a ser levado em consideração na avaliação clínica de um gato e que é fundamental a adoção de medidas profiláticas para preservar a saúde animal e a saúde pública.

Palavras-chave: Leishmaniose felina. Sorologia. São Luís. Maranhão.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases of great impact and world importance on public health that affects the man, also wild and domestic animals. It is transmitted by the phlebotomine of the genus *Lutzomyia* and *Phlebotomus*, and it has the dog as its main domestic host. However, in recent years, there has been an increase in the number of cases of leishmaniasis in cats from endemic areas, suggesting that this species can no longer be considered an accidental host of *Leishmania* sp. The following study aimed to investigate the occurrence of exposure by *Leishmania* sp. in cats from an endemic area for visceral leishmaniasis and its association with risk factors, in order to know the role of cats as a reservoir of the parasite in that area. Eighty cats from the city of São Luís – MA were sampled. Besides, those cats were evaluated by means of clinical examination, the search for anti-*Leishmania* sp. antibodies, which used the Indirect Immunofluorescence Reaction (IFR) and application of questionnaires to owners. Of the total cats sampled, 21 (26.25%) were seropositive for *Leishmania* sp., with titles ranging from 40 to 2560. The variables that are statistically significant with the seropositivity of cats in this study were street access, castration, environmental management and cohabitation with dogs positive for leishmaniasis. Thus, taking into account the occurrence of *Leishmania* sp. detected in cats through this study, it is necessary to alert the veterinary community that feline leishmaniasis is a differential diagnosis which has to be taken into account in the clinical evaluation of a cat, and it is also necessary the adoption of prophylactic measures to preserve animal and public health.

Key-words: Feline leishmaniasis. Serology. São Luís. Maranhão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp. em gatos	28
Tabela 2 - Resultados da análise univariada (teste exato de Fisher) para a associação entre variáveis independentes com os resultados sorológicos de gatos domésticos, analisados através de RIFI.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
CBT	Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
et al	Colaboradores
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
km²	Quilômetro quadrados
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
m	Metro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MS	Ministério da Saúde
NUGEO	Núcleo Geoambiental
O	Oeste
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade de significância
PAHO	Pan American Health Organization
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
S	Sul
sp.	Espécie
spp.	Várias espécies
TR-DPP	Teste Rápido Dual Path Platform
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization
x	Vezes
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
+	Mais
<	Menor
=	Igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Histórico e Etiologia.....	15
2.2 Vetor, reservatórios e ciclo biológico.....	17
2.3 Diagnóstico.....	19
2.4 Leishmaniose Felina.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	24
4.2 Área de estudo.....	24
4.3 Amostragem e coleta de materiais.....	25
4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	25
4.4.1 Produção de Antígeno.....	25
4.4.2 Análise sorológica.....	26
4.5 Análise estatística.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS.....	43

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diverso de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e acometem mais de um bilhão de pessoas, afetando principalmente as populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado, em estreito contato com insetos, que apresentam capacidade e competência vetorial, e animais domésticos (WHO, 2017). Nesse contexto, as doenças causadas por parasitos representam um grave problema de saúde pública nos países pobres e em desenvolvimento (AULT, 2007). Dentre os inúmeros parasitos de importância médica, destacam-se as diferentes espécies do gênero *Leishmania*, protozoário agente de um amplo espectro de doenças, coletivamente referidas como leishmanioses (ALVAR et al., 2006; DUJARDIN, 2006).

Leishmaniose é um exemplo de doença resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente, das más condições econômicas e sociais que influenciam fortemente a distribuição social dessa parasitose, decorrentes de deficiências na qualidade de vida do homem no tocante à saúde e à educação, perpetuando os ciclos de pobreza e enfermidade (VINHAES & DIAS, 2000).

No homem, a doença pode apresentar diferentes formas clínicas, desde lesões ulceradas simples e auto-limitante na pele, até doença visceral com manifestações graves, dependendo da espécie de parasita envolvido e da relação do mesmo com seu hospedeiro, apresentando amplo espectro epidemiológico e ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo (SHAW, 2007; LAINSON, 2010).

Há uma diversidade de espécies do gênero *Leishmania* que acometem animais silvestres e domésticos e pelo menos 20 espécies patogênicas ao homem, em todo o mundo (FRAGA et al., 2009), sendo a Leishmaniose Visceral (LV) a mais severa.

No Brasil, a LV é causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAINSON & SHAW, 1987), sendo o agente etiológico a *L. infantum chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (MARCILI et al., 2014).

O cão é considerado o principal reservatório urbano, pelo grande número de casos e intenso parasitismo cutâneo (RAMIRO et al., 2003). Outros reservatórios podem ser fontes de infecção de *L. (L.) infantum chagasi*, tais como canídeos silvestres (DEANE, 1962) e marsupiais (SHERLOCK et al., 1984). Animais silvestres, tanto em vida livre como em

cativeiro, podem ser reservatórios, não apresentando ou mascarando os sinais clínicos, mesmo estando infectados, constituindo-se importantes fontes de infecção para os animais domésticos, homens ou vice-versa (ACHA & SZYFRES, 1986; CUBAS, 1996).

Nos últimos anos tem sido sugerido que o gato possa desempenhar algum papel na epidemiologia da leishmaniose zoonótica causada por *L. infantum chagasi*. Casos da infecção têm sido relatados em felinos e até o momento, existem discordâncias na literatura com relação à susceptibilidade dos felídeos domésticos à infecção por *Leishmania* e seu papel como possível reservatório (MAROLI et al., 2007; SILVA et al., 2010).

A baixa prevalência de *Leishmania* em gatos pode estar relacionada tanto ao diagnóstico ineficaz quanto a resistência natural da própria espécie frente ao parasita (KHAMESIPOUR et al., 2006), pois acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade, provavelmente relacionada a fatores genéticos (MANCIANTI, 2004; VITA et al., 2005), dificultando assim, determinar qual o verdadeiro papel do gato na manutenção e disseminação da LV, principalmente porque os gatos partilham a mesma área geográfica dos cães, a única espécie animal doméstica comprovadamente reservatória da leishmaniose visceral humana (MANCIANTI, 2004; MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; MAIA et al., 2008).

Assim, o aumento do número de casos de felinos descritos em todo o mundo e o significativo impacto clínico-epidemiológico da leishmaniose na saúde pública, é que se propõe esse estudo, com o objetivo de determinar a soropositividade de infecção por *Leishmania* sp. em gatos de São Luís - MA, área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC), através da Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e sua associação com fatores de risco, a fim de conhecer o papel dos gatos no ciclo da LV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e Etiologia

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários digenéticos, pertencentes ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania*, com dois Subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. Enquanto o primeiro apresenta o seu desenvolvimento restrito à porção anterior e média do vetor, o segundo se desenvolve desde o intestino

posterior até a porção anterior do tubo digestivo (LAINSON & SHAW, 1987; KONTOS & KOUTINAS, 1993; BRASIL, 2006; PAHO/WHO, 2017).

Atualmente, as leishmanioses, estão na lista das doenças tropicais negligenciadas por acometer a população mais vulnerável economicamente e socialmente, pela falta de investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias farmacêuticas e de medidas de controle eficazes (CONITEC, 2016).

As leishmanioses abrangem principalmente países inclusos no mapa socioeconômico da pobreza, onde, estima-se que cerca um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas sob o risco de infecção, 700.000 – 1 milhão de novos casos por ano e que 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (ALVAR et al., 2012; WHO, 2017).

No complexo de doenças que incluem as leishmanioses encontram-se a LV causada por *L. infantum chagasi* (Américas) e *Leishmania infantum* (sudoeste da Europa e Bacia Mediterrânea), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) onde no Novo Mundo é causada por membros do complexo mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*) e do complexo braziliensis (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*) e no Velho Mundo é usualmente causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* (GRIMALDI et al., 1989; BERMAN, 1996; DE ARRUDA, 2010).

A LV, também designada na Ásia por “febre negra” ou Kala-azar, é considerada a forma mais grave da doença, podendo ser mortal, em mais de 95% dos casos, se não for tratada (DESJEUX, 2004). É altamente endêmica no subcontinente indiano e na África Oriental. Cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorrem a nível mundial a cada ano. Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

A LV é causada por *Leishmania donovani* no sub-continente Indiano, África oriental e algumas regiões da China onde, devido à natureza antropofílica do vetor, se observa a manutenção de um ciclo antroponótico. *L. archibaldi*, segundo a identificação por tipagem isoenzimática, é também considerada como o parasita responsável pela LV no Sudão e Etiópia (PRATLONG et al., 2001). No sudoeste da Europa e Bacia Mediterrânea a LV tem como agente etiológico *L. infantum* e, no Novo Mundo, essencialmente no Brasil, *L. infantum chagasi* (DESJEUX, 2004; MARCILI et al., 2014).

A primeira descrição oficial do parasito foi feita na Índia por William Boog Leishman em 1900, onde Leishman reconheceu a semelhança do parasito com as formas redondas que se apresentavam nas infecções por *Trypanosoma* sp. e, mais tarde, em 1903, Charles Donovan confirmou os achados de Leishman, observando baços de cadáveres

falecidos infectados por malária, porém, confundiu-o com o *Trypanosoma brucei*, descrito em 1894 por David Bruce (WHO, 2001).

Em 1903, Major Ross, descobriu que os organismos evidenciados na preparação de Donovan não eram esporozoários como este havia pensado e lhes estabeleceu um novo gênero, o gênero *Leishmania*. Assim, o nome correto do agente etiológico do calazar ficou sendo *Leishmania donovani* (ROSS, 1903).

Devido essa enfermidade acometer principalmente crianças na região do Mediterrâneo, as evidências de diferenças entre o organismo causador do calazar de uma região para outra justificaram o estabelecimento da espécie *Leishmania infantum* por Charles Nicolle em 1908 (LAINSON & SHAW, 1987).

O primeiro relato da doença no Brasil foi feito em 1913, ao serem encontradas formas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas provenientes do município de Boa Esperança, no Mato Grosso do Sul, que foram à óbito com suspeita de febre amarela (CASTRO, 1996). A partir de então, a leishmaniose tem se expandido pelo país e de acordo com dados do Ministério da Saúde (MS), em 2014, a maioria dos casos de LV ocorre na América Latina, onde foi descrita em 12 países e aproximadamente 96% dos casos ocorre no Brasil. Em nível regional a LV está classificada em três cenários epidemiológicos: países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México) (PAHO/WHO, 2017).

A epidemiologia da LV vem se modificando ao longo do tempo. Inicialmente a doença apresentava um perfil rural, de transmissão periurbana, porém na década de 80, verificou-se uma transformação significativa na distribuição geográfica da LV. Alterações ambientais, migrações de população pobre para a periferia dos grandes centros estabelecendo-se em locais com condições de saneamento básico precárias e em proximidade com animais domésticos, favoreceram o processo de urbanização da doença. Além disso, a adaptação de flebotomíneos em ambientes alterados pelo homem fez com que a doença assumisse a característica periurbana (MARZOCHI, 1985; TESH, 1995; BRASIL, 2014).

2.2 Vetor, reservatórios e ciclo biológico

No Velho Mundo, a LV é transmitida por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (LAINSON & SHAW, 1988; LAINSON & RANGEL, 2005), enquanto que no Novo Mundo,

vetores do gênero *Lutzomyia* assumem importância no ciclo (HERWALDT, 1999), sendo transmitida principalmente por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (SANTOS et al., 2010), conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuquiras (FEITOSA et al., 2000).

Os flebotomíneos são mosquitos pequenos (com cerca de 2 a 3 mm), com hábitos intra e peridomiciliares, que realizam seu ciclo larval em matéria orgânica úmida, o que dificulta o seu combate (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). Possuem hábitos crepusculares e noturnos, permanecendo em locais tranquilos, sombrios e úmidos durante o dia. Deslocam-se em voos curtos e silenciosos, o que não acusa sua aproximação no momento da picada (REY, 2001; SOARES & TURCO, 2003).

A transmissão ocorre quando o flebotomíneo ao se alimentar, em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* sp. Durante o processo de desenvolvimento dos promastigotas no tubo digestivo do inseto vetor, observam-se duas formas distintas, as procíclicas, que são alongadas e maiores que as formas amastigotas possuindo um flagelo habitualmente mais curto que o corpo celular. As formas metacíclicas são relativamente curtas e arredondadas com um flagelo longo, duas a três vezes mais comprido que o corpo celular e com grande mobilidade. Estas formas constituem a fase final de desenvolvimento que ocorre no vetor e que é infectante para o hospedeiro vertebrado (HOWARD et al., 1987; KILLICK- KENDRICK, 1990).

Ao realizar o repasto sanguíneo novamente, o inseto pode infectar a pele do hospedeiro vertebrado regurgitando as formas infectantes promastigotas metacíclicas, a qual são fagocitadas pelos macrófagos da pele, internaliza o seu flagelo e transforma-se em formas amastigotas, que são formações ovóides ou arredondadas com 2,5-6,8 μm de comprimento. Estas amastigotas multiplicam-se por divisão binária nos fagolisossomas das células fagocíticas, provocando a sua destruição ao romper a membrana celular e através da disseminação hematogênica vão para os tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como, linfonodos, fígado, baço e medula óssea, sendo fagocitadas por novos macrófagos (LAINSON & SHAW 1987, REY, 2001; STRAUSS & BANETH, 2001; CAMARGO-NEVES et al., 2006).

Os hospedeiros vertebrados da *Leishmania* sp. podem ser além do homem, uma grande variedade de espécies como roedores, gambás, tamanduás, raposas, preguiças, primatas e morcegos (TRAVI et al., 1994; YAGHOUBI-ERSHADI et al., 1996; LAINSON & RANGEL, 2005; LIMA et al., 2008, COSTA et al., 2015). O cão é apontado, por alguns autores, como o principal hospedeiro doméstico, sendo este a principal fonte de infecção para

o homem (RAMIRO et al., 2003; CAMARGO-NEVES et al., 2006; ALVES et al., 2010; CALABRESE et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Devido a urbanização do vetor e conseqüentemente, da leishmaniose, pesquisadores acreditam que outras espécies domésticas também podem infectar-se e adoecer, podendo até mesmo ser incluídas na epidemiologia da doença em focos endêmicos (GUERIN, 2002; PENNISI, 2002; SIMÕES-MATTOS, 2002). Assim, acredita-se que o gato possa assumir algum papel no ciclo doméstico de transmissão da leishmaniose, pois o mesmo pode ser infectado naturalmente e pode transmitir o parasito para o vetor (SERGENT et al, 1912; SILVA et al., 2010).

2.3 Diagnóstico

Existem basicamente três categorias de provas para a confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral: os métodos parasitológicos, os sorológicos e os moleculares. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado ainda o padrão ouro para o diagnóstico da doença (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007).

O diagnóstico parasitológico compreende o exame direto de material biológico para visualização de formas amastigotas. Dentre as técnicas utilizadas para este diagnóstico, estão o isolamento *in vitro* do parasito com a obtenção de formas promastigotas em meio de cultura específico, a inoculação em animais suscetíveis e o isolamento *in vivo* ou prova biológica, que consiste na inoculação intraperitoneal do material suspeito em animal sensível, como o hamster (BRASIL, 2006);

Em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes, podem ocorrer resultados falsos negativos (FARIA, 2007). A pesquisa direta do parasito apresenta alta especificidade, no entanto a sensibilidade é baixa, sendo ainda menor em cães assintomáticos. A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (BRASIL, 2006).

Outro meio de diagnóstico são as provas sorológicas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. circulantes, que se estabelece como o instrumento mais utilizado para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Os exames sorológicos como teste rápido Dual Path Platform (TR-DPP) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são atualmente os métodos

recomendados pelo MS no Brasil para inquéritos populacionais da LV canina e humana, provavelmente devido a facilidade de execução e leitura (BRASIL, 2011).

A título de pesquisa utiliza-se ainda a RIFI, cujos princípios estão fundamentados numa reação de anticorpos do soro dos animais com os parasitos (antígenos), sob forma promastigota (*Leishmania* sp.), fixados em lâminas de microscopia. Em uma etapa subsequente, se utiliza um conjugado de anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com produto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) para evidenciação da reação (BIOMANGUINHOS, 2008a). A RIFI tem sido amplamente empregada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, embora possa apresentar reações cruzadas, principalmente com a leishmaniose tegumentar americana e doença de Chagas (BRASIL, 2014).

Já o ELISA consiste na reação de soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania spp.* cultivadas in vitro, inativadas e adsorvidos nas cavidades das microplacas. Em seguida acrescenta-se uma antiimunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos, se presentes. Para a evidenciação da reação faz-se o uso da tetrametilbenzina, formando um composto de coloração azul (BIOMANGUINHOS, 2008b).

Essas técnicas sorológicas eram recomendadas pelo MS para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários até o ano de 2011. O protocolo de diagnóstico da LVC era constituído do ELISA e da RIFI, sendo respectivamente, triagem e confirmatório. Os animais que apresentassem títulos maiores ou iguais 40 na RIFI eram recomendados a eutanásia, com o objetivo de interromper o ciclo de transmissão (BRASIL, 2006, GARCIA & MARCONDES, 2007; SILVA et al., 2011).

Contudo, diante de algumas dificuldades operacionais da RIFI (como custo, equipamentos específicos e repetibilidade) e a necessidade de facilitar e avançar tecnologicamente no diagnóstico dessa doença é que o MS alterou o protocolo, passando a empregar o TR-DPP e o ELISA, como testes de triagem e confirmatório, respectivamente (BRASIL, 2011).

Dentre as novas tecnologias para o diagnóstico sorológico da LVC inclui-se o TR-DPP, patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010). Trata-se de um ensaio imunocromatográfico de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes rk28 (fusão da rk9, rk26 e rk39) específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana de nitrocelulose. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão a combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado

positivo por meio de reação de cor. As vantagens são de um teste rápido, simples e de fácil uso, podendo ser executado a campo (BIO-MANGUINHOS, 2011).

A partir da década de 80, técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), passaram a ser utilizadas para detecção e identificação dos parasitas em amostras de pessoas e/ou animais infectados com *Leishmania* (GREENE, 2006). A PCR apresenta-se como opção que vem somar ao diagnóstico da LV, pois permite a identificação de fragmentos do genoma do protozoário a partir de quantidade mínima de DNA (MARTINS, 1999).

Tem sido demonstrado que a PCR é um meio diagnóstico sensível e específico para a detecção de DNA de *Leishmania* em uma variedade de amostras quando comparados com métodos diagnósticos convencionais (FISA et al., 2001; MANNA et al., 2004). Apesar da PCR possuir alta especificidade, ela é mais usada nos estudos epidemiológicos do que como método diagnóstico de rotina, devido à sua complexidade e o custo operacional alto para a utilização em larga escala. Além disso, há a possibilidade de falsos positivos, devido à contaminação com outras amostras ou fragmentos de DNA amplificados pós-PCR e à reação cruzada com outros agentes patogênicos, entre eles as espécies de *Trypanosoma* (DEGRAVE et al., 1994).

2.4 Leishmaniose Felina

Existem diversos estudos recentes indicando que o gato pode ser infectado em áreas endêmicas e pode atuar como reservatório doméstico para a infecção humana (FERREIRA, 2006). Porém, o papel do gato no ciclo epidemiológico da LV ainda não está claramente elucidado (WHO, 2010).

A primeira descrição da infecção natural de um gato doméstico por *Leishmania* sp. foi feita em 1912, na Argélia, em um animal com quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de leishmaniose visceral. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasita em medula óssea, sem a identificação da espécie causadora de enfermidade (SERGENT et al., 1912). No Brasil, o primeiro diagnóstico de LV na espécie felina foi feito no ano de 2001, no município de Cotia, estado de São Paulo (SAVANI et al., 2004).

Estudos na Itália e na Síria comprovaram, por meio da tipagem de DNA, parasitas idênticos no sangue dos felinos e no intestino dos flebotomíneos, que se infectaram

naturalmente ao realizar repasto sanguíneo, comprovando a transmissibilidade do parasita. Estas evidências de transmissibilidade comprovada dos parasitas de felinos a um vetor sugerem que os gatos podem exercer o papel de reservatórios domésticos da doença ao invés de simplesmente um hospedeiro acidental (MAROLI et al., 2007; LONGONI et al., 2012; SOBRINHO et al., 2012).

No Brasil, por xenodiagnóstico, um gato experimentalmente infectado com *Leishmania braziliensis* foi capaz de infectar o vetor *Lutzomyia migonei* com o protozoário (SIMÕES-MATTOS et al., 2004), e outro gato, infectado naturalmente por *Leishmania infantum chagasi*, também foi capaz de transmitir o protozoário ao vetor *L. longipalpis* (SILVA et al., 2010).

O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo ou não ser sintomático e apresentar sinais clínicos inespecíficos, que comumente incluem lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras e alopecia (MELLO, 1940). Todavia, alguns autores relatam que os gatos possuem certo grau de resistência natural à infecção por *Leishmania*, na ausência de outra doença ou estado de imunossupressão, por apresentarem os títulos de anticorpos muito baixos e sinais estereotipados, não característicos. Com efeito, os baixos títulos de anticorpos contra *Leishmania* sp. observados nos gatos têm sido geralmente atribuídos à capacidade destes animais para gerar anticorpos específicos contra um agente patogênico presente no seu meio, sem sofrer da doença (VITA et al., 2005; LONGONI et al., 2012; SOBRINHO et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos de São Luís – MA, área endêmica para leishmaniose visceral, e sua associação com fatores de risco.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença de anticorpos IgG circulantes anti-*Leishmania* sp. no soro dos gatos através do uso da Reação de Imunofluorescência Indireta;
- Determinar e comparar fatores de risco associados à leishmaniose visceral felina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

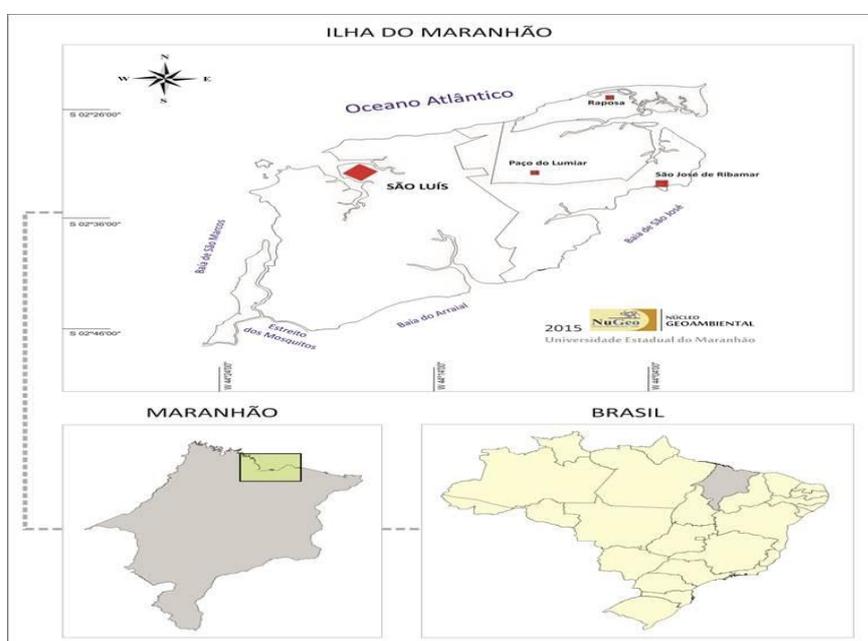
4.1 Comissão de Ética na Experimentação Animal

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal, do curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual do Maranhão e encontra-se protocolado sob número 037/2017.

4.2 Área de estudo

A pesquisa foi desenvolvida no município de São Luís (figura1), capital do estado do Maranhão, situado na Região Nordeste do Brasil. O município encontra-se na Ilha de Upaon-Açu e limita-se com os municípios de São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa, estando sob as seguintes coordenadas geográficas $02^{\circ} 31' 48'' S$ $44^{\circ} 18' 10'' O$, no Atlântico Sul, entre as baías de São Marcos e São José de Ribamar (IBGE, 2015). Composto por uma área 828,01 km², 24m acima do nível do mar, cuja cobertura vegetal original do município é um misto de floresta latifoliada, babaçual, vegetação de dunas, restinga e manguezal. Apresenta um clima tropical quente e semi-úmido, com duas estações bem definidas durante o ano, uma temperatura média de 21 a 27°C, com umidade relativa do ar média de 85%.

Figura 1 – Mapa de localização dos municípios de São Luís - MA



Fonte: NUGEO, 2016.

4.3 Amostragem e coleta de materiais

Os animais deste estudo eram do atendimento do Hospital Universitário Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão (HUV-UEMA) e a seleção dos mesmos foi realizada utilizando amostragem não probabilística por conveniência. Os proprietários foram devidamente esclarecidos quanto ao experimento e autorizaram a coleta mediante assinatura de termo de consentimento (Anexo A).

Antes da colheita do sangue, os gatos deste estudo foram submetidos a uma avaliação clínica individual, registrando-se as possíveis alterações clínicas apresentadas por esses animais. Em seguida, foram coletados, em média, 3 mL de sangue de cada animal, em tubos sem anticoagulantes, por meio de venopunção das veias cefálica ou jugular.

As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, para obtenção de soro, posteriormente o soro obtido foi aliqotado em microtubos de 1,5 mL sendo armazenados a -20 °C até as análises sorológicas.

Visando obter dados referentes aos aspectos epidemiológicos da doença em felinos, concomitante à coleta do sangue, foram aplicados questionários aos responsáveis pelos gatos amostrados, com perguntas referentes ao animal (raça, idade, sexo e seus hábitos), ao manejo ambiental, coabitação com outros animais, conhecimento da leishmaniose e da sua transmissão (Anexo B).

4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta

4.4.1 Produção de Antígeno

O antígeno utilizado foi preparado no Laboratório Doenças Parasitárias - FMVZ - USP, a partir de formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, obtidas da cepa CBT 153 por meio de punção aspirativa do linfonodo poplíteo de um cão naturalmente infectado no município de Açailândia - MA. Foram isoladas em meio de cultura Bifásico (Liver Infusion Tryptose - LIT + ágar base contendo sangue de carneiro desfibrinado), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina. Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm (1620g) à 4°C. O precipitado no fundo do

tubo foi ressuspenso em solução de formalina tamponada 2% e mantido à 4°C por 24 horas. Após a fixação das formas promastigotas, estas foram novamente lavadas com PBS e então contadas em câmara de Neubauer. A concentração de parasitas foi ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL e aplicou-se 20µL por poço nas lâminas de imunofluorescência. Estas lâminas foram armazenadas à -20°C.

4.4.2 Análise sorológica

A análise sorológica foi realizada conforme técnica descrita por Oliveira et al. (2008). No momento da realização do teste, as lâminas previamente sensibilizadas para *Leishmania infantum chagasi* foram levadas à estufa de 37°C para secar, por 15 a 20 min. Posteriormente, preparou-se as diluições dos soros a serem testados e dos soros controle positivo e negativo de origem felina (provenientes da biblioteca de soros da Universidade de São Paulo – USP), previamente conhecidos, em PBS 7,2, considerando-se a diluição de 1:40 como ponto de corte, conforme preconizado pelo MS (BRASIL, 2006).

Com as lâminas já secas, foram adicionados em cada poço das mesmas, 20µL do soro diluído em PBS 7,2 e os controles positivo e negativo. O material foi incubado por 30 min a 37 °C em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS 7,2, durante 5 minutos, por três vezes consecutivas em uma cuba de vidro.

Após as lavagens, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e em cada poço adicionou-se 20µL do conjugado (anti-IgG felina marcada com isotiocianato de fluoresceína – Sigma), utilizado na diluição de 1:200 em solução de PBS 7,2 contendo Azul de Evan 0,04%. O material foi novamente incubado por 30 min, a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas com PBS 7,2 como descrito anteriormente. E após secagem à temperatura ambiente realizou-se a montagem da lâmina com lamínula utilizando-se glicerina tamponada (pH 8,0) e as mesmas foram lidas em microscópio equipado para fluorescência no aumento de 40x. Os soros reativos na diluição 1:40 foram testados em diluições seriadas, na razão dois, para determinação do título final de reatividade.

4.5 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste exato de Fisher para verificar existência de associação entre as diferentes variáveis estudadas e o resultado da sorologia. As diferenças foram consideradas significativas para os valores de $p < 0,05$. Para os testes

estatísticos foi utilizado o programa computacional Epi Info versão 6 de 1993 e versão 3.4.3 de 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população felina do presente estudo foi caracterizada conforme o sexo, idade, raça, abrigo, acesso à rua, coabitação com outros animais e em relação ao ambiente em que são criados se havia acúmulo de matéria orgânica e realização de manejo ambiental.

Foram amostrados 80 gatos, sendo 57 (71,25%) fêmeas e 23 (28,75%) machos, com idade variando de 5 meses a 13 anos. Quanto ao padrão racial, observou-se que 79 (98,75%) animais eram sem raça definida (SRD) e apenas um (1,25%) animal era da raça persa.

A avaliação sorológica das 80 amostras, por meio da RIFI, detectou 21 gatos soropositivos para *Leishmania* sp., demonstrando um percentual de positividade de 26,25% e títulos variando de 40 a 2560 (Tabela 1). Infecções por *L. infantum chagasi* em gatos são, normalmente, encontradas em áreas onde a doença é endêmica para cães e humanos (PENNISI, 2002). De fato, valores similares foram encontrados por Martin-Sánchez et al., (2007), que obtiveram frequência de 26,1% em 183 gatos de áreas endêmicas do sul da Espanha e no Brasil, Vides et al., (2011), relataram uma prevalência maior, de 49,1% (27/55) de gatos positivos para *Leishmania*, em área endêmica no interior São Paulo, sugerindo que esses felinos desempenham papel importante na epidemiologia da doença, uma vez que são fonte de infecção aos vetores.

Contudo, apesar dos dados apresentados apontarem os gatos como possível reservatório da LV no município de São Luís - MA, mais estudos de prevalência e xenodiagnóstico são necessários para melhor esclarecer o papel epidemiológico desses animais no ciclo da doença e inquéritos sorológicos realizados pelas autoridades sanitárias devem incluir felinos domésticos.

Tabela 1 - Titulação dos soros, em número e porcentagem, positivos à detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos

Titulação	Nº de animais	%
40	4	19
80	8	38,1
160	3	14,3
320	3	14,3
640	2	9,5
1280	-	-
2560	1	4,8

Total	21	100
--------------	----	-----

Fonte: dados da pesquisa, 2017.

Dos 21 gatos soropositivos, 19% (4/21) apresentaram títulos de anticorpos de 40, diferindo dos achados de Vita et al. (2005) ao detectarem anticorpos anti-*Leishmania infantum* com títulos de 40 em 60,61% dos felinos testados na Região de Abruzzo, Itália. Ao passo que 38,1% (8/21) animais foram soropositivos para a titulação de 80, semelhante ao observado por Noé et al. (2010) ao avaliarem 110 amostras de soro de gatos verificando que oito (7,27%) animais apresentaram títulos de 80. Neste estudo, obteve-se ainda 14,3% (3/21) de amostras reagentes para títulos de 160, 14,3% (3/21) com títulos de 320, 9,5% (2/21) apresentaram títulos de 640 e por fim 4,8% (1/21) obteve título de 2560. Esses resultados discordam dos achados por Mancianti et al., (2004) onde nenhum animal avaliado em seu estudo apresentou título igual a 320.

Nos estudos sorológicos de gatos, observa-se uma variação na taxa de animais reagentes e nos títulos de anticorpos nos diferentes trabalhos. Portús et al., (2002) e Mancianti et al. (2004) afirmam que essas variações podem estar atreladas as dificuldades na interpretação de resultados sorológicos de animais considerados hospedeiros incomuns de *Leishmania* sp., desconhecida sensibilidade das técnicas sorológicas quando empregadas em felinos, poucas informações sobre a resposta humoral felina no curso da doença, e a resistência natural dos gatos à *Leishmania* sp.

Pennisi et al. (2012) afirmam que o limiar de positividade para a infecção felina por *Leishmania* spp. pode ser 1:80, entretanto, é importante ressaltar o fato de esta técnica não estar padronizada para gatos, não existindo um limiar de positividade universalmente aceito. Dessa forma, utilizou-se, os que se encontram validados para os cães, que no Brasil, o MS preconiza, para RIFI, que os resultados considerados positivos sejam aqueles que apresentam títulos iguais ou maiores que a diluição de 1:40.

Com relação ao acesso à rua, notou-se que 58,75% (47/80) dos gatos tinham acesso livre à rua enquanto que 41,25% (33/80) eram domiciliados. E no que se refere a à castração, 38,75% (31/80) gatos eram castrados e 61,25% (49/80) não castrados.

As variáveis acesso à rua e castração foram estatisticamente associadas com a soropositividade dos animais ($p=0,031$, $p= 0,038$, respectivamente), o que significa que animais não castrados possivelmente têm mais acesso à rua e conseqüentemente encontram-se mais expostos ao vetor. Estes resultados diferem dos encontrados por Peruca (2011), que observou que a castração não influenciou na positividade dos gatos para leishmaniose ($p=1,0$),

sendo a incidência de animais negativos maior do que animais positivos, independente da castração (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da análise univariada (teste exato de Fisher) para a associação entre variáveis independentes com os resultados sorológicos de gatos domésticos, analisados através de RIFI

Variável	Categoria	Positivo/ Exposto	%	Negativos / Exposto	%	Valor de P
Acesso à rua	Não	4/33	12,12	29/33	87,88	0,031*
	Sim	30/47	63,82	17/47	36,18	
Sexo	Macho	03/23	13,04	20/23	86,96	0,101
	Fêmea	18/57	31,57	39/57	68,43	
Castrados	Não	17/49	34,69	32/49	65,31	0,038*
	Sim	04/31	12,90	27/31	87,10	
Contato com animais de outras casas	Não	01/14	07,14	13/14	92,86	0,098
	Sim	20/66	30,30	46/66	69,70	
Coabitação com outros animais	Não	01/05	0,20	04/05	99,80	0,843
	Sim	20/75	26,66	55/75	73,34	
Manejo ambiental	Não	16/38	42,10	22/38	57,90	0,004*
	Sim	05/42	11,90	37/42	88,10	
Acúmulo de matéria orgânica	Ausência	5/31	16,12	26/31	83,88	0,123
	Presença	16/49	32,65	33/49	67,35	
Local onde o gato dorme	Dentro	0/10	0,00	10/10	100,00	0,102
	Fora	21/70	0,30	49/70	99,70	
Coabitação com cães	Não	4/34	11,76	30/34	88,24	0,019*
	Sim	17/46	36,95	29/46	63,05	
positivos para <i>Leishmania</i>						
Vermifugação	Não	17/57	29,82	40/57	70,18	0,399
	Sim	4/23	17,39	19/23	82,61	
Vacinação	Não	16/46	34,78	30/46	65,22	0,070
	Sim	5/34	14,70	29/34	85,30	

Fonte: dados da pesquisa, 2017.

* Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Em relação ao sexo, dos 21 gatos sororreagentes, 85,7% (18/21) eram fêmeas, o que se encontra de acordo com os estudos efetuados por Pennisi (2002) que confirma a predisposição para o sexo feminino observando 73% de fêmeas positivas. No presente estudo, notou-se que não houve associação entre a soropositividade dos animais e a variável sexo ($p = 0,101$) corroborando com os achados de Daikou et al., (2009) que não encontraram associação entre a ocorrência de leishmaniose e o sexo dos animais positivos ao pesquisarem anticorpos anti-*Leishmania* spp. em 284 gatos da Grécia.

Segundo Alexander et al. (2002), o contato com outros animais, principalmente aves, pode favorecer à atração dos flebotomíneos e o contato estreito do vetor com as espécies domésticas, entretanto, no presente estudo, apesar de relatada a presença de outros animais (cães, gatos e aves) coabitando com os gatos amostrados por 95,75% (75/80) dos proprietários e o contato destes com animais de outras casas em 82,5% (66/80), estas variáveis não foram estatisticamente significativas ($p = 0,098$; $p=0,843$, respectivamente).

A realização de manejo ambiental no ambiente em que estes animais vivem teve uma associação significativa com a soropositividade ($p=0,004$), demonstrando maior prevalência de animais positivos nas residências em que não se realizava o manejo ambiental.

Quanto ao ambiente em que os animais eram criados, 61,25% (49/80) tinham acúmulo de algum tipo de matéria orgânica (folhas/frutos e fezes de animais) e 52,5% (42/80) realizavam algum tipo de manejo ambiental (folhas/frutos recolhidos, coleta de lixo, fezes recolhidas, quintal capinado, material orgânico enterrado ou jogado fora).

O acúmulo de matéria orgânica não foi estatisticamente associado a positividade dos gatos ($p= 0, 123$), entretanto pode-se notar que, apesar de não ser um dado significativo, as residências em que há o acúmulo matéria orgânica têm mais animais positivos.

Esses fatores favorecem a proliferação do vetor e a transmissão da doença, pois as fêmeas do flebotomíneo põem seus ovos normalmente sobre um substrato úmido no solo e com alto teor de matéria orgânica para garantir a alimentação das larvas (GALATI, 1997).

Com relação ao local em que os gatos dormiam, 12,5% (10/80) dormiam dentro de casa e 87,5% (70/80) dormiam fora de casa (quintal ou na rua), entretanto não foram observados uma associação entre esta variável ($p= 0,102$) e a presença de animais soropositivos. Contudo, segundo Dias-Lima et al. (2002), a atividade de picadas dos flebotomíneos ao nível do solo ocorrem, geralmente, nas primeiras horas da manhã, e ao entardecer, que associado ao comportamento do animal de dormir durante o período do dia e a dormir fora de casa, predispõem a chance de infecção por *Leishmania* sp. já que estes ficariam disponíveis para o vetor se alimentar.

Em relação a presença de cães positivos para leishmaniose coabitando com o gato, observou-se diferença estatística ($p=0,019$) onde casas que já havia cães positivos, encontrou-se também maior quantidade de gatos positivos, evidenciando o cão como reservatório da doença e o gato como outro possível reservatório peridoméstico como sugerido por Vita et al. (2005), Rossi (2007) e Neto et al. (2008).

No que se refere à vacinação e vermifugação não foi possível notar associação com a soropositividade ($p= 0,070$ e $p= 0,399$, respectivamente) concordando com Peruca

(2011), que também não observou em seu estudo diferença estaticamente significativa quanto a estas variáveis.

No que concerne à condição clínica dos felinos estudados, 83,75% (67/80) dos animais eram aparentemente saudáveis, enquanto 16,25% (13/80) apresentavam sintomas inespecíficos no exame físico geral (dermatites, alopecia, lesões de pele) e destes animais com sintomatologia 28,6% (6/21) foram sororreagentes.

De acordo com Rocha (2012), o quadro clínico na leishmaniose felina é inespecífico e caracteriza-se por anorexia, linfadenomegalia local ou generalizada, dermatite seborreica, alopecia difusa, uveíte, lesões cutâneas ulceradas ou nodulares em orelha focinho e patas.

Segundo Solano-Gallego et al. (2007), quanto a imunologia, gatos respondem de forma diferente dos cães. Enquanto estes apresentam predominantemente uma resposta humoral, os felinos apresentam uma resposta celular, suficiente para controlar a infecção e conferir certo grau de resistência natural, explicando, desta forma, a presença de um maior número de animais assintomáticos em relação aos que desenvolvem quadro clínico dentro de uma população. Além disso, outra condição que pode explicar a razões dos gatos não apresentarem tantos sinais clínicos é a não produção exacerbada de anticorpos, o que não gera à deposição de imunocomplexos, permitindo a multiplicação e disseminação do parasita, pelo sangue e células linfóides do organismo sem causar danos irreversíveis que levem à morte do hospedeiro (GREENE, 2006).

Estudos apontam que o aparecimento de sintomas na leishmaniose felina pode estar associado com a existência de doenças imunossupressoras, como a leucemia viral felina e a imunodeficiência felina, que poderiam explicar, por exemplo, os sinais clínicos encontrados nos animais (NAUCKE, 2000; RODRIGUEZ et al., 2002; MANCIANTI, 2004; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006).

O fato de apenas 28,6% (6/21) dos animais sororreagentes apresentarem sintomatologia compatíveis com LV, reforça a hipótese dos gatos serem considerados reservatórios da doença, mantendo-se infectados entre épocas de atividade do flebotomíneo. Contudo, neste trabalho, torna-se difícil correlacionar esses achados exclusivamente à leishmaniose, já que não foram pesquisadas outras patologias nos referidos animais. Assim, em áreas endêmicas, a detecção de *Leishmania* deve ser incluída como diagnóstico diferencial, já que os sinais clínicos podem ser confundidos com outras doenças comuns em gatos (VIDES et al., 2011).

Camargo & Bondan (2015), sugerem que para escolha e execução de projetos educativos é de fundamental importância compreender o nível de conhecimento da população-alvo em relação à doença. Assim, quanto ao conhecimento da doença, 93,75% (75/80) dos tutores sabem o que é a leishmaniose, 67,5% (54/80) acreditam que o gato pode contrair a leishmaniose e 90% (72/80) afirmaram que a transmissão da doença ocorre através da picada do mosquito palha. O presente estudo revela, assim, que a maior parte da população possuía conhecimento sobre a LV, assim como dos elementos envolvidos na cadeia de transmissão epidemiológica desta doença, havendo uma melhora do nível de conhecimento, já que Gama et al. (1998) também observaram um alto nível de conhecimento sobre a leishmaniose na população do estado do Maranhão, porém, a compreensão sobre as formas de transmissão e os métodos de prevenção era muito baixa.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- Os gatos de São Luís – MA, área endêmica para leishmaniose, apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* sp., sugerindo que esses animais são expostos ao vetor e ao parasita, e não podem ser excluídos como potencial reservatório da doença, visto que, assim como o cão, os felinos têm uma estreita convivência com o homem;
- A soropositividade dos gatos deste estudo demonstrou-se estatisticamente associada aos fatores de risco: acesso à rua, castração, realização de manejo ambiental e o convívio com cães positivos para leishmaniose.
- Inquéritos sorológicos realizados pelas autoridades sanitárias devem incluir felinos domésticos, devendo-se realizar a confirmação associada a outros métodos laboratoriais de diagnóstico nos animais soropositivos;
- Médicos veterinários atuantes na área de clínica também devem estar atentos e incluir a leishmaniose felina no diagnóstico diferencial na avaliação clínica de um gato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Washington: **Oficina Sanitária Panamericana**, 989p., 1986.

ALEXANDER, B. et al. 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. 8(12):1480-1485.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BEM, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitology**. v. 22(12), p.552-7, 2006.

ALVES, G. B. B. et al. Cardiac and pulmonary changes in symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.3, p. 310-315, 2010.

AULT, S. K. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 18, 2007.

BERMAN, J. D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, Issue 5, Pages 519-522, 1996.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. IFI Leishmaniose Visceral Canina. Imunoflorescência. Indireta para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2008a.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. EIE Leishmaniose Visceral Canina. Ensaio Imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Bio-manguinhos**, Rio de Janeiro, 2008b.

BIO-MANGUINHOS. Instituto de Tecnologia em Imunodiagnósticos. TR - DPPR Leishmaniose Visceral Canina. Teste Rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*. **Bio-Manguinhos**, Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. Câmara dos Deputados. Gabinete do Deputado Federal Mandetta – DEM/MS. Comissão de Seguridade Social e Família. **Projeto de Lei n. 1738, de 2011**. 2011. Disponível em:

<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=F40F61272C356EC12E7D1F954F0C960D.proposicoesWeb1?codteor=1240864&filenam=Parecer-CSSF-18-03-2014>. Acesso em: 18 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 120 p., 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer al.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer al_1edicao.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2015.

CALABRESE, K. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.

CAMARGO, T. C.; BONDAN, E. F. Conhecimento sobre leishmaniose visceral canina na população do município de Cotia (SP), Brasil, e participação dos clínicos veterinários locais na propagação de medidas preventivas. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 22, n. 1, p. 28-33, 2015.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. Secretaria de saúde. Governo do estado de São Paulo, p. 122, 2006.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, p. 86, 1996.

CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas**. Escopo: leishmaniose visceral, 2016.

COSTA, A. P. et al. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 15, n. 12, 2015.

CUBAS, Z. S. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. **Office International des Epizooties Scientific and Technical Review**, v. 15, n. 1, p. 267-287, 1996.

DAIKOU, A.; PAPADOPOULOS, E.; LAZARIDES, K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, p.728-730, 2009.

DE ARRUDA, Leishmanioses. In: Manual de Zoonoses. Paraná, v.1, 2 ed. 90p. 2010. Disponível em<<http://www.zoonoses.or.br/zoonoses>>. Acesso em 23 de fev. 2017.

DEANE, L. M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**89: 463-469, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, Issue 5, Pages 305-318, 2004.

DIAS-LIMA, A.; BERMUDEZ, C. E.; MEDEIROS, J. F.; SHERLOCK, I. Estratificação vertical da fauna de flebotomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária em terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n. 3, Rio de Janeiro, 2002.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends Parasitology**. v. 22(1), p. 4-6, 2006.

FARIA, M. B. Leishmaniose Visceral canina: Revisão bibliográfica. Rio de Janeiro: UCB. **Dissertação** (Especialização em clínica cirúrgica e médica). 45p, 2007.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, P. **Leishmaniose. Glossário de doenças - IOC - Fiocruz**. 2006. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6&tpl=printerview>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnostic of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 105-111, 2001.

FRAGA, B. M. et al. Biotransformation of two ent Pimara-9 (11),15-diene Derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 87-91, 2009.

FUNED. Fundação Ezequiel Dias. **Funed valida teste mais rápido para leishmaniose visceral canina. Minas Gerais**, 2010. Disponível em: <http://www.isaude.net/pt-BR/noticias/6636/geral/funed-valida-teste-mais-rapido-paraleishmaniose-visceral-canina.html>. Acesso em: 19 fev. 2017.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneo (*Diptera, Psychodidae*) em foco de Leishmaniose Visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, p.378-390, 1997.

GAMA, M. E. A. et al. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre Leishmaniose Visceral, Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.14, n.2, p.381- 390, 1998.

GARCIA, F. A. I; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista clínica veterinária**. n.71, p. 34-42, nov./dez. 2007.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**, Saunders Elsevier, 3ª edição; pp. 685-697; Georgia USA, 2006.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**. 2(8):494-501, 2002.

GRIMALDI, J. R. G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geografic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 41:687-725, 1989.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HOWARD, M. K., SAYERS, G., MILES, M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. **Experimental Parasitology**, 64: 147-56, 1987.

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. n. 71, p. 34-32, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. **Indian Journal of Medical Research**. 123:423-38, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, 65 Suppl 1:37-42, 1990.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. **Old world canine leishmaniasis**. Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian, v.15, n.7, p. 949-959, 1993.

LAINSON, R. The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. Pará, v.1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW J. J. Observations on the developement of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitology Human**, v. 63, n.2, p. 134-145, 1988.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Biology and Epidemiology. London: Academic Press. v. 1, p. 1-120, 1987.

LIMA, V, S. et al. Chagas disease in ancient hunter-gatherer populations, Brazil. **The Journal Infectious Diseases**, v.14, p. 1001–1002, 2008.

LONGONI, S. S. et al. Detection of different *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 2012. Disponível em: <<http://revistas.bvsvet.org.br/rvz/article/viewFile/17290/23803>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cat in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**. 2008, Aug;8(4):555-9. doi:

10.1089/vbz.2007.0247. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471058>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

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

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v. 125, p. 251-62, 2004.

MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**. v.25, p. 44-51, 2014.

MAROLI, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, 2007. Disponível em: <<http://revistas.bvsvet.org.br/rvz/article/viewFile/17290/23803>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

MARTINS, J. J. N. (Coord.). **Zoonoses emergentes nas regiões sul e sudeste: vigilância e controle da leishmaniose americana de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto: SUCEN, 46p., 1999.

MARTIN-SÁNCHEZ, J. et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, 145: 267-273, 2007.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977- 1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-57, 1985.

MELLO, G. B. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Bras Med**, 1940. Disponível em: <<http://revistas.bvsvet.org.br/rvz/article/viewFile/17290/23803>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

NAUCKE, T. J. Leishmaniose bei katzen. **Rundschreiben**, n.4, 2000. Disponível em: <<http://members.aol.com/TJNaucke/letter04.html>> Acesso em: 21 dez. 2016.

NETO, L.S. et al. Uso do ELISA-FML para diagnóstico de leishmaniose visceral em *Felis catus* na área endêmica de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, 15 (2), p.87, 2008. (suppl.)

NOÉ, Perla et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. **Ciência Animal**, 25 (4): 03-14, 2015. p. 13-32, 2010.

NUGEO. Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). **Mapa de localização dos municípios de São Luís – MA**, 2016.

OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. A 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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

PAHO – PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**. Disponível

em:

<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=39646&lang=en>. Acesso em: 05 mai. 2017.

PENNISI, M. G. A high prevalence of feline leishmaniasis in Southern Italy. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, Sevilla: **Intervet**, p. 39-48, 2002.

PENNISI, M. G. et al. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from southern Italy [abstract]. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 14, 656 – 657, 2012.

PERUCA, L. C. B. Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose canina e humana. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

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 Ibérica de Parasitología**, v.62, p. 72-76, 2002.

PRATLONG, F. et al. Sudan: the possible original focus of visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 122: 599-605, 2001.

RAMIRO, M. J. et al. Protection in dogs against Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, p. 2474-2484, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, Alessandra Guizzo da. Leishmaniose visceral canina no Rio Grande do Sul - Revisão Bibliográfica. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RODRIGUEZ, J. H. et al. Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proceedings**. Granada: WSAVA, 2002. Disponível em: internet <<http://vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2754>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

ROSS, R. Notes on HE bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1261-1262, 1903.

ROSSI, Claudio Nazaretian. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba - São Paulo - Brasil**. São Paulo: 2007. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/cmv/m/2945.pdf>>. Acesso em: 28 de fev. 2017.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, n.11, p.24-28, 1997.

- SANTOS, J. M. L. et al. Prevalence of Anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.
- SAVANI, E. S. M. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 120, p. 229-233, 2004.
- SERGENT, E. et al. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.
- SHAW, J. J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world: a minireview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.
- SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 79; p. 511, 1984.
- SILVA, D. A. et al. Leishmaniose visceral canina em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – Relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, n. 95 p.65-68, 2011.
- SILVA, S. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil; **Veterinary Parasitology**, v.174, p. 150-154, 2010.
- SIMÕES-MATTOS, L. et al. Feline leishmaniasis uncommon or unknown?. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n.550, p.78-87, 2004. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/8S9YcXXdk6DsXSE_2013-6-27-15-42-50.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2017.
- SIMÕES-MATTOS, L. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Veterinary Parasitology**, v. 103, Issue 3, 28, pg 207–216, 2002.
- SOARES, R. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 75: 301-330, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000137652003000300005&lng=en>. Acesso em: 20 dez. 2016.
- SOBRINHO, L. S. V. et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 2012. Disponível em: <<http://revistas.bvsvet.org.br/rvz/article/viewFile/17290/23803>>. Acesso em: 22 nov. 2016.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the North western Mediterranean. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2007; 76(4):676-80. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000100108>. Acesso em: 18 dez. 2016.

STRAUSS, A. I. D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis (last update: 26-sep-2001). In: CARMICHAEL, L. (Ed.) **Recent advances in canines diseases**. Disponível em: Acesso em: 2 de mai. 2004.

TESH, R. B. Control of zoonotic Leishmaniasis: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 287- 292, 1995.

TRAVI, B. L. et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**.v.50, n.5, p.:557-65, 1994.

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

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16. p. 7-12, 2000.

VITA, S. et al. Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. **Veterinary Research Communications**, v.29, Suppl. 2, p.319-321, 2005. Disponível em: < <http://revistas.bvsvet.org.br/rvz/article/viewFile/17290/23803>>. Acesso em: 22 nov. 2016

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control f the leishmaniases**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 15 de fev. 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: background information**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 03 de mar. 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programme for the surveillance and control of leishmaniasis**. 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

YAGHOOBI-ERSHADI, M. R.; AKHAVAN, A. A.; MOHEBALI, M. *Meriones libycus* and *Rhombomys opimus* (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 90: 503-504, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos proprietários participantes do projeto.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) participante,

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da pesquisa intitulada “**Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos de uma área endêmica para leishmaniose visceral**”, sob a responsabilidade das pesquisadoras Andréa Pereira da Costa (Médica Veterinária e Doutora em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) e Brenda Fernanda Sodré Moreno (Estudante de Medicina Veterinária), as quais pretendem verificar a ocorrência de leishmaniose em gatos de uma área endêmica para leishmaniose visceral e sua associa o com fatores de risco, a fim de conhecer a situa o dos gatos como um reservatório do parasita nestas áreas.

Sua participa o   voluntária e consiste em responder a um questionário epidemiológico e permitir a coleta de amostra sang nea do seu animal.

Sua participa o terá como benefício   realiza o de exames diagnósticos para leishmaniose visceral no seu animal, sendo os resultados disponibilizados para seu conhecimento. Ainda, indiretamente você estará contribuindo para a produ o de conhecimento científico.

Você não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remunera o. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

Consentimento Pós-Infoma o

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colabora o. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não terei nenhum gasto e não serei remunerado.

Assinatura do participante

Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO B – Modelo de questionário epidemiológico aplicado com os proprietários participantes do projeto.

IDENTIFICAÇÃO	
Dados do animal:	
Nome: _____	Raça: _____ Idade: _____ Sexo: () F () M
Dados do proprietário:	
Nome: _____	Tel: _____ Bairro: _____

1. Acesso à rua: () Sim () Não
2. Local onde seu gato dorme: () dentro de casa; () fora de casa
3. Possui outros animais em casa?
 - () Sim () Não
 - () Sim () Não () cão () gato () aves () outros: _____
 - () Não
4. Na sua residência há acúmulo de matérias orgânicas? () Sim () Não
 - () folhas/frutos; () troncos/raízes; () adubo; () fezes de animais.
5. É realizado manejo ambiental em sua residência? () Sim () Não / Como é feito? ()
 - os dejetos são recolhidos para coleta; () poda de arvores; () quintal capinado; () folhas/frutos recolhidos; () material orgânico enterrado ou jogado fora.
 - Outros: _____
6. Seu gato tem contato animais de outras casas? () Sim () Não
 - Quais: _____
7. Seu animal é castrado? () Sim () Não
8. Seu animal é vacinado? () Sim () Não
9. Seu animal vermifugado? () Sim () Não
10. O (A) Sr (a) sabe o que é Leishmaniose? () Sim () Não
11. O (A) Sr (a) já teve (ou tem) algum cão positivo para Leishmaniose em casa?
 - () Sim () Não
12. O (A) Sr (a) acha que o gato pode adquirir Leishmaniose? () Sim () Não
13. Como o (a) Sr (a) acha que a Leishmaniose pode ser adquirida?
 - () pelo contato com o cão () pelo contato com pessoas doentes
 - () pelo contato com o gato () pela picada do mosquito palha

não sabe

14. Animal apresenta sintomatologia sugestiva de Leishmaniose? Sim Não;

Anorexia; Linfadenomegalia; Dermatites; Uveítes; Alopecia.

Outros: _____