

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

Pesquisa de Imunoglobulinas Anti-*Leishmania* spp. e Avaliação Clínica de Gatos Residentes em Áreas Endêmicas do Rio de Janeiro

Elisa Domingues Padua

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**PESQUISA DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*LEISHMANIA*
SPP. E AVALIAÇÃO CLÍNICA DE GATOS RESIDENTES EM ÁREAS
ENDÊMICAS DO RIO DE JANEIRO**

ELISA DOMINGUES PADUA

Sob a orientação do Professor

Argemiro Sanavria

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Julho de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P125p Padua, Elisa Domingues, 1989-
Pesquisa de Imunoglobulinas anti-Leishmania spp. e
avaliação clínica de gatos residentes em áreas
endêmicas do Rio de Janeiro / Elisa Domingues Padua.
2017.
67 f.: il.

Orientador: Argemiro Sanavria.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de pos graduação em
Medicina Veterinária, 2017.

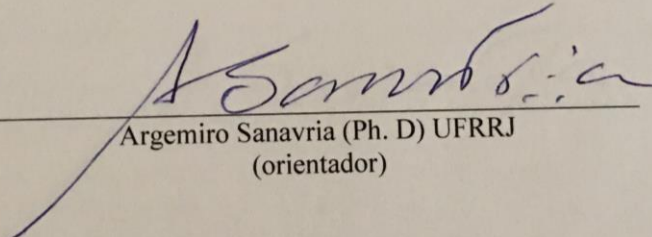
1. Leishmaniose. 2. Felinos. 3. Sorologia. 4.
Imunofluorescência. 5. ELISA. I. Sanavria, Argemiro,
1949-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de pos graduação em Medicina
Veterinária III. Título.

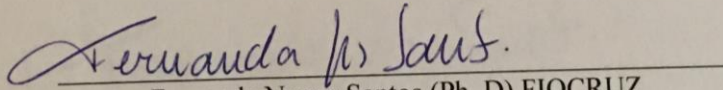
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

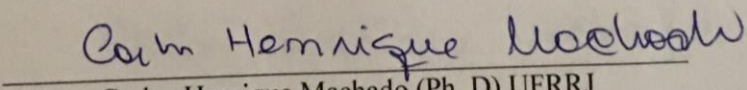
ELISA DOMINGUES PÁDUA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/07/2017


Argemiro Sanavria (Ph. D) UFRRJ
(orientador)


Fernanda Nunes Santos (Ph. D) FIOCRUZ


Carlos Henrique Machado (Ph. D) UFRRJ

*"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido,
mas aquele que vai acompanhado
com certeza vai mais longe."*

CLARICE LISPECTOR

*À minha mãe Rosângela, meu pai Elias e irmã Susana
pelo apoio, amor e esforço, que sempre dedicaram*

*Aos amigos que fizeram
acreditar que era possível*

Aos animais

Inspiração profissional

Dedico

*Ao meu querido orientador, Argemiro Sanavria
e a toda equipe da FIOCRUZ, pelo
incentivo, carinho e amizade.*

*Obrigada por acompanharem cada etapa
desse trabalho com entusiasmo e sabedoria.*

À vocês minha eterna admiração!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS por proporcionar a vida, saúde, e tantas oportunidades maravilhosas.

À minha mãe ROSÂNGELA DA CRUZ DOMINGUES PADUA que nunca deixou de me apoiar, que mesmo longe se fez presente em todas as minhas decisões e conquistas, e sem dúvida a pessoa que sempre acreditou e acredita que posso conquistar todos os meus sonhos.

Ao meu pai ELIAS JOSÉ PADUA, que sempre esteve por perto se preocupando com o caminho que estava trilhando, ele que sempre se mostrou um cara durão, até me surpreender com sua emoção diante das minhas conquistas.

À minha irmã SUSANA DOMINGUES PADUA que torna a minha vida mais feliz e me completa.

Ao meu namorado RENATO GUERRA DE CASTRO JUNQUEIRA, pelo esforço para que ficássemos juntos, por suportar a distância, aguentar minha chatice, e confiar que por onde quer que eu vá, vamos estar juntos!

Aos meus amigos e companheiros de mestrado, BIANCA PACHIEL MEDEIROS, CAMILA BOTELHO, RAFAELA PISANI, RITA DE CASSIA, com os quais sempre pude trabalhar, contar, rir e principalmente reclamar da vida.

Aos amigos PAULA e JHONNATHA, que me transmitiram muito apoio nesse momento tão difícil e com seus ensinamentos tudo se tornou mais fácil.

Aos companheiros de laboratório LUIZ DA PAZ e DENISE GLÓRIA GAIOTTE por sempre estarem dispostos a ajudar e manter toda a organização para que o projeto funcionasse perfeitamente.

Aos colegas e estagiários que me ajudaram em inúmeras coletas a campo, LARISSA CACHO ZANETE, CAMILA BARUEL, DIOGO FABRICIO CARAM, RENATO GUERRA, DENISE GLORIA, WELSER BARBOSA, sem o trabalho e companheirismo de vocês não teria sido possível.

Ao meu orientador professor ARGEMIRO SANAVRIA, pela oportunidade, por seus ensinamentos, pela confiança depositada, e também pelas broncas que de alguma forma me fizeram crescer.

Aos professores VALMIR LAURENTINO, FERNANDA SANTOS e toda a equipe da FIOCRUZ pelo imenso aprendizado e carinho.

A toda equipe de patologia clínica do HOSPITAL VETERINÁRIO DE PEQUENOS ANIMAIS e professor FÁBIO BARBOUR SCOTT, pela cooperação, utilização do laboratório e amostras provenientes do hospital.

Às minhas amigas ANA BEATRIZ DE OLIVEIRA BARBOZA, ARIADNE DO PRADO GOULART, JULIANA MOISÉS RODRIGUES, MARCELA FOLHA, MARIANA SILVA REVOREDO E RAFAELA PISANI, vocês não estiveram ligadas diretamente ao trabalho, mas com certeza estiveram ao meu lado pra que eu conseguisse concretizar mais esse sonho.

Aos meus queridos amigos do Hospital Veterinário de Grandes animais, BRUNO SPÍNDOLA, ERIKA BERTHA, RITA BOTTEON, SIMONE CALADO E VINICIUS VASCONCELLOS, por toda a ajuda na realização do experimento e na parte teórica. Muito obrigada pela paciência e amizade.

Aos meus chefes da clínica veterinária Vet Center, JOSÉ ROBERTO KIFER e RICARDO BRANDÃO, por todo incentivo, apoio, ensinamentos e, principalmente por entenderem as inúmeras trocas de plantões.

Aos meus filhos peludos, LINDA, SHAKYRA, VIVI, MARGOT e BARTO, pelo estímulo, amor e novas descobertas. Vocês são muito importantes na minha vida.

A todos os proprietários dos animais do experimento, por terem depositado sua confiança em mim e na equipe de pesquisa, permitindo que o estudo fosse concluído.

Aos outros amigos e também aos colegas, pelos momentos que fazem a vida ser mais leve e feliz.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (UFRRJ), bem como o corpo docente da Veterinária pelo aprendizado e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos animais, por fazerem a minha vida mais feliz, pelos ensinamentos ao mostrar tamanho carinho sem querer nada em troca, e por serem a parte principal do projeto experimental, sem eles o trabalho não teria sido realizado.

Peço desculpas caso não tenha citado algum nome, são tantas pessoas para agradecer, obrigada à todos que fizeram parte do meu trabalho e da minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

PADUA, Elisa Domingues. **Pesquisa de imunoglobulinas anti-*Leishmania* spp. e avaliação clínica de gatos residentes em áreas endêmicas do Rio de Janeiro.** 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Apesar de alguns relatos da ocorrência de Leishmaniose em felinos, a literatura é escassa no que diz respeito à sua pesquisa em populações de gatos de áreas endêmicas para a doença. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo pesquisar, em Seropédica e Itaguaí, região metropolitana do Rio de Janeiro, área endêmica para Leishmaniose tegumentar e visceral canina, a possibilidade de infecção em gatos, por meio de teste rápido qualitativo, da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelas técnicas de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para tanto, foram colhidas amostras de sangue e soro de 255 gatos, os quais foram encaminhados à Escola Nacional de Saúde Pública (FIOCRUZ). Nessa população, cinco gatos (1,9%, 5/255) foram reagentes ao teste rápido (TR DPP®), 44 (17,3%) apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. identificados pela RIFI. Os principais sinais clínicos observados nos animais soropositivos foram secreção ocular (16/44 – 36%), secreção nasal (16/44 – 36%), emagrecimento (7/44 – 15,9%), alopecia (6/44 – 13,6%) e lesão ulcerada na pele (5/44 – 11,3%), além de hepatoesplenomegalia (2/44 – 4,5%), linfadenomegalia (5/44 – 11,3%), opacidade de córnea (2/44 – 4,5%) e gengivite (2/44 – 4,5%). Não foi possível estabelecer uma padronização para o ELISA. A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos chama a atenção para essa espécie que deve ser mais investigada em relação ao seu poder como fonte de infecção em relação ao parasito.

Palavras-chave: Leishmaniose, felino, zoonose, ELISA, imunofluorescência indireta

ABSTRACT

PADUA, Elisa Domingues. **Immunoglobulin anti-*Leishmania* spp. and clinical evaluation of cats resident in endemic areas of Rio de Janeiro.** 2017. 67p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Despite some reports of the occurrence of Leishmaniasis in felines, the literature is scarce with regard to its research on populations of cats from areas endemic to the disease. In this way, the present study aimed to investigate the possibility of infection in cats by means of a rapid qualitative test of the antibody test in Seropédica and Itaguaí, metropolitan region of Rio de Janeiro, an endemic area for tegumentary and visceral canine leishmaniasis *Anti-Leishmania chagasi* by indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and indirect immunofluorescence (RIFI). For this purpose, blood samples were collected and the serum of 255 cats was sent to the Escola Nacional de Saúde Pública (FIOCRUZ). In this population of cats five animals (1.9%, 5/255) were reactive to the rapid test (TR DPP®), 44 (17.3%) had anti-*Leishmania* spp. Identified by the RIFI. The main clinical signs observed in the seropositive animals were ocular secretion (16/44 - 36%), nasal secretion (16/44 - 36%), weight loss (7/44 - 15.9%), alopecia (6/44 - 13, 6%) and ulcerated skin lesions (5/44 - 11.3%), in addition to hepatosplenomegaly (2/44 - 4.5%), lymphadenomegaly (5/44 - 11.3%), corneal opacity 2/44 - 4.5%) and gingivitis (2/44 - 4.5%). It was not possible to establish a standardization for the ELISA. Detection of anti-*Leishmania* spp. in felines, calls attention to this species that must be further investigated in relation to its power as a source of infection in relation to the parasite.

Keywords: Leishmaniasis, feline, zoonosis, ELISA, indirect immunofluorescence

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número e porcentagem de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta segundo a localização do domicílio..... 27
- Tabela 2.** Número e porcentagem de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, segundo o município de origem..... 28

LISTA DE QUADRO

- Quadro 1.** Agentes, vetores e reservatórios de *Leishmania* de ocorrência no Brasil..... 3
- Quadro 2.** Número e porcentagem de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta em relação à titulação 21

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formas promastigota flagelada (A) e amastigota sem flagelos livres (B) da *Leishmania*. spp. Fonte: <http://alunosonline.uol.com.br/biologia/doencas-causadas-por-protozoarios-2.html> 2
- Figura 2.** Localização geográfica dos municípios de Itaguaí e Seropédica, Rio de Janeiro. Fonte: <http://www.compuland.com.br/sedec/cba1.html>..... 12
- Figura 3.** Coleta realizada em residência do município de Seropédica em que gatos e cães conviviam no mesmo ambiente..... 13
- Figura 4.** Coleta de sangue com auxílio de toalha grossa (A) e bolsa de *nylon* (B) para contenção de felinos durante a coleta de sangue da veia safena. 14
- Figura 5.** Coleta de sangue na veia cefálica em ambiente de clínica Veterinária, sem métodos de contenção..... 15
- Figura 6.** Amostras de soro de felinos, acondicionadas em frascos do tipo *eppendorf* de 1,0 mL para congelamento. 15
- Figura 7.** (A) Kit TR DPP® para *Leishmania* Visceral Canina. Platarforma plástica com dois poços por onde são conduzidas amostra e solução tampão, ocorrendo a reação. Fonte: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>. (B) Equipamento utilizado para leitura do teste rápido. 16
- Figura 8.** Teste rápido para *Leishmaniose* visceral - TR DPP®. (A) Leitura positiva . Observar a intensidade de cor e definição das linhas formadas na reação de diferentes amostras (20 e 11). (B) Resultado negativo (16). Comparativo entre um resultado não reagente e reagente, mesmo com a intensidade da linha na área de TESTE sendo clara, o que varia conforme a concentração do anticorpo específico (11)..... 21
- Figura 9.** Distribuição, em número, segundo as alterações clínicas sistêmicas, de 44 gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. provenientes dos municípios de Seropédica e Itaguaí..... 23
- Figura 10.** Gatos reagentes na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. (A) Animal com hipertrofia bilateral de tonsilas. (B) Animal com aumento do perímetro abdominal (este gato apresentava hepatoesplenomegalia ao exame ultrassonográfico) 24
- Figura 11.** Gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. (A e B) Animais com opacidade de córnea unilateral. (B) Animal com secreção nasal bilateral de aspecto purulento..... 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Amostra Insuficiente
DESP	Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública
DPP	<i>Dual Plath Plataform</i>
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
F	Fêmea
FELV	Leucemia Viral Felina
FIV	Imunodeficiência Viral Felina
HVPA	Hospital Veterinário de Pequenos Animais
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
M	Macho
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SP	São Paulo
TR	Teste Rápido
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Agente Etiológico.....	2
2.2 Vetores	3
2.3 Hospedeiros e Reservatórios	4
2.4 Transmissão.....	5
2.5 Doença no Brasil e no Mundo.....	5
2.6 Aspectos Clínicos da Doença em Gatos.....	6
2.7 Métodos de Diagnóstico.....	7
2.7.1 Levantamento epidemiológico	7
2.7.2 Diagnóstico laboratorial	7
2.7.3 Diagnóstico sorológico.....	8
2.7.4 Teste imunocromatográfico.....	9
2.8 Principais diagnósticos diferenciais em felinos.....	10
2.9 Prevenção e controle	10
2.9.2 Leishmaniose visceral em relação ao reservatório doméstico da doença.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Local e Período	12
3.2 Anuência do Proprietário	13
3.3 Animais e Obtenção das Amostras.....	13
3.3.1 Anamnese e Avaliação Clínica	13
3.3.2 Amostras de Sangue	14
3.4 Diagnóstico	16
3.4.1 Teste Rápido Qualitativo.....	16
3.5 Análise Estatística	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 População estudada	20
4.2 Avaliação Clínica – Amostragem geral.....	20
4.3 Teste Rápido DPP® para leishmaniose visceral	20
4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta	21
4.4.1 Sinais Clínicos Em Animais Sororreagentes.....	22
4.4.2 Sorologia RIFI.....	26
4.5 Resultado do ELISA.....	28

5 CONCLUSÕES.....	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa com alto potencial zoonótico, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, classificada em duas formas clínicas: Leishmaniose tegumentar (LT) e Leishmaniose visceral (LV), dependendo da espécie causadora da infecção. Nas Américas, é uma doença transmitida pelas fêmeas de mosquitos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* que, durante o repasto sanguíneo, se infectam por *Leishmania* spp.

A Leishmaniose, uma zoonose reemergente, é um grave problema de saúde pública. Antes considerada uma doença rural, passou a ocorrer em áreas urbanas e periurbanas; esse fato está associado ao aumento da urbanização, proximidade das residências com as regiões de matas, transporte de cães de áreas endêmicas para regiões não endêmicas, e ainda as mudanças climáticas que favorecem a distribuição do vetor *Lutzomyia*.

A doença é prevalente em cães e humanos, e, na maioria das vezes, os humanos desenvolvem a doença pela proximidade com cães infectados. Outros mamíferos como as raposas, pequenos roedores e marsupiais são conhecidos como reservatórios silvestres primários da enfermidade na forma visceral. Outras espécies como equinos e felinos são consideradas como hospedeiros acidentais para as diferentes formas da doença.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o mundo, a prevalência da enfermidade em humanos é de aproximadamente 12 milhões de casos, além da estimativa de que anualmente ocorram 1,5 a 2 milhões de novos casos.

Os felinos passaram a ser alvo de estudos envolvendo a Leishmaniose após a ocorrência de infecções esporádicas. Considera-se que esta espécie apresenta relevância considerável como hospedeiros da doença, uma vez que houve um aumento no número de felinos adotados como animais de estimação, aumentando assim a proximidade dessa espécie com o homem, e ainda pelos hábitos comportamentais que coincidem com os hábitos noturnos dos flebotomídeos, o que aumenta as chances de contaminação desses animais e posterior transmissão para os humanos.

Apesar dos relatos da ocorrência de Leishmaniose em felinos, a literatura é escassa no que diz respeito à pesquisa de *Leishmania* nesses animais de áreas endêmicas, sendo possível que infecções em gatos sejam relativamente comuns em algumas dessas regiões. Associado a este fator, é possível que Médicos Veterinários possam subdiagnosticar a Leishmaniose felina por esta estar associada a outras doenças infecciosas, e ainda pela ausência de sinais clínicos patognomônicos.

Por esta razão, o presente estudo teve por objetivo estimar a sua ocorrência por meio da pesquisa de imunoglobulinas anti-*Leishmania* spp.; adequar a reação de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático ELISA para a pesquisa de anticorpos felinos e verificar a empregabilidade do teste rápido imunocromatográfico TR-DPP®, bem como, comparar os dados sorológicos aos aspectos clínicos da Leishmaniose em gatos provenientes de áreas endêmicas dos municípios de Seropédica e Itaguaí no Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente Etiológico

As Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de caráter zoonótico, causadas por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*, dos quais muitas espécies são patogênicas para o homem e outros animais. Dependendo da espécie e da relação do parasito com o hospedeiro, podem manifestar diversas formas clínicas (PIRAJÁ et al., 2013).

O parasito apresenta-se de duas formas evolutivas principais (Figura 1): promastigota ou extracelular, flagelada, presente no vetor invertebrado, e amastigota, a forma intracelular sem flagelo livre presente no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (REY, 2001).

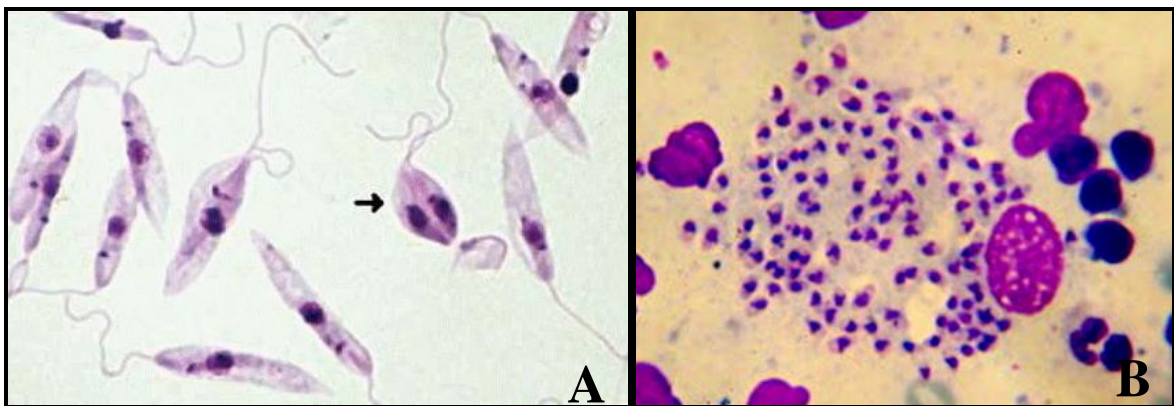


Figura 1. Formas promastigota flagelada (A) e amastigota sem flagelos livres (B) da *Leishmania*. spp. Fonte: <http://alunosonline.uol.com.br/biologia/doencas-causadas-por-protozoarios-2.html>

Há diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania*: nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana, e 8 espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil, já foram identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2013)

As três principais espécies são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás); *Leishmania (Viannia) guyanensi* – aparentemente limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas. Principalmente encontrada em florestas de terra firme, em áreas que não se alagam no período de chuvas; *Leishmania (Viannia) braziliensis* – tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Na Amazônia, a infecção é usualmente encontrada em áreas de terra firme. A *Leishmania braziliensis*, é a principal causadora da Leishmaniose tegumentar americana ou Leishmaniose cutânea, ocorre principalmente em humanos, acometendo pele e mucosas, mas sua evolução é benigna. Pode ser encontrada em todo o país, está associada a presença de animais domésticos e seu principal vetor é a *Lutzomia intermedia* (BRASIL, 2013)

Leishmania (Leishmania) chagasi ou *L. infantum* é a causadora da Leishmaniose visceral, ocorre em todo o território nacional e conhecida como calazar. Manifesta-se como a

forma mais grave da doença, de forma sistêmica que pode levar à morte. O cão (*Canis familiaris*) na área urbana é a principal fonte de infecção, uma vez que a ocorrência e prevalência têm precedido e sido maior nesta espécie quando comparado aos casos humanos. No ambiente silvestre os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, a transmissão acontece principalmente por duas espécies de vetores: *Lutzomyia longipalpis* (principal transmissor da *Leishmania chagasi*) e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL, 2014).

2.2 Vetores

Os flebotomos são insetos pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae e à Subfamília Phlebotominae. Entre os 13 gêneros atualmente aceitos, apenas dois apresentam importância na medicina humana e na veterinária, conhecidos como *Phlebotomus* sp. no Velho Mundo, e *Lutzomyia* sp. no Novo Mundo. Das 700 espécies de flebotomos conhecidas, 50 são capazes de atuar como vetores de *Leishmania* sp. (AFONSO; ALVES-PIRES, 2008).

Os flebotomíneos são dípteros muito pequenos e frágeis, de grande importância médico-veterinária. Eles podem atuar como vetores de diferentes patógenos para animais e seres humanos, incluindo vírus, bactérias e protozoários. Os flebotomíneos, em particular, são os principais vetores de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Quadro 1), que causam um grupo de doenças geralmente referidas como Leishmanioses (DANTAS-TORRES, 2014).

Quadro 1. Agentes, vetores e reservatórios de *Leishmania* spp. de ocorrência no Brasil

Doença	Agente	Vetor	Reservatório
Leishmaniose tegumentar	<i>Leishmania braziliensis</i> <i>Leishmania guyanensis</i> <i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Lutzomyia intermedia</i> <i>L. flaviscutellata</i> <i>L. whitmani</i> <i>L. umbratilis</i> <i>L. wellcome</i> <i>L. migonei</i>	Roedores Marsupiais Canídeos Silvestres Edentados
Leishmaniose visceral	<i>Leishmania chagasi</i> (ou <i>L. infantum</i>)	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Marsupiais Raposas Cães

Adaptado de Zoonosis Parasitárias: Protozoonosis / Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.

A transmissão da forma cutânea e visceral é estabelecida pelo ato hematófago no momento do repasto sanguíneo realizado pela fêmea do vetor; os machos se alimentam de matéria orgânica vegetal (REY, 1991; GREENE et al., 2006). No Brasil o vetor *Lutzomyia longipalpis* é o responsável pela transmissão da *L. infantum*, que é o protozoário causador da LV; e a *L. intermedia*, é a principal espécie que transmite outros protozoários como a *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*, *L. gianensis* que causam a doença tegumentar ou cutânea (REY, 2001).

Os flebotomíneos conhecidos como: “mosquito palha”, “birigui”, “tatuquiras” (FEITOSA et al., 2000), “asa dura”, “asa branca” e “cangalhinha” (BRASIL, 2006) medem entre 2 e 3 mm, são menores que os pernilongos comuns, têm coloração castanho claro e o corpo revestido por pelos. São insetos de vôos curtos e silenciosos, com grandes asas pilosas

inclinadas para trás e para cima, facilmente reconhecidos pela forma como pousam, com as asas eretas e entreabertas. Têm hábitos peridomiciliares e intradomiciliares, fazendo repasto ao entardecer e ao anoitecer (REY, 2001).

O aparelho bucal das fêmeas é do tipo sugador, contendo ductos salivares responsáveis por sintetizar uma saliva rica em biomoléculas que facilitam a implantação da *Leishmania* spp. nos canais de inoculação no hospedeiro (SANTOS, 2006).

Para desenvolvimento do ciclo biológico é importante a existência de matéria orgânica úmida e local sombreado para completar os estágios larvais. A sobrevivência é de 20 a 45 dias, sendo que o período de desenvolvimento até a fase adulta é de 30 dias (SÃO PAULO, 2006). A fêmea faz a oviposição em locais como tocas de roedores, fendas na parede, lixo doméstico e árvores velhas (CABRERA, 1999).

As fêmeas se alimentam de uma ampla variedade de animais vertebrados de sangue quente, entretanto têm predileção por aves, geralmente, galinhas domésticas (*Gallus gallus*), que não mantêm a infecção por *Leishmania* spp.. Por isso, não são consideradas fontes de infecção, somente funcionam como elementos importantes para a manutenção do vetor no meio ambiente. Vale ressaltar que a presença de animais domésticos e silvestres em áreas peridomiciliares atrai uma variedade de espécies de flebotomíneos que contribuem para a agregação das espécies de vetores nas áreas rurais e peridomiciliares (ALEXANDER et al., 2002; COUTINHO et al., 2004; COUTINHO, 2005; BRASIL, 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006).

2.3 Hospedeiros e Reservatórios

Os mamíferos são o grupo de animais mais afetados pela infecção por *Leishmania* sp. (CAMPINO; MAIA, 2010).

Um hospedeiro pode ser considerado um reservatório se não for capaz de eliminar o parasita e se for responsável pela transmissão do mesmo a indivíduos da mesma ou de outra espécie. Contudo, quando várias espécies de hospedeiros suscetíveis à infecção, habitam o mesmo biótopo é difícil determinar qual delas se comporta como reservatório, primário e secundário ou se são apenas acidentais (MAIA; CAMPINO, 2011).

Em algumas ocasiões existem dois reservatórios, como no caso de ciclos de transmissão peridoméstica e silvestre ligadas pelo mesmo vetor responsável pela transmissão em ambos. Este fenômeno é observável em algumas áreas endêmicas de Leishmaniose onde os cães representam o papel de reservatório peridoméstico e as raposas de reservatório silvestre (ABRANCHES et al., 1984).

De acordo com Campino e Maia (2012), em áreas endêmicas de leishmaniose, os gatos, assim como os cães, são suscetíveis à infecção por *Leishmania* sp.. Estes animais cumprem vários requisitos necessários para poderem ser considerados reservatórios como: estar em estreito contato com o vetor, apresentar hábitos crepusculares, ter preferência por abrigos isolados e em áreas de vegetação, se abrigarem em locais propícios para o desenvolvimento do vetor; viverem em estreito contato com o homem; apresentarem parasitos no sangue periférico e na pele (MAROLI et al., 2007; SILVA et al., 2010).

Nos ambientes silvestres, canídeos como raposas (*Dusicy onvetulus* e *Cerdocy onthous*) e o marsupial (*Didelphis albiventris*) são considerados as principais fontes de infecção. Nos ambientes domésticos o cão apresenta-se como a principal fonte de infecção (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Nos últimos anos tem sido sugerido que o gato possa desempenhar algum papel na epidemiologia da leishmaniose zoonótica, apesar de diferentes autores definirem o gato como hospedeiro acidental ou reservatório, primário ou secundário, da infecção por *Leishmania* sp.

Pelo fato dos gatos viverem intimamente em contato com os cães, que é a única espécie animal comprovadamente reservatória da LV, é difícil determinar o papel do gato na manutenção e disseminação desta parasitose (MANCIANTI, 2004; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; MAIA et al., 2008). Na leishmaniose tegumentar, o cão é considerado apenas um hospedeiro, já na leishmaniose visceral é incriminado como principal reservatório da doença (BRASIL, 2014).

2.4 Transmissão

A transmissão acontece através da picada de uma das várias espécies de flebotomíneos pertencentes a diferentes gêneros de *Lutzomya*. Não é uma doença contagiosa, ou seja, não existe transmissão por contato entre pessoas, porém já existem casos confirmados de transmissão por via transplacentária, transfusões sanguíneas e pela monta natural (PENNISI, 2015).

O vetor *Lutzomya*, ao picar um animal ou um homem infectado, suga, juntamente com o sangue, o parasito (*Leishmania*) em sua forma amastigota intracelular. No interior do aparelho digestório do vetor ocorre a transformação e multiplicação para a forma promastigota flagelada (REY, 2001). Ao picar outro homem ou animal sadio, o flebotomíneo inocula o parasito nas formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp., as quais utilizam a capacidade de fagocitose das células dendríticas e dos macrófagos que se situam no tecido cutâneo, e diferencia para as formas amastigotas. O parasito permite a sua fagocitose por estas células mas interfere com os mecanismos microbicidas das mesmas (LOVE et al., 1998). As formas amastigotas multiplicam-se no interior das células hospedeiras e, após a lise do macrófago ou por exocitose migram para outras células do sistema mononuclear fagocitário, iniciando-se novamente o mesmo ciclo de proliferação e lise celular. No interior destas células o protozoário aloja-se em organelas específicos como os fagolisossomos, nos quais têm os nutrientes necessários ao desenvolvimento e proliferação (BURCHMORE; BARRETT, 2001; NADERER; MCCONVILLE, 2008). Dependendo do tropismo de cada espécie de *Leishmania* e do sistema imunitário do hospedeiro, os parasitos fagocitados podem permanecer no tecido subcutâneo, dando origem às formas clínicas de LC, ou invadir as células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, fígado, medula óssea, gânglios linfáticos e outros órgãos linfoides, causando a LV (BOWMAN et al., 2002; MAIA; CAMPINO, 2011).

Os hábitos noturnos de caça e a vida livre dos felinos domésticos coincidem com o período de repasto sanguíneo das fêmeas. Além do mais os flebotomíneos não demonstram ter preferência por espécies, e sim a disponibilidade do hospedeiro, que é o fator mais atrativo. Atualmente, para os gatos, outras vias de transmissão incluindo horizontal e vertical, ainda não foram confirmadas, como já o foram para os cães e humanos (PENNISI, 2015; FREITAS et al., 2006; NAUCHE; LORENTZ, 2012).

2.5 Doença no Brasil e no Mundo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo que 14 milhões estão diretamente afetadas pela doença. Mundialmente surgem de 900 mil a 1,3 milhão de novos casos por ano, sendo que desses, 200 a 400 mil são de LV e 700 mil a 1,3 milhão de casos são de Leishmaniose cutânea. Todos os anos, morrem de 20 a 30 mil pessoas vítimas de leishmaniose (WHO, 2016)

Descrita em 98 países e em três continentes, exceto Austrália e Antártica (LARSON et al., 2016) a Leishmaniose é uma doença de notificação obrigatória em 33 países. A ocorrência vem aumentando principalmente em países onde a população é imunossuprimida (MANSUETO et al., 2014). Crianças de até 10 anos, e em alguns casos idosos, são os mais acometidos (PACE, 2014).

A Leishmaniose está concentrada em países subdesenvolvidos: 90% de todos os casos foram descritos no Afeganistão, Algéria, Arábia Saudita, Irã, Sudão, Síria, Brasil e Peru (WHO, 2016). É uma doença de difícil diagnóstico e tratamento, principalmente em áreas não endêmicas, em que os médicos não estão familiarizados com o quadro clínico da doença, além de as alterações clínicas serem semelhantes a outras enfermidades (BORGHI et al., 2016).

Poucas drogas estão disponíveis para o tratamento da Leishmaniose e, nenhuma pode ser considerada ideal, por sua alta toxicidade, longa duração do tratamento e severas reações adversas, que frequentemente levam ao abandono do tratamento. Além disso, a maioria das drogas utilizadas não elimina totalmente o parasito (MENEZES et al., 2015).

2.6 Aspectos Clínicos da Doença em Gatos

A infecção natural em um gato doméstico de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de LV foi descrita em 1912, na Argélia. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasito na medula óssea, sem a identificação da espécie (SERGENT et al., 1912).

Nos gatos, é importante ressaltar que a doença clínica e até mesmo a infecção subclínica são menos frequentes em relação as casos relatados em cães. Na verdade, a soroprevalência da infecção por *Leishmania* em gatos da mesma região que cães é menor. Estudos epidemiológicos demonstram que a resposta imune dos felinos é mais eficiente, o que leva a certa resistência natural, que pode falhar na maioria das vezes associada a outras infecções (SILVA et al., 2008).

A maioria dos cães infectados não apresenta sinais clínicos aparentes (pelo menos por um período) e esses animais podem ser fonte de infecção para os flebotomíneos e eventualmente para os gatos, nos quais os sinais clínicos relacionados ainda não estão bem definidos (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994)

Em gatos a infecção por *Leishmania* spp. pode ser agravada por fatores imunossupressores como infecção por imunodeficiência viral felina (FIV) e leucemia viral felina (FeLV). O fato de os gatos raramente manifestarem a doença, é também um fator que demonstra resistência desses indivíduos. Além disso, a população de gatos errantes pode ser maior do que a de cães em algumas áreas endêmicas, fato que aumenta a chance de estarem expostos ao vetor (PENNISI, 2015).

Estudos recentes têm mostrado que a porcentagem de gatos infectados por *Leishmania* spp. não é desprezível em algumas regiões endêmicas. A infecção pode persistir por períodos muito longos e os gatos tornam-se, portanto, uma potencial fonte de infecção, cumprindo portanto o papel de transmissores de *Leishmania* em certas áreas (PIRAJÁ et al., 2013).

Os sinais clínicos mais comuns em felinos com Leishmaniose incluem lesões cutâneas ou mucocutâneas e linfadenomegalia, que pode ser solitária ou multicêntrica. Sobrinho (2010) demonstrou que alguns gatos manifestam apenas lesões isoladas, enquanto outros não apresentaram lesões cutâneas detectáveis. Lesões oculares são comumente encontradas em gatos como uveíte unilateral ou bilateral, padrão granulomatoso e, eventualmente, blefarite (VIDES et al., 2011).

A gengivoestomatite crônica também vem sendo diagnosticada em muitos felinos com a infecção por *Leishmania* spp. As lesões nodulares são frequentemente vistas na mucosa gengival ou na língua, onde macrófagos infectados podem ser visualizados em biópsias.

Além da ocorrência de outras manifestações clínicas esporádicas, incluindo: mucosas pálidas, hepatomegalia, icterícia, caquexia, febre, vômitos, diarreia, descarga nasal crônica, esplenomegalia, poliúria/polidipsia, dispneia, sibilos, aborto e hipotermia (PENNISI, 2015) alguns sinais inespecíficos tais como perda de peso, apetite reduzido, desidratação e letargia também foram relatados (LEIVA et al., 2005).

As alterações dérmicas em um padrão focal, multifocal, regional ou difuso, simétricas ou assimétricas incluem nódulos, ulcerações, ou mais raramente, dermatite esfoliativa (PENNISI, 2015). Alguns gatos podem manifestar diferentes tipos de lesões ao mesmo tempo, ou desenvolvê-las posteriormente; elas podem coexistir como lesões mucocutâneas, cutâneas e nódulos de tamanho variável, geralmente localizados na cabeça, incluindo pálpebras, nariz e lábios ou nas partes distais dos membros. Nódulos também foram relatados na mucosa anal e são geralmente pequenos (menos de 1 cm), indolores ou pruriginosos, e têm uma superfície normal, ulcerada ou alopecica (CÂNDIDO, 2007).

Dermatite esfoliativa, alopecia, pápulas hemorrágicas e nódulos onde se encontram a forma amastigota da *Leishmania*, comuns em cães, são pouco frequentes na doença felina, e pode estar associada a outras infecções como a demodicose. As lesões dermatológicas em felinos aparentemente são menos pruriginosas que as do cão, e outras causas compatíveis como alergias e neoplasias podem coexistir, o que dificulta ou retarda o diagnóstico (PENNISI, 2015). A implicação da *Leishmania* como causa de alguns destes sinais clínicos têm sido associados à presença do parasito em exames citológicos ou histopatológicos de fígado, baço e gânglios linfáticos. No entanto, a doença é comumente associada a uma aqueda na resposta imune, incluindo as infecções retrovirais (FIV e FeLV). Este fato pode influenciar na apresentação clínica e no prognóstico da enfermidade (PENNISI, 2015).

2.7 Métodos de Diagnóstico

2.7.1 Levantamento epidemiológico

A identificação dos vetores, a avaliação da infectividade dos flebotomíneos, bem como a determinação das taxas de infecção natural das diferentes espécies de animais, são essenciais para o estudo epidemiológico da doença, e também para a adoção de medidas de prevenção e controle desta parasitose (MICHALSKY et al., 2002).

2.7.2 Diagnóstico laboratorial

A maioria das técnicas diagnósticas para a infecção por *Leishmania* disponíveis para cães também são empregados em gatos. O diagnóstico é feito, na maioria dos casos, por testes sorológicos (preconizados pelo Ministério da Saúde), exames citológico e histológico, cultura e PCR.

O diagnóstico parasitológico se baseia na demonstração do parasito em material biológico obtido por punção hepática, esplênica, de linfonodos, de medula óssea e biópsia ou escarificação de pele, visto que o diagnóstico sempre deve ser bem direcionado mediante a suspeita. Em caso de LT, o parasito encontra-se restrito ao local da lesão, já na LV podemos encontrar o parasito na pele íntegra e/ou em órgãos (BRASIL, 2014). Entretanto, alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são invasivos, significando a ocorrência de riscos para o animal e também impraticáveis em programas de

saúde pública, em que um grande número de animais devem ser avaliados em curto espaço de tempo (BRASIL, 2014).

A cultura não é uma técnica de fácil realização, mas é a melhor técnica para isolar e identificar o parasito, e o material é obtido por aspirado feito em órgãos ou a partir de lesões cutâneas (HANDLER et al., 2015).

O método parasitológico direto é um método de diagnóstico seguro, uma vez que o resultado positivo é dado pela visualização direta de formas amastigotas do parasito em preparados citológicos. É considerado por alguns autores como o teste ouro para o diagnóstico da doença, devido à sua rapidez, baixo custo e facilidade de execução (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SOARES, 2012; HANDLER et al., 2015). A especificidade do método e de aproximadamente 100%, sendo que a sua sensibilidade pode ser baixa e dependente do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (BRASIL, 2014).

2.7.3 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico é baseado em uma investigação da infecção em um único indivíduo ou em uma população, e consiste na detecção e quantificação dos anticorpos anti-*Leishmania* que estão circulantes no plasma/soro sanguíneo. Os testes sorológicos são de fácil execução, rápidos, de baixo custo operacional e podem ser automatizados; os principais são Ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência (RIFI) (TEVA et al., 2009; SILVA, 2012), e mais recentemente os testes imunocromatográficos.

Os métodos sorológicos para Leishmaniose demonstram especificidade e sensibilidade elevadas, o que é particularmente desejável. Ainda são descritos problemas de reações cruzadas com outras doenças como: tripanossomíases, erlichiose, rickettsiosis e toxoplasmose (BARROURIM-MELO et al., 2006; GOMES et al., 2008; FERREIRA et al., 2007). Por esta razão, métodos com níveis mais adequados e mais modernos, com uma maior sensibilidade e especificidade são desejáveis (SILVA, 2012).

A RIFI foi considerada, por muitos anos, o padrão ouro, e técnica de referência no diagnóstico da LVC (BONI et al., 1999; LAMOTHE et al., 2004; GOMES, et al., 2008; MAIA, 2008). É um teste de análise quantitativa (MIRÓ et al., 2008) que apresenta baixa especificidade, exige pessoal treinado e equipamentos específicos, sendo uma reação dispendiosa, não adequada em larga escala (GONTIJO; MELO, 2004) e de interpretação subjetiva (BOARINO et al., 2008). Tem como uma de suas principais limitações a ocorrência de reações cruzadas com outras doenças como: leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, toxoplasmose e erlichiose (BARROURIM-MELO et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; GOMES et al., 2008). Outro problema está na presença de uma grande janela de detecção em casos de doença inicial, ou seja, um período de incerteza, sendo o teste pouco eficaz na detecção de casos precoces (BOARINO et al., 2008).

O ELISA é o teste mais utilizado, por ser rápido, de fácil execução, fácil leitura e de fácil adaptação a diversos antígenos. Pode ser utilizado para um grande número de amostras, em inquéritos epidemiológicos (MAIA et al., 2008). Em comparação com a RIFI, é considerado um método mais sensível embora menos específico. Permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, sendo pouco preciso para detecção no caso cães em estágio subclínico e ainda em cães assintomáticos (EVANS et al., 1990). É um método quantitativo, o que limita a subjetividade na interpretação dos resultados (BONI et al., 1999). Apesar da elevada capacidade de detecção dos ensaios enzimáticos, um fator determinante para bons resultados é a natureza do antígeno empregado (MAIA et al., 2008).

Em geral, os anticorpos anti-*Leishmania* devem ser avaliados por laboratórios que utilizem métodos sorológicos validados para gatos. Como em cães, existem reações cruzadas entre anticorpos felinos de diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, mas não parecem ocorrer com anticorpos contra *T. gondii* (ARRAIS et al., 2008).

O diagnóstico precoce da doença é muito difícil, pois, na maioria das vezes, os cães e gatos permanecem assintomáticos por um longo período de tempo. Em associação com a dificuldade de diagnóstico, existe a correlação da doença com baixos padrões socioeconômicos, fatores que vêm associados a animais com baixo peso corporal, desnutrição e problemas dermatológicos (BRASIL, 2016).

Os métodos de diagnóstico sorológico são ainda, as ferramentas mais realistas e aplicáveis nas pesquisas epidemiológicas e clínicas para identificação de cães e gatos infectados (ANDRADE et al., 2007), portanto, devem demonstrar adequada especificidade e sensibilidade, evitar resultados falso positivos ou negativos, que podem levar à transmissão da doença canina e humana ou à eutanásia desnecessária de um cão normal (BARROURIM-MELO et al., 2006; GOMES et al., 2008; FERREIRA et al., 2007). A pesquisa de métodos mais eficientes, e ao mesmo tempo melhor aplicáveis, principalmente em larga escala, torna-se importante no intuito de identificar o reservatório, o que é primordial para o controle da doença (TESH, 1995).

2.7.4 Teste imunocromatográfico

Os testes imunocromatográficos são simples, rápidos e fáceis de serem utilizados. O DPP Leishmaniose Visceral Canina - Bio-Manguinhos® é um ensaio de triagem, que foi desenvolvido pela empresa norte-americana Chembio e transferida para a empresa nacional, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, Brasil (<http://www.chembio.com/newtechnologies.html>).

O TR DPP® é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K28 (fragmentos K26, K39 e K9) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *Leishmania infantum* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas (*Leishmania donovani* e *L. infantum*). A presença do anticorpo anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatada reação cruzada com outros tripanossomatídeos (FUNED, 2013). Emprega uma combinação única de antígenos recombinantes para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* em cães, e teoricamente pode ser utilizado nas diferentes espécies, devido à utilização, como conjugado do ouro coloidal, a proteína A de *Staphylococcus aureus*, que é um fator de virulência produzido por esta espécie de microrganismo que se liga à fração Fc de anticorpos de diferentes espécies (CHOE, et al, 2016).

Este novo protocolo de diagnóstico veio para facilitar o controle da doença e agilizar o serviço de diagnóstico realizado por equipes a campo. Podem ser utilizadas em amostras de sangue total, plasma ou soro. Um resultado reagente deve ser confirmado por ELISA conforme recomendações do Ministério da Saúde (FUNED, 2013).

2.7.5 Diagnóstico Molecular

Por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do parasito. A PCR apresenta sensibilidade e especificidade muito elevadas, sendo as suas principais desvantagens o alto custo e a necessidade de laboratórios bem equipados (REITHINGER et al., 2007).

Os métodos moleculares têm sido amplamente desenvolvidos na última década e apresentam bons resultados para o diagnóstico das leishmanioses; a PCR é a mais apropriada

(REITHINGER et al., 2007). Além de esta técnica apresentar um custo elevado e a necessidade de um laboratório com infraestrutura específica e mão de obra especializada não permite sua utilização em diagnóstico de campo; muito se tem investido em pesquisa baseada com PCR na última década (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; BRASIL, 2010; SOARES, 2012).

Muitas vezes, a pequena quantidade de parasitos na lesão dificulta sua detecção e leva a uma sensibilidade variável das técnicas convencionais, entretanto, pela biologia molecular haverá uma maior sensibilidade (REITHINGER; DUJARDIN, 2007, SOARES, 2012). Este teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula, aspirados de linfonodos, sangue e urina e biópsias de pele, tendo como vantagem ser um método menos invasivo (FARIA et al., 2012).

2.8 Principais diagnósticos diferenciais em felinos

Os principais diagnósticos diferenciais para Leishmaniose em felinos com características dermatológicas seriam: alterações nodulares causadas por criptococose, histoplasmose, granuloma estéril ou eosinofílico, tuberculose, escabiose, uma grande variedade de neoplasias cutâneas (sarcoide felino, tumor de mastócitos, fibrossarcoma, carcinoma de células escamosas e linfoma), esporotricose entre outras (PENNISI, 2015).

No Rio de Janeiro, a ocorrência de uma epidemia de esporotricose acometendo cães, gatos e seres humanos (BARROS et al., 2001; BARROS et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004, SCHUBACH et al., 2006) vem dificultando o diagnóstico das leishmanioses. No período 1998-2004, foram atendidos 44 cães com diagnóstico de esporotricose (SCHUBACH et al., 2006) e 60 com diagnóstico de leishmaniose no Serviço de Zoonoses do IPEC. Devido à sobreposição de áreas endêmicas e à semelhança clínica entre ambas as doenças em diferentes estágios de infecção, a esporotricose vem se tornando o principal diagnóstico diferencial para LTA canina no Rio de Janeiro. Na rede de atenção básica à saúde humana, o diagnóstico diferencial entre esporotricose e LTA costuma ser realizado com base em evidências epidemiológicas, aspecto clínico da lesão, reação intradérmica e, eventualmente, na sorologia para leishmaniose. Estudos preliminares demonstraram que, semelhante ao observado na doença humana (BARROS et al., 2005), cães com esporotricose podem apresentar intradermorreação e sorologia para leishmaniose positivas (SCHUBACH et al., 2001b; SANTOS et al., 2004). Tais resultados sugerem que, ao considerar o diagnóstico diferencial entre LTA e esporotricose caninas, é necessário a demonstração do agente etiológico (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; PIRMEZ et al., 1988a; HELLER; SWARTZ, 1994).

2.9 Prevenção e controle

Em regiões endêmicas, no caso de transmissão intra e peridomiciliares, são utilizados repelentes contendo deltametrina e cipermetrina, que são eficazes na prevenção da picada do inseto. O controle químico oferece proteção coletiva. Esta medida é dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana, e conseqüentemente, diminuir o risco de transmissão da doença. O uso de telas protetoras de malha fina, roupas longas e de cor clara, uso de repelentes são preconizadas pela OMS como métodos de proteção individual. No ambiente, deve-se evitar a exposição em horários de repasto do vetor, realizar limpeza dos quintais e terrenos, podar árvores, de modo a aumentar a insolação, a fim de diminuir o sombreamento do solo e evitar as condições favoráveis (temperatura e umidade) ao desenvolvimento de larvas de

flebotomíneos, dar o destino adequado ao lixo orgânico, a fim de impedir a aproximação de mamíferos, comensais, como marsupiais e roedores, que são prováveis fontes de infecção para os flebotomíneos, realizar limpeza periódica dos abrigos de animais domésticos, e manter os animais domésticos distantes do intradomicílio durante a noite, de modo a reduzir a atração dos flebotomíneos para este ambiente (BRASIL, 2010; WHO, 2016).

Coleiras impregnadas com deltametrina a 4% têm sido utilizadas em cães, e juntamente com o controle do vetor, são intervenções efetivas na redução da prevalência de LV. Em condições experimentais, diversos trabalhos demonstraram a eficácia na utilização de coleiras impregnadas com inseticida como medida de proteção individual para os cães contra picadas de flebotomíneos (PALATNIK et al., 2009; BRASIL, 2014).

Todas as medidas de prevenção conhecidas e utilizadas para fins de proteção coletiva e individuais em humanos e cães também deverão ser estendidas aos gatos.

2.9.1 Leishmaniose tegumentar em relação aos hospedeiros da doença

Especificamente como método de prevenção e controle da LT é importante atentar para a diversidade de agentes, de reservatórios, de vetores e a situação epidemiológica da LT. Aliado a estes fatores, o conhecimento, ainda insuficiente, sobre vários aspectos da doença, evidencia a complexidade do controle desta endemia. É importante delimitar e caracterizar a área de transmissão e instituir as medidas de controle, destacando-se que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos são essenciais (BRASIL, 2013).

No caso da LT, não são recomendadas ações de controle para hospedeiros silvestres ou domésticos e não há indicação de eutanásia do animal sororreagente; isso se aplica apenas quando existe grave acometimento e lesões severas que levam o animal ao sofrimento (BRASIL, 2013).

2.9.2 Leishmaniose visceral em relação ao reservatório doméstico da doença

O controle da LV baseia-se principalmente na eutanásia de cães positivos, o que é uma medida muito controversa. Por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado o registro do produto Milteforan® Virbac para o tratamento de cães positivos para Leishmaniose visceral. Esta medicação não é utilizada para tratamento da doença em humanos. Cabe destacar que o tratamento de cães com LVC não se configura como uma medida de saúde pública para controle da doença e, portanto, trata-se única e exclusivamente de uma escolha do proprietário do animal, de caráter individual (MAPA, 2016).

O uso de coleiras impregnadas com inseticidas, a vacinação de cães anti-Leishmaniose visceral canina, a notificação da vigilância estadual, referente ao local de provável infecção, vigilância e monitoramento de áreas, e a eutanásia nos cães sororreagentes, são medidas que contribuem significativamente para diminuir a soroprevalência da infecção em cães e humanos (BRASIL, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (Protocolo número 4336290516 conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

3.1 Local e Período

O municípios de Seropédica e Itaguaí possuem um clima caracterizado como tropical, com estação seca e chuvas no verão (Aw) e estação de inverno bem definida segundo a classificação de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007). Este clima apresenta temperatura média do mês mais frio do ano $>18^{\circ}\text{C}$ e temperatura média máxima acima de 25°C .

Segundo informações divulgadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), após o Censo 2010, as populações de Itaguaí (100.362) e Seropédica (76.045), somadas, totalizam 176.407 habitantes (IBGE, 2010).

Essa microrregião é cortada por diferentes rodovias, o que facilita o deslocamento de pessoas entre os municípios, assim como o desenvolvimento de atividades econômicas ou de turismo na região. Além disso, faz divisa com diversos municípios (Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Queimados, Japeri, Paracambi, Pirai, Rio Claro e Angra dos Reis).



Figura 2. Localização geográfica dos municípios de Itaguaí e Seropédica, Rio de Janeiro. Fonte: <http://www.compuland.com.br/sedec/cba1.html>

As amostras foram obtidas durante o período de março a novembro de 2016, de gatos de abrigos, de residências de proprietários acumuladores e atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA) da UFRRJ; todos provenientes dos municípios de Itaguaí e Seropédica, localizados no estado do Rio de Janeiro, na região compreendida entre a Baixada Fluminense e a região da Costa Verde, RJ.

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP) – Instituto de Veterinária da UFRRJ, e o diagnóstico de Leishmaniose realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico do

Departamento de Ciências Biológicas - Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ, durante os meses de janeiro a abril de 2017.

3.2 Anuência do Proprietário

Antes da coleta das amostras os proprietários foram entrevistados e informados dos objetivos do projeto e permitiram a utilização dos exames laboratoriais, os registros fotográficos e o exame clínico dos seus gatos. Em concordância assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A).

3.3 Animais e Obtenção das Amostras

Foram avaliados 255 felinos, machos e fêmeas, sem distinção de raça, quanto ao estado de saúde, com idade a partir de 6 meses, sendo 148 provenientes de abrigos e residências de proprietários acumuladores e 107 animais atendidos no setor de felinos do HPVA.

3.3.1 Anamnese e Avaliação Clínica

Inicialmente os proprietários foram inquiridos a respeito do manejo, comportamento e habitat dos animais, bem como sobre a presença de outros animais, ou de espécies contactantes (Figura 3). A seguir, os animais foram submetidos a uma avaliação clínica geral e específica conduzida conforme Feitosa (2014), com ênfase na avaliação das frequências cardíaca e respiratória, escore corporal, presença de ectoparasitas, presença e características de dermatopatias, hepatoesplenomegalia e presença de linfonodos reativos. Os dados pessoais dos proprietários e dos animais, juntamente com as informações obtidas na anamnese e na avaliação clínica foram registradas em formulários individuais (ANEXO B), para posterior correlação com os resultados do diagnóstico.



Figura 3. Coleta realizada em residência do município de Seropédica em que gatos e cães conviviam no mesmo ambiente.

3.3.2 Amostras de Sangue

Para coleta de sangue, visando minimizar o estresse do animal, manter a segurança do veterinário, da equipe e do proprietário, os animais dóceis foram contidos com uma toalha grossa e nos animais irracíveis foi utilizada uma bolsa de nylon para contenção (Brasmed®) (Figura 3). Após a contenção foi realizada a tricotomia e a assepsia local. A coleta de sangue foi efetuada por punção venosa da jugular, com agulha calibre 25 x 7 mm, acoplada a uma seringa estéril de 3 mL, para se obter um volume mínimo de 2 mL de sangue. Em alguns animais irracíveis, ou com doenças respiratórias associadas, utilizou-se a veia safena, com escalpe e seringa de 3 mL (Figura 3). Em um animal que foi sedado para realização de procedimento cirúrgico em uma clínica veterinária, foi coletado sangue da veia cefálica e sem auxílio de acessório de proteção (Figura 4). O sangue foi depositado em tubos siliconizados de 4 mL, sem anticoagulante, identificados e mantidos em temperatura ambiente, até o processamento.

No Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ, os tubos foram centrifugados a 3000 rotações por minuto (r.p.m.), durante cinco minutos, para separação do soro, que foi transferido com auxílio de pipeta automática para tubos do tipo *ependorf*, previamente identificados com o número do animal, nome do proprietário e data da coleta (Figura 5). Alíquotas de 1 mL foram congeladas a 80 °C negativos até o momento dos testes diagnósticos (Figura 6).

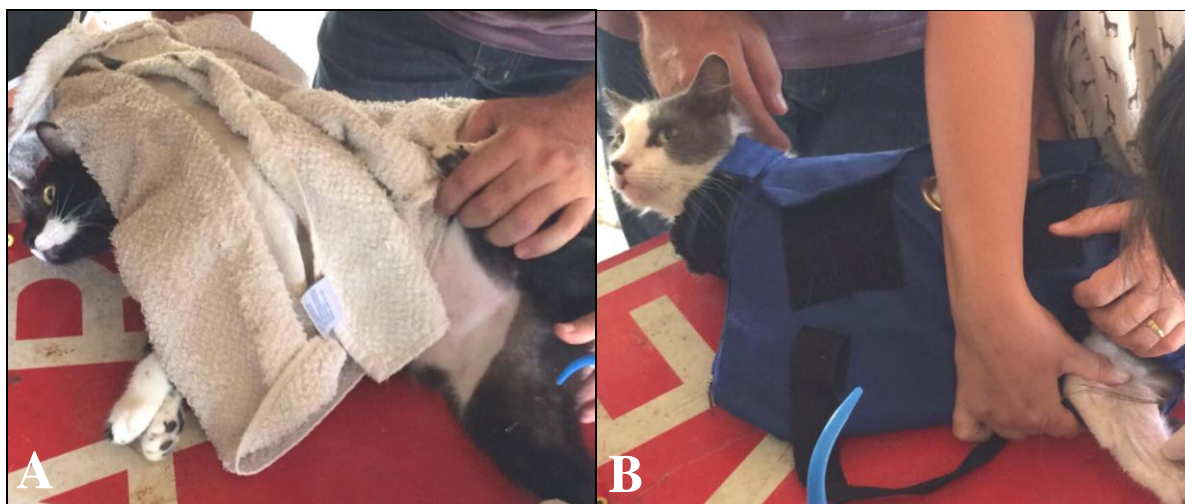


Figura 4. Coleta de sangue com auxílio de toalha grossa (A) e bolsa de *nylon* (B) para contenção de felinos durante a coleta de sangue da veia safena.



Figura 5. Coleta de sangue na veia cefálica em ambiente de clínica Veterinária, sem métodos de contenção.



Figura 6. Amostras de soro de felinos, acondicionadas em frascos do tipo *eppendorf* de 1,0 mL para congelamento.

3.4 Diagnóstico

3.4.1 Teste Rápido Qualitativo

O teste imunocromatográfico utilizando o kit TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina-Bio-Manguinhos (Figura 7) foi realizado como método de triagem, e posteriormente todas as amostras foram testadas sorologicamente.

O conjunto diagnóstico é composto por uma plataforma de base plástica com dois poços que dão acesso a uma tira cada. A primeira tira é condutora da amostra, sendo composta por leito de aplicação da amostra e membrana, e cartão laminado (S1). A segunda tira detecta anticorpos da amostra, sendo composta por leito com conjugado, membrana de absorção residual e cartão laminado (S2). Além disso, o Kit diagnóstico vem acompanhado por um frasco de solução tampão, uma alça para coleta da amostra e uma lanceta. A tira S1 serve para conduzir a amostra à tira S2, onde a reação imunocromatográfica acontece. A tira S2 possui uma linha transversal com antígeno. Se houver anticorpo, forma-se um complexo que liga ao conjugado e aos anticorpos da amostra, produzindo uma coloração rosada, classificando a amostra como reagente. Na ausência desta, não se observa a coloração. O conjugado que não se liga ou continua o percurso ao longo da membrana e passa por uma área contendo anticorpos inespecíficos, corando a região de controle. Este controle serve para demonstrar que a amostra e os reagentes foram devidamente aplicados e que migraram através do dispositivo. O tampão facilita o fluxo lateral e promove a ligação dos anticorpos aos antígenos.



Figura 7. (A) Kit TR DPP® para Leishmania Visceral Canina. Plataforma plástica com dois poços por onde são conduzidas amostra e solução tampão, ocorrendo a reação. Fonte: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>. (B) Equipamento utilizado para leitura do teste rápido.

Neste trabalho, o teste rápido foi realizado com soro, ao invés de sangue total ou plasma. Com uma pipeta coletou-se 10 µL de soro previamente descongelado e aplicou-se no poço de n° 1, adicionando-se em seguida duas gotas de tampão. Após cinco minutos, foram aplicadas quatro gotas do mesmo tampão no poço de n° 2 e aguardou-se 10 minutos. A leitura foi realizada de forma qualitativa e de forma quantitativa, por meio de um leitor específico que transforma intensidade de cor das bandas em números. A reação foi considerada positiva quando houve a formação de um complexo macromolecular colorido (linha visível), banda referente à amostra testada, e uma segunda linha de reação, (linha controle) para validação do teste. O teste foi considerado negativo, quando apenas a banda referente ao controle apareceu. Quando nenhuma banda foi visualizada, o teste foi considerado inválido e repetido,

utilizando-se um novo kit. O teste imunocromatográfico foi realizado no intuito de detectar especificamente, gatos com anticorpos contra *L. infantum*.

O critério utilizado para a leitura do teste (ANEXO C) seguiu as recomendações do manual descrito por Bio-Manguinhos, FIOCRUZ/RJ.

3.4.2 Crescimento e manutenção de *Leishmania (L.) infantum in vitro*, para a produção de antígenos para imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático

A amostra de *L. (L.) infantum chagasi*, (MHOM/BR/1974/PP75), foi mantida através de repiques semanais de culturas de promastigotas em meio bifásico NNN contendo na fase sólida 37g/L de BHI, 2% de ágar e 5% de sangue desfibrinado de coelho e na fase líquida 5 mL de Schneider's (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) suplementado [10% de soro fetal bovino (Nutricell, Brasil), 200 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) e 200 UI/mL de penicilina (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA)]. As culturas foram mantidas em incubadora (BOD-Incubator, FANEM) à temperatura de 28° C.

Com a finalidade de obtenção de antígeno para o ELISA, 5 mL de culturas de promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram transferidas para garrafas de cultura de células (Techno Plastic Products - TPP, Suíça) contendo 50 mL de Schneider's suplementado e incubados à 28 °C por aproximadamente 3 dias. Após esse período as culturas foram quantificadas e repicadas para 300 mL de Schneider's suplementado, mantendo um inóculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL. Após quatro dias de incubação, período inicial da fase estacionária de crescimento (RIBEIRO et al., 2007), as promastigotas foram submetidas à centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos e lavadas 3 vezes em solução salina estéril (NaCl a 0,9%). A suspensão celular resultante da última lavagem foi ressuspensa em tampão PBS com inibidores de protease contendo 1 mM de Iodoacetamida, 1 mM de Fenantrolina e 1 mM de PMSF (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Posteriormente, foi realizada a lise celular constituída por 10 ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento em solução contendo uma parte de gelo seco com uma parte de etanol absoluto (VETEC-Brasil), seguido por um processo de sonicação com somente um ciclo de 45 minutos a 65 Hz. Após, o extrato bruto foi submetido à centrifugação por 14000 rpm por 10 minutos à 4 °C e submetido à mensuração protéica (LOWRY et al., 1951) e estocagem a -20° C até o uso.

Para a realização da RIFI, foram utilizadas formas promastigotas inteiras de *L. (L.) major* crescidas nas mesmas condições descritas anteriormente e fixadas com formalina a 1% em PBS (*Phosphate-buffered saline*), e quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer. As suspensões foram dispostas em cada campo analisado microscopicamente, de forma a fornecer uma quantidade aproximada de 20 a 40 células parasitárias sobre as áreas demarcadas, aproximadamente 12 µL de volume final por poço. Após, as lâminas foram submetidas à secagem em estufa à 37 °C por 1 hora e congeladas até sua utilização.

A) Soros controles

Amostras de soros controle reagente e não-reagente foram cedidas pelo setor de zoonoses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- Fiocruz, setor de zoonoses. O soro controle positivo apresentava exame parasitológico positivo e o soro negativo apresentava exame parasitológico negativo. Para determinar a diluição de corte, os soros controle foram diluídos em 1:40 e 1:80 para RIFI e 1:100, 1:200 e 1:400 no ELISA.

3.4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi desenvolvida de acordo com Camargo e Rebonato (1969). As amostras séricas foram diluídas a 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320, e em seguida, 10 µL foram transferidas para as correspondentes marcações das lâminas. Estas foram incubadas a 37 °C por 45 minutos em câmara úmida. Para a remoção dos soros, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS. Após a secagem das lâminas, foi adicionado o conjugado fluorescente anti IgG felina produzido em coelho (Sigma-Aldrich) diluído à 1:80 em solução 1:10 de PBS-Azul de Evans, seguido de nova incubação e lavagem. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínulas, e observadas em microscópio de fluorescência (CARL-ZEISS, AXIO SCOPE A1) com aumento de 400 vezes.

3.4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A) Determinação da proteína bloqueadora

Foram feitos ensaios imunoenzimáticos utilizando diferentes proteínas para bloquear os espaços da placa de ELISA não ocupados pelo extrato proteico antigênico. Caseína de leite (leite em pó Molico desnatado), lecitina de soja, soro bovino, soro de galinha e albumina bovina ultra purificada (Sigma), foram empregadas em concentrações de 1, 2, 4 e 8%.

B) Titulação pareada de antígeno e conjugado enzimático

O antígeno bruto parcialmente solúvel de *L. (L.) infantum* foi diluído seriadamente em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 a partir de uma concentração de 20 µg/mL, com fator de diluição de 1:2, até a concentração de 0,62 µg/mL. O conjugado anti-IgG peroxidase foi diluído em PBS com 0,05% de Tween-20 e 2% de albumina bovina (Sigma) a partir de 1:1.000 até 1:80.000.

C) Estabelecimento do *cut off*

O estabelecimento do *cut off* foi realizado a partir da análise de três soros padrão não-reagentes e dois soros reagentes, diluídos a 1:200 e distribuídos na placa de ELISA em duplicata. Uma vez obtida a média dos valores de densidade ótica (DO) dos controles não-reagentes, foi calculado o desvio padrão e acrescentado à média, um, dois e três desvios padrão. A melhor separação entre os controles foi alcançada com a soma de dois desvios padrão à média da DO dos controles não-reagentes.

D) Realização do ELISA com as amostras séricas de felinos

O Elisa foi realizado seguindo as modificações da metodologia de Voller et al., (1976). Os ensaios de padronização foram realizados utilizando as seguintes diluições: 1:200 de soros positivos e negativos utilizando as concentrações de 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000 de imunoglobulina produzida em coelho anti-IgG de gato conjugada à peroxidase (Sigma- Aldrich). Foi utilizado ainda, como conjugado proteína A peroxidase (Sigma-Aldrich) nas seguintes concentrações 1:2500, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000, utilizado as diluições de 1:100, 1:200 e 1:400. Foram empregadas as seguintes concentrações de antígeno bruto parcialmente solúvel de *L. (L.) infantum* a 10 µg/mg e 20 µg/mL. A escolha dos melhores parâmetros se deram por meio das leituras em densidade ótica baixas dos soros

controles negativos e branco (somente tampão de lavagem) e das leituras de densidade ótica alta do soro positivo.

Após a padronização, placas de ELISA (Nunc Maxi sorp surface, USA), foram sensibilizadas com 100 µL antígeno bruto em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 nas concentração de 10 µg/ml seguido de incubação por 18 horas sob refrigeração (4 °C a 8 °C). Após, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween-20) e submetidas a uma etapa de bloqueio por duas horas com 150 µL de tampão de bloqueio (PBS com 0,05% de Tween-20 e 10% de caseína), após três lavagens nas mesmas condições anteriores, as amostras foram diluídas a 1:200 em solução de lavagem num volume de 100 µL em duplicata, seguido de incubação em câmara úmida por 1 hora a 37 °C. Uma nova lavagem foi realizada, e após foi adicionado o conjugado anti-IgG gato conjugado a peroxidase (Sigma- Aldrich) a 1:10.000 em solução de lavagem, num volume de 100 µL, seguido de incubação de 45 minutos a 37 °C. Após novo processo de lavagem foi adicionada solução reveladora (Tetrametilbenzidina-TMB, Sigma) com incubação por 30 minutos em ausência de luz. A reação foi paralisada com 50 µL H₂SO₄ a 1N e a leitura foi feita em espectrofotômetro (Test Line - Biotech Instruments), utilizando filtro de 450nm.

3.5 Análise Estatística

Os resultados referentes aos sinais clínicos e soropositividade dos animais em relação à origem, sexo, idade e área foram apresentados como porcentagens, e as variáveis submetidos à análise estatística através do Qui-quadrado a 95% de confiança ($p \leq 0,05$) em relação ao resultado obtido na pesquisa de anticorpos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 População estudada

A população estudada foi composta por 255 gatos, de diferentes origens dos municípios de Seropédica (180) e de Itaguaí (75), com livre acesso à rua, sendo 134 (52,9%) fêmeas e 121 (47,4%) machos, 247 (96,8%) sem raça definida e oito (3,1%) da raça Siamês.

Os animais entre seis meses e um ano de idade compreenderam 36,1% (92 gatos) da população estudada, 45,8% possuíam entre um e três anos (117 gatos), 11,7% de três a cinco anos (30 gatos) e 6,2% tinham idade superior a cinco anos (16 gatos).

A maior parte dos gatos amostrados (191/255 - 75%) foram de região urbana, sendo 11,7% (30/255) e 12,9%(33/255) procedentes de regiões peri-urbanas e da zona rural, respectivamente.

4.2 Avaliação Clínica – Amostragem geral

No que concerne à condição clínica dos gatos amostrados, 56,8% (145/255) eram aparentemente saudáveis, sem qualquer evidência clínica de enfermidades, enquanto que 43,1% (110/255) apresentavam, ao exame físico geral, sinais clínicos de enfermidades dermatológicas, respiratórias, digestivas, oculares ou sistêmicas, sendo estes sinais na maioria inespecíficos.

As alterações clínicas mais comumente identificadas na população estudada foram lesões de pele, perda de peso, palidez de mucosas, desidratação, secreção nasal, secreção ocular, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, diarreia, opacidade de córnea e presença de ectoparasitas.

4.3 Teste Rápido DPP® para leishmaniose visceral

Dos gatos avaliados pelo TR DPP®, somente cinco foram reagentes (1,9%, 5/255). Destes, apenas um (amostra 66) apresentava sinais clínicos de enfermidades, sendo evidenciado emagrecimento progressivo associado a secreções nasal e ocular, sugestivos de leishmaniose, conforme Pennisi (2015). Os outros quatro gatos, reagentes ao teste rápido, não apresentavam alterações clínicas ao exame físico.

Em todos os testes em que a leitura foi positiva, não foi observada a formação de bandas com intensidade satisfatória, como evidenciado para o cão, apresentando-se como bandas tênues, com pouca intensidade de cor (Figura 8A), diferenciando-se dos resultados negativos em que não houve formação de banda nenhuma (Figura 8B).

Por se tratar de um teste qualitativo, a leitura seguiu as recomendações do manual de instrução do fabricante como descritas e exemplificadas no (ANEXO D). Dos dados obtidos, pode-se inferir que o teste TR DPP® não é adequado para gatos, pela formação de bandas muito claras, ou seja: pouco reativas e, por não terem sido compatíveis com o resultado da RIFI, ainda que teoricamente possa ser utilizado para qualquer espécie, pois utiliza como conjugado a proteína A de *Staphylococcus aureus*, que é um fator de virulência de *S. aureus* que se liga à fração Fc de anticorpos (CHOE et al, 2016). Conforme destacado no Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstica da Leishmaniose Visceral Canina (FUNED, 2013), um resultado reagente deve ser confirmado por ELISA.

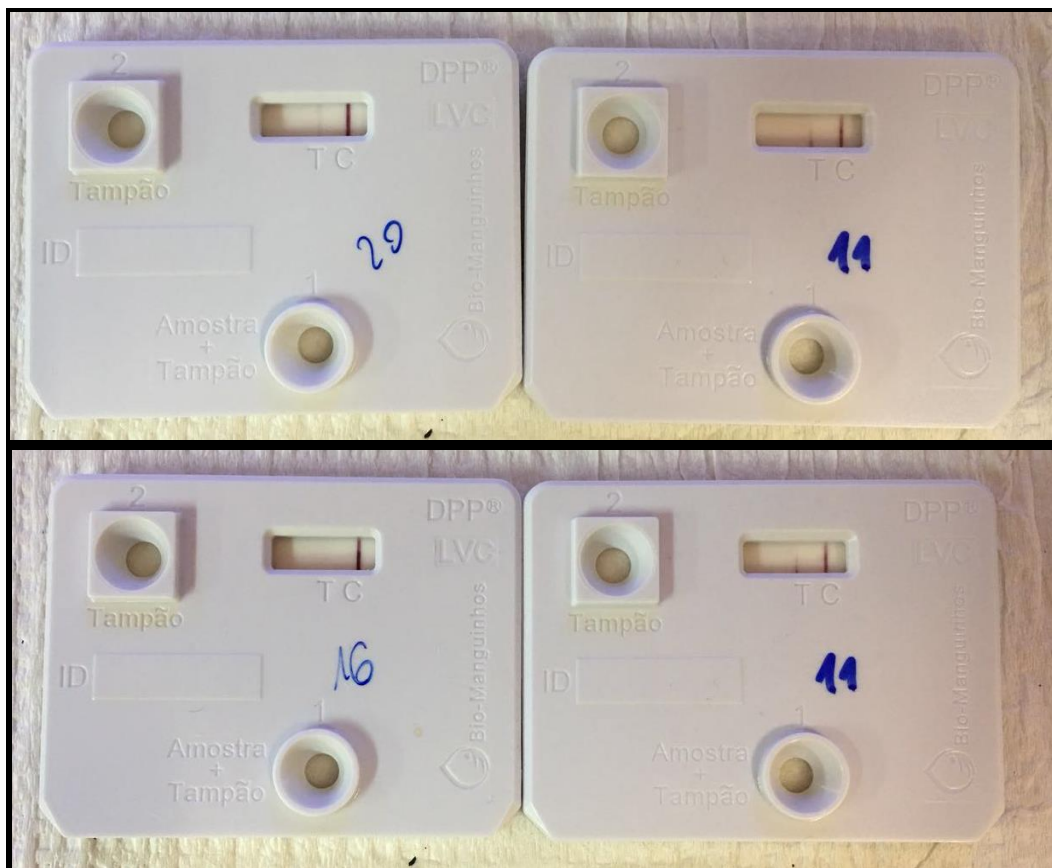


Figura 8. Teste rápido para Leishmaniose visceral - TR DPP®. (A) Leitura positiva . Observar a intensidade de cor e definição das linhas formadas na reação de diferentes amostras (20 e 11). (B) Resultado negativo (16). Comparativo entre um resultado não reagente e reagente, mesmo com a intensidade da linha na área de TESTE sendo clara, o que varia conforme a concentração do anticorpo específico (11).

4.4 Reação de Imunofluorescência Indireta

Em decorrência da dificuldade de se estabelecer uma linha de corte (“*cut off*”) para separar sororreagentes de não-reagentes, devido à falta de amostras padrão-ouro (grupo de amostras séricas de gatos comprovadamente infectados, e grupo comprovadamente não infectados por *Leishmania*), optou-se por realizar inicialmente, comparações dos resultados sorológicos frente às características clínicas dos animais, considerando-se os resultados nos títulos de 1:40 até 1:320 (Quadro 2).

Quadro 2: Número e porcentagem de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, em relação à titulação

Título	1:40	1:80	1:160	1:320
Nº de Animais	16	14	10	4
Porcentagem	36,4	31,8	22,7	9,1

O Ministério da Saúde do Brasil preconiza exames sorológicos para o diagnóstico da LV em inquéritos epidemiológicos caninos. O ELISA apresenta, na espécie canina, uma sensibilidade variando de 80% a 99,5% e especificidade que varia de 81% a 100% (ASHFORD et al., 1995; MANCIANTI et al., 1995; ZANETTE, 2006). Na espécie felina há dificuldades para a realização de estudos sorológicos, uma vez que não há padronização da técnica para a espécie, devido principalmente à resposta imune diferenciada dos gatos frente à *Leishmania* spp (VITA et al., 2005).

Os estudos realizados com gatos apresentam metodologias diversas e protocolos distintos quanto à escolha dos anticorpos e suas respectivas diluições. Contudo, a maior parte dos autores considera positividade quando se obtém título igual ou superior a 1:40 (VITA et al., 2005; ROSSI, 2007; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; AYLLON et al., 2008; Da SILVA et al. 2008; MAIA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009), sendo esta a titulação definida no presente estudo. Com a titulação de 1:40, 36% dos gatos apresentaram-se reativos na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Para títulos maiores, de 1:80, 1:160 e 1:320 foram positivos, respectivamente 14, 10 e 4 gatos.

Gatos domésticos negativos para *Leishmania*, de várias idades, ambos os sexos e variadas raças, adquiridos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Pensilvânia (Perkasie, PA, EUA), foram avaliados quanto à manifestação clínica e resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania* spp. Averiguou-se que estes felinos são menos susceptíveis à infecção viscerotrópica quando formas amastigotas foram inoculadas por via intravenosa e formas promastigotas inoculadas por via intradérmica. Estes gatos não desenvolveram nenhuma manifestação clínica típica da LV em humanos, mas foram capazes de produzir significativa quantidade de anticorpos circulantes (KIRKPATRICK et al., 1984). Estes dados podem justificar os resultados do presente estudo em que foram observados gatos positivos na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. sem apresentarem sinais clínicos, e estarem aparentemente saudáveis ao exame físico.

4.4.1 Sinais Clínicos Em Animais Sororreagentes

Dos 44 animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. identificados pela RIFI, os principais sinais clínicos observados foram secreção ocular (16/44 – 36%), secreção nasal (16/44 – 36%), emagrecimento (7/44 – 15,9%), alopecia (6/44 – 13,6%) e lesão ulcerada na pele (5/44 – 11,3%), além de hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, opacidade de córnea e gengivite (Figura 9). Destaca-se que os mesmos sinais foram evidenciados também em gatos não reagentes.

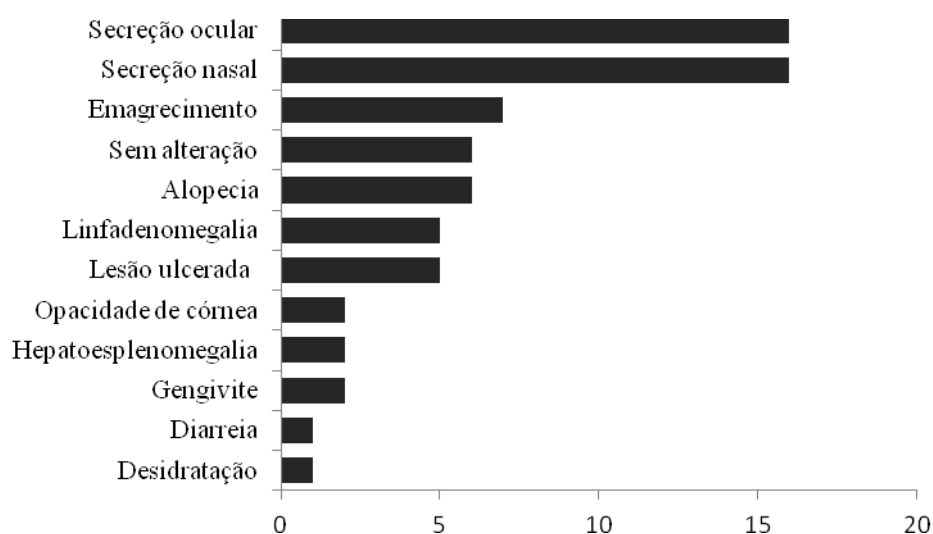


Figura 9. Distribuição, em número, segundo as alterações clínicas sistêmicas, de 44 gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. provenientes dos municípios de Seropédica e Itaguaí

Secreção ocular e nasal foram as alterações clínicas mais comumente observadas nos gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. no presente estudo; essas são manifestações de doenças do trato respiratório típicas em gatos. Destaca-se que o estresse e os agentes de viroses como FIV e FELV podem induzir disfunção imunológica que permitem a multiplicação ativa do parasito e a generalizada disseminação visceral dos protozoários, como reportado por Hérvas et al. (1999) na Espanha. Em estudos posteriores, diversos pesquisadores têm correlacionado a leishmaniose felina com enfermidades imunossupressoras como FIV e FeLV (ROSSI, 2007). Neste contexto, a maioria dos sinais clínicos observados nos gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp., no presente estudo são também comuns em enfermidades virais, bacterianas e parasitárias (Figuras 10 e 11).

As alterações mais frequentes foram dermatológicas, o que está de acordo observações de Simões-Mattos et al. (2004) e Vides (2010). É importante ressaltar que na maioria dos domicílios amostrados existiam inúmeros gatos, de diversas faixas etárias, e a maioria em estado nutricional de regular a rium e condições sanitárias precárias. Cento e dez animais apresentavam alterações clínicas que podem ser atribuídas à má nutrição ou à presença de outros agentes infecciosos. Sob esta reflexão, esperava-se que esta amostragem populacional fosse mais suscetível ou tivesse maior predisposição em apresentar a infecção por *Leishmania* spp. haja vista o íntimo convívio entre gatos, cães e outras espécies como aves domésticas, as quais podem atrair os flebotomíneos (ALEXANDER et al., 2002).



Figura 10. Gatos reagentes na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. (A) Animal com hipertrofia bilateral de tonsilas. (B) Animal com aumento do perímetro abdominal (este gato apresentava hepatoesplenomegalia ao exame ultrassonográfico)

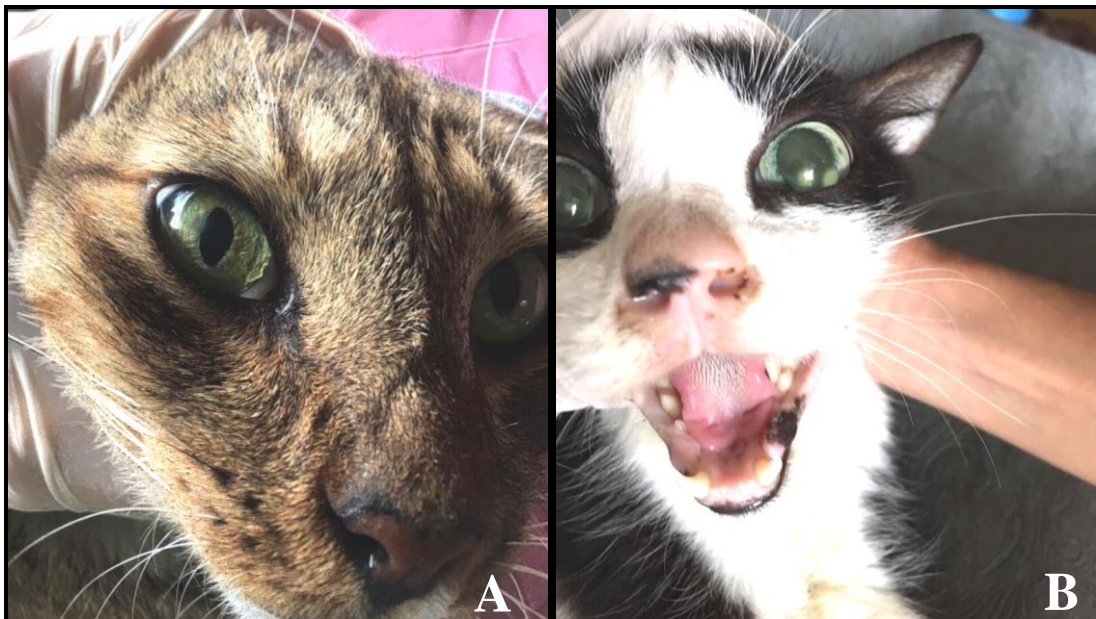


Figura 11. Gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. (A e B) Animais com opacidade de córnea unilateral. (B) Animal com secreção nasal bilateral de aspecto purulento.

Em sua maioria, os sinais observados nos gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. são semelhantes aos descritos por Sobrinho (2010) em um estudo realizado em Araçatuba-SP sobre coinfeção de *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii*, FIV e FeLV em gatos onde foram relacionados: linfadenopatia, perda de peso, alopecia, secreção ocular mucopurulenta bilateral, desidratação, hepatomegalia, descarga nasal mucopurulenta, úlceras com crostas hemorrágicas e opacidade da córnea. Mudanças no estado de consciência não foram observadas no presente estudo, diferentemente do observado por Sobrinho (2010).

Em outro estudo realizado também em Araçatuba, SP, com gatos infectados por *Leishmania chagasi*, Vides et al. (2011) acrescentaram diarreia e dispnéia a esses sinais. No presente estudo, diarreia e desidratação foram observadas concomitantemente em um único

animal, estando provavelmente relacionados à doenças nutricionais ou parasitárias e dispneia embora ocorra comumente nas infecções respiratórias não foram evidenciadas.

Marzochi et al. (1985) salientaram que o emagrecimento é um sinal frequente em cães em áreas de LV. Contudo, a perda de peso, especificamente em felinos, é um sinal clínico comum a diversas enfermidades infecciosas, parasitárias ou não, e não deve direcionar o diagnóstico (PENNISI, 2015).

Considerando a condição de manejo nutricional e sanitário, e o ambiente dos animais amostrados, é possível que a maioria apresente infecções concomitantes, especialmente FIV, FELV e rinotraqueíte infecciosa que podem funcionar como debilitantes pelo caráter imunossupressor dos agentes, predispondo à leishmaniose, conforme destacado por Sobrinho et al. (2010), que pesquisaram a coinfeção de *Leishmania* spp. com *Toxoplasma gondii*, FIV e FeLV em uma população de gatos de uma área endêmica para leishmaniose visceral. Os autores concluíram que os gatos que viviam em áreas endêmicas de LV eram significativamente mais propensos a serem co-infectados com o FIV e, portanto, gatos em tais áreas devem ser sempre cuidadosamente avaliados quanto às coinfeções.

Na maioria das vezes, o corrimento nasal não indica necessariamente a presença de doença sistêmica, sendo prováveis as infecções virais, bacterianas ou fúngicas do trato respiratório. Podem também ser decorrentes de neoplasias, parasitos, corpos estranhos, doença periodontal, pólipos e alergias. Para o diagnóstico diferencial deve-se investigar a idade do surgimento dos sintomas, o tempo e o tipo de evolução (FEITOSA, 2014). Dentro dos problemas respiratórios, há sempre necessidade de se colher, pela história, toda a sintomatologia clínica observada, estabelecer uma relação entre o sinal ou sinais clínicos apresentados e o momento em que eles ocorrem com maior intensidade. Exames complementares como radiografias, cultura e citologia da secreção, endoscopia (rinoscopia) e rinotomia (acesso cirúrgico da cavidade nasal) podem ser úteis para a elaboração do diagnóstico e do plano terapêutico. O tratamento depende da causa e o prognóstico depende do diagnóstico específico. Desta forma, deve-se sempre que houver suspeita de infecção por *Leishmania* spp., investigar a possibilidade de outras enfermidades concomitantes ou diferenciais.

Segundo Rossi (2007) o quadro clínico da leishmaniose no gato é semelhante ao observado na espécie canina, apresentando como no presente estudo, em sua maior parte, sinais clínicos inespecíficos, que comumente incluem lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras, e alopecia (MELLO, 1940 *apud* PIRAJÁ et al., 2013).

Poli et al. (2002) relataram a presença de nódulos ou de áreas ulceradas como sendo os sinais mais evidentes na leishmaniose visceral felina. No presente estudo, lesões cutâneas ulceradas foram observadas em cinco gatos, sendo estas em região cefálica (3/5) e dorsal (2/5). Estes achados são similares aos de Vides (2010) que identificaram um maior acometimento de região cefálica (55,5%) seguida dos membros (22,2%) e da região dorsal (22,2%). Diferentemente, Simões-Mattos et al. (2004) descreveram uma maior frequência de lesões em áreas do plano nasal e, posteriormente, nos pavilhões auriculares e na região periocular, lesões estas não observadas neste estudo.

Lesão ulcerada de pele, embora ocorra na LT, e deva sempre ser considerada na avaliação de animais com suspeita de leishmaniose, ocorre também em outras afecções como esporotricose. Na infecção por *Sporotrix* sp. a lesão é geralmente localizada, eritematosa, nodular e edemaciada, evoluindo para ulceração com exsudato purulento (SOUZA, 2001).

Após observação de 28 casos clínicos de leishmaniose felina descritos em todo o mundo, Simões-Mattos et al. (2004) verificaram que 92,8% dos animais apresentaram manifestações cutâneas, o que reforça o destaque das lesões cutâneas nesta enfermidade. Contudo, ainda não está claro se o quadro dermatológico é causado por ação do parasito ou se

é decorrente de coinfeccões, como por exemplo, piodermites ou dermatofitoses, desencadeadas pela imunossupressão ocasionada pelo parasito.

Outro problema a ser levantado é o fato do uso de determinados medicamentos, como antifúngicos, melhorar temporariamente lesões cutâneas causadas por leishmanias, uma vez que estes fármacos podem ter ação leishmaniostática. Deste modo, a suspeita clínica passa a ser de outras enfermidades, uma vez que o tratamento melhora os sintomas, o que dificulta o diagnóstico de LV. Por esta razão, há que se pensar que o número de casos de leishmaniose felina pode estar sendo subestimado (SIMÕES-MATTOS et al., 2004)

Linfoadenopatia e visceromegalias, em associação com manifestações cutâneas, ocorreram em 17,4% e 4,3% dos casos publicados, respectivamente. Os dados do presente estudo corroboram estas observações, visto que todos os animais com linfoadenopatia apresentavam lesões dermatológicas concomitantes.

Gengivite, observada no presente estudo, em um animal apenas, também foi relacionada como achado clínico inespecífico para felinos positivos na pesquisa de anticorpos para *Leishmania* spp. Maroli et al. (2007) relataram a infecção em um gato de 13 anos de idade que não apresentava lesões cutâneas e que possuía apenas sinais clínicos de periodontite e linfoadenomegalia submandibular.

Na população avaliada, a maioria dos gatos com anticorpos eram machos (26/44), com idade entre 1 e 3 anos, mas sem diferença significativa em relação a outras faixas etárias, corroborando os achados de Daikon et al. (2009) que não observaram associação entre a ocorrência de leishmaniose e o sexo, bem como de Solano-Gallego et al. (2007) e Nasereddin et al. (2008) ao avaliarem populações de felinos com idades variando de 3,6 meses a 17 anos.

4.4.2 Sorologia RIFI

Rossi (2007) ao avaliar a utilização da RIFI para o diagnóstico da leishmaniose visceral, encontrou sensibilidade de 12,5% e especificidade de 100%. No teste de ELISA, a sensibilidade foi igualmente baixa e o autor considerou que ambos os métodos devem ser interpretados com cautela uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, podendo apresentar resultados falso-positivos e falso-negativos. Em concordância com observações de Rossi (2007), o teste ELISA no presente estudo apresentou-se insatisfatório, enquanto a RIFI permitiu uma melhor avaliação da resposta sorológica dos animais. Neste contexto, atualmente o ELISA é considerado o método mais adequado para exames sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral em inquéritos epidemiológicos caninos e recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

O ELISA apresenta, na espécie canina, uma sensibilidade variando de 80% a 99,5% e a especificidade que varia de 81% a 100% (ASHFORD et al., 1995; MANCIANTI et al., 1995; ZANETTE, 2006). Para felinos, contudo, o teste apresenta limitações. Como já mencionado, especialmente a falta de padronização da técnica é um fator limitante ao uso dessa técnica em gatos. Observa-se discordâncias entre os autores quanto à técnica utilizada, com variações nas concentrações de antígenos, nas diluições das amostras de soros utilizados, na escolha do anticorpo conjugado, e é destacada a falta de descrição detalhada da metodologia (ROSSI, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; COSTA, 2008; NASEREDDIN et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009).

Em gatos, a dificuldade para realização da RIFI não é muito diferente da encontrada quando da realização do ELISA mas, a grande divergência ocorre no que tange ao ponto de corte da reação. Alguns autores consideram os felinos positivos quando apresentam soro

reagente na concentração de 1:2 e outros, quando o título é superior a 1:40 (VITA et al., 2005; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; AYLLON et al., 2008; MAIA et al., 2008).

Dos 44 gatos com anticorpos anti-*Leishmania* spp. detectados por meio da RIFI, 16 apresentaram títulos baixos (1:40), concordando com os achados de Vita et al. (2005) ao detectarem anticorpos anti-*Leishmania* com títulos de 1:40 na maioria (60,61%) dos felinos testados na Região de Abruzzo. Títulos maiores, de até 1:320 foram detectados em 28 gatos, portanto a maioria dos animais aqui amostrados. Titulação de 1:160 foi identificada por Poli et al. (2002) em um animal (0,9%) ao avaliarem 110 gatos da Itália, discordando dos animais amostrados neste estudo, onde 10 gatos (22,7%) apresentaram esta titulação, e ainda quatro gatos (9,1%) foram reagentes com título de 1:320. Mancianti et al. (2004) e Silva et al. (2008) verificaram títulos de 1:320 em gatos naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Estes dados reforçam a possibilidade de infecção dos gatos e a resposta imunológica dos mesmos frente a infecção por *Leishmania* spp.

Vides (2010) ao pesquisar a infecção por *Leishmania chagasi* em 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba, São Paulo, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral identificou 27 animais com leishmaniose visceral. Destes, 12 (44,4%) foram positivos nos exames parasitológicos de órgãos linfoides e da pele, 11 (40,7%) por sorologia e quatro (14,8%) por ambos os métodos, demonstrando a efetividade do exame parasitológico, definido como o padrão ouro no diagnóstico de leishmaniose em diferentes espécies, incluindo o gato.

Em outro estudo, realizado em Araçatuba, SP, a prevalência de infecção por *Leishmania* spp. em em 200 gatos adultos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) foi de 14,5% (31/200), sendo 4% (8/200) por diagnóstico parasitológico e 11,5% (23/200) no teste de ELISA (SOBRINHO, 2010), divergindo portanto dos resultados de Vides (2010) quanto aos resultados sorológicos e parasitológicos.

Estudos conduzidos em Andradina e Araçatuba, municípios do Estado de São Paulo, demonstraram soroprevalência felina variando entre 4,2% (COELHO et al., 2011) e 51,9% (VIDES et al., 2011). Portanto, os dados do presente estudo são coerentes com os descritos para a espécie em outras regiões.

Observou-se uma maior ocorrência de gatos soropositivos na zona rural (39,4%), enquanto que na zona urbana a frequência de animais com anticorpos foi menor (10,9%). A diferença entre os animais positivos segundo a origem foi significativa (Tabela 01).

Tabela 1. Número e porcentagem de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta segundo a localização do domicílio

	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
RURAL	13	39,4	20	60,6	33	12,9
URBANA	21	10,9	171	89,1	192	75,3
PERIURBANA	10	33,3	20	66,7	30	11,8
TOTAL	44	17,3	211	82,7	255	100

P= 1,56707E-05 pelo Teste do qui-quadrado

Este resultado é coerente com resultados de Silva (2012) que avaliou a soropositividade de cães nos municípios de Seropédica e Itaguaí, e encontrou resultados mais expressivos em animais domiciliados na zona rural, onde 51,6% dos cães foram positivos. Em semelhança ao presente estudo, Silva (2012) encontrou uma maior frequência de animais positivos no município de Seropédica (59,5%) comparativamente aos procedentes de Itaguaí

(29,5%) e Mangaratiba (11,4%), com diferença significativa ($p < 0,05$) o que não foi evidenciado no presente estudo onde a diferença entre os animais positivos de Seropédica (19,4%) e Itaguaí (12%) (Tabela 2) não foi significativa ($p = 0,1517$), assim como não houve diferença em relação ao sexo e idade.

Tabela 2. Número e porcentagem de animais com anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta, segundo o Município de origem

	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ITAGUAÍ	9	12,0	66	88,0	75	29,4
SEROPÉDICA	35	19,4	145	80,5	180	70,6
TOTAL	44	17,3	211	82,7	255	100

Os resultados do presente estudo são consistentes com estudos que indicam como fatores de risco para infecção por *Leishmania* spp., a proximidade dos animais com vegetação abundante (ALMEIDA et al., 2009; RONDON et al., 2008; SILVA et al., 2005; CABRERA et al., 2003), além da presença de animais silvestres próximos à residência (CABRERA et al., 2003), o que contribui para a agregação de vetores nas áreas rurais e peridomiciliares (ALEXANDER et al., 2002; COUTINHO et al., 2004; COUTINHO, 2005; BRASIL, 2006; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006).

4.5 Resultado do ELISA

Os resultados dos ajustes de titulação quando se levou em consideração a concentração do antígeno (20 µg/mL ou 10 µg/mL) e as concentrações do conjugado anti-IgG canina (1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000) demonstraram que utilizando 10 µg/mL de antígeno bruto e 1:1000 no conjugado foi onde as amostras negativas e o branco (somente PBS) apresentaram resultados de densidade ótica baixos; a amostra positiva apresentou resultado de densidade ótica mais altas, levando a crer que esses seriam os melhores valores para definição de parâmetros para realização dos testes com as amostras testes. A diluição de 1:5000 apresentou leituras altas tanto para os grupos positivos, quanto para os negativos e para o branco. As diluições do conjugado de 1:20 000, 1:40000 e 1:80000 apresentaram valores mais baixos de leitura de densidade ótica nos controles positivos, negativos e no branco, além disso houve uma diminuição das diferenças entre as leituras desses dois grupos. Ao repetir essas condições com os soros das amostras de gatos coletadas, não houve reprodução das leituras de densidade óticas esperadas (branco e controles negativos com leituras baixas e controles positivos com leituras altas) encontradas na padronização das condições ideais utilizando-se as mesmas amostras como controles. Diante disto, foi necessário a utilização de um outro conjugado disponível, a proteína A peroxidase, utilizando-se a mesma concentração do antígeno, que em todas as diluições utilizadas, tanto para soros de gatos, como quando utilizada como conjugado, as amostras controles não apresentaram resultado de densidade ótica dentro do esperado, apresentando leituras baixas tanto nos controles positivos como nos controles negativos, demonstrando que nessas condições aparentemente não houve ligação com IgG de gato disponível nas amostras. Nesta fase do trabalho, foram utilizados ainda como controle, além das amostras controles de gatos, soros controles de cães sabidamente positivos e negativos, provenientes do Kit de EIE para

leishmaniose visceral canina de Biomanguinhos. As amostras de cães funcionaram conforme o esperado em todas as diluições utilizadas, descritas anteriormente.

5 CONCLUSÕES

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos oriundos dos municípios de Itaguaí e Seropédica, alerta para a ocorrência da doença nas áreas urbanas, peri-urbanas e principalmente rurais, e que os mesmos métodos de proteção instituídos para os cães podem ser realizados para os gatos, através dos quais, uma vez diagnosticada, a doença assume impacto de importância em saúde pública.

O teste rápido imunocromatográfico com antígenos recombinantes para *Leishmania* (fragmentos rk26 e rk39) não apresentou resultados satisfatório, não sendo recomendado como alternativa na triagem para o diagnóstico de leishmaniose visceral felina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P. **O Kala-azar da área metropolitana de Lisboa e da região de Alcácer do Sal. Estudos sobre os reservatórios doméstico e silvático e sobre a população humana em risco de infecção.** 1984. 226f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, 1984.

AFONSO, M. O.; ALVES-PIRES Capitulo 2: **Bioecologia dos vetores.** In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. *Leishmaniose Canina.* Chaves Ferreira - Publicações, S.A. Portugal, 2008, p.27-40.

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.1480-1485, 2002.

ARRAES, S. M. A. A.; MARINI, M. T.; MARTELLO, D.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONE, M. V. C.; NANNI, M. R. Investigação sorológica de casos subclínicos de leishmaniose tegumentar após um surto em uma localidade endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.2, p. 205-208, 2008.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JUNIOR, R. H.; BADARÓ, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, p.251-255, 1995.

AYLLON, T.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; VILLAESCURA, A.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.361-364, 2008.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; VALLE, F. A. C.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO, F. S.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil; description of a series of cases. **Clinical Infectious Disease**, v.38, p.529-35, 2004.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; VALLE, F. A. C.; GALHARDO, M. C. G.; SCHUBACH, T. M. P.; CONCEIÇÃO, F. S.; SALGUEIRO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; REIS, R. S.; MADEIRA, M. F.; CUZZI, T.; QUINTELLA, L. P.; SILVA, J. P.; CONCEIÇÃO, M. J.; MARZOCHI, M. C. A. Positive montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta tropica**, v. 93, n. 1, p. 41-47, 2005.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M. P.; GALHARDO, M. C. G.; SCHUBACH, A. O.; MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; LAZERA, M.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C.; MARZOCHI, K. B.; WANKE, B.; VALLE, A. C. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-779, 2001.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, W. L. C.; CARVALHO, L. P. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v.171, p.331-339, 2006.

BORGHI, S. M.; FATTORI, V.; CONCHON-COSTA, I.; PINGE-FILHO, P.; PAVANELLI, W. R.; VERRI, W. A. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology Research**, v.116, p.465–475, 2017.

BOWMAN, D. D.; HENDRIX, C. M.; LINDSAY, D. S.; BERR, S. C. **Feline clinical parasitology**. Blackwell Science Company (1ª edição); Iowa, USA. p.0-76. 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 182 p, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 180 p, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 182 p, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 122 p, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde. 2003. 120p.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.1311–1320, 2001.

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**. v.18, p.500-5, 1969.

CAMPINO, L.; MAIA, C. **The role of reservoirs: canine leishmaniasis**. In: Drug Resistance in *Leishmania* Parasites – Consequences, Molecular Mechanism and Possible Treatments; A. Ponte-Sucre, M. Padron-Nieves, E. Diaz. Springer Verlag, p. 45- 64, Viena, Áustria, 2013.

CAMPINO, L.; MAIA, C. Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. **Acta medica portuguesa**, v. 23, n. 5, p. 859-64, 2010.

CHOE, W.; DURGANAVAR, T. A.; CHUNG, S. J. FC-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. **Materials**, v. 9, n. 12, p. 994, 2016.

COSTA, T. A. C. **Utilização da técnica de Elisa com proteína A e anti-IgG para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral felina**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Araçatuba. 2008.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p.149-155, 2005.

COELHO, W. M. D.; LIMA, F. M. V.; AMARANTE, T. F. A.; LANGONI, H.; PEREIRA, R. B. V.; ABDELNOUR, A.; BRESCIANI, S. D. K Occurrence of Leishmania (Leishmania) chagasi in a domestic cat (Felis catus) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 256-258, 2010.

DAIKOU, A.; PAPADOPOULOS, E.; LAZARIDES, K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 728-730, 2009.

DANTAS-TORRES, F., TARALLO, V. D., LATROFA, M. S., FALCHI, A., LIA, R. P., & OTRANTO, D. Ecology of phlebotomine sand flies and Leishmania infantum infection in a rural area of southern Italy. **Acta tropica**, v. 137, p. 67-73, 2014.

FEITOSA, F. L. F.; BENESI, F. J. Exame Físico Geral ou de Rotina. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 3ª ed. Roca, São Paulo, 2014.

FREITAS, E.; MELO, N.M.; COSTA-VAL, P. A.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 1, p. 159-167, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, 2003.

SANTOS, I. R.; MIRANDA, M. H. L.; OKAMOTO, T.; FIGUEIREDO, B. F.; SHUBACH, P. M. T.; LEME, P. R. L.; QUINTELLA, P. L.; TORTELLY, R. Leishmaniose tegumentar americana canina no Rio de Janeiro–revisão. **Revista Universidade Rural**, v. 28, n. 1, p. 27-38, 2008.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.3, n.2, p.47-57, 2012.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FIGUEIREDO, F. B.; BONNA, I. C. F.; NASCIMENTO, L. D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação

sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.141-145, 2009.

FUNED. Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Referência Nacional para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral**. 20p, 2013.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.234-241, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, 2003

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n.2, p.338-349, 2004.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11, p. 1169-1180, 2005.

GREENE, C.E. **Leishmaniasis**. In: Infectious diseases of the dog and cat. 3ed. St. Louis: Saunders Elsevier. ch.73, p.685-697, 2006. (a)

GREENE, C.E. **Toxoplasmosis and Neosporosis**. In: Infectious diseases of the dog and cat. 3ed. St. Louis: Saunders Elsevier. ch.80, p.754-775, 2006. (b)

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.73, n.6, p.911-926, 2015.

HELLER H. M.; SWARTZ M. N. Nodular lymphangitis: clinical features, differential diagnosis and management. **Curr. Clinical Topics in Infectious Dis.** 14:142-58, 1994.

HERVÁS, J.; CHACÓN-M DE LARA, F.; SÁNCHEZ-ISARRIA, M. A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J. A.; GÓMES-VILLAMANDOS, J. C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.1, p.101-105, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resultados preliminares do Censo. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_do_u/RJ,2010.pdf>

KIRKPATRICK C., FARRELL J., GOLDSCHMIDT M. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, 58: 125-131, 1984.

LARSON, M., TOEPP, A., SCOTT, B., KURTZ, M., FOWLER, H., ESFANDIARI, J., HOWARD, R., F. DUTHIE, M.S., PETERSEN, C. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.1-10, 2016.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T.; ROURA, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in cat. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.71-75, 2005.

LIMA, V. M. F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C.; CORREA, A. P. F. L.; LUVIZOTTO, M. C. R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme immunoassay using protein in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 25, p. 215- 218, 2005.

LOVE, D. C.; KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. **Experimental parasitology**, v. 88, n. 3, p. 161-171, 1998.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, 2008.

MAIA, C.; NUNES, M.; CRISTÓVÃO, J.; CAMPINO, L.; Experimental canine Leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up; **Acta Trópica**, 116, pp. 193-199, 2010.

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

MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: a literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.12. p.563-581, 2014.

MAROLI, M.; PENNISI MG.; DI MUCCIO T.; KHOURY C.; GRADONI L.; GRAMICCIA M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*; **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3, p. 357-360, 2007.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; Di MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, w.3-4, p.357-360, 2007.

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; Di MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, w.3-4, p.357-360, 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.30, n.145, p.267-273, 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.30, n.145, p.267-273, 2007.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, p. 37-40, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, supl. 2, p. 359-375, 1994b.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings**. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.80, p.349-357, 1985.

MENEZES, J. P. B.; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. O. A.; BITTENCOURT, D.; FRAGA, M.; VERAS, P. S. T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **Biomed Research International**, 2015.

MENON, S. S.; ROSSI, R.; NSHIMYUMUKISA, L.; ZINSZER, K. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. **Tropical Medicine and Health**, v.44, n.9, 2016.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.

NASEREDDIN, A.; SALANT, H.; ABDEEN, Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. **Veterinary Parasitology**. v. 158, n.4, p.364-369, 2008.

NAUCKE, TORSTEN J.; LORENTZ, SUSANNE. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 67, 2012.

OLIVEIRA-NETO M.P., PIRMEZ C., RANGEL E., SCHUBACH A.; GRIMALDI-JUNIOR G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 83:427-35.p.728-730, 2009.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of infection**, v.13, n.9, p. 1123- 1138, 2015.

PALATNIK, C. B.; ANTUNES, I.; MORGADO, A. A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3505-3512, 2009.

PENNISI, Maria Grazia. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**, p. 39-48, 2002.

PENNISI, M. G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; Lo GIUDICE, S. Case report of Leishmaniasis in Four Cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.363-366, 2004.
PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLEGO, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 302, 2015.

PIEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n. 5, p.1633–1644, 2007.

PIRAJÁ, GABRIELA VILLA et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, p. 203-216, 2013.

PIRMEZ C., MARZOCHI M.A.C. & COUTINHO S.G. 1988b. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**; 83:145-51.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.181-191, 2002.

REITHINGER R.; DUJARDIN, J, C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.9, p.581-96, 2007.

REITHINGER. R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.1, p.21-25, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.182-226. 1991.

REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.214-240. 2001.

RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH DE O. A.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, T.M.; MADEIRA, F.M.; MARZOCHI, M.C. Use of ELISA employing *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**,v.148; n.3-4; p.200-206, 2007.

ROSSI, C. N. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba. São Paulo**. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária e Ciências Agrárias, Unesp, Jaboticabal, 2007.

SANTOS, VANIA CRISTINA. **Determinação do pH e estudo dos mecanismos envolvidos em seu controle no intestino médio de *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Díptera: Psychodidae) durante a digestão de sangue e açúcares**. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, no curso de Pós- Graduação em Parasitologia, UFMG, 2006.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves - São Paulo: **A Secretaria**, 158p, 2006.

SCHUBACH A .O., CUZZI-MAYA T., OLIVEIRA A.V., SARTORI A., OLIVEIRANETO M. P., MATTOS M., ARAÚJO M. L., SOUZA W.J., HADDAD F., PEREZ M. A.,

PACHECO R. S., MOMEN H., COUTINHO S.G., MARZOCHI M.C., MARZOCHI K. B.; COSTA S. C.. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96:987-96, 2001a.

SCHUBACH T.M.P., SCHUBACH A.O., OKAMOTO T., BARROS M.B., FIGUEIREDO F.B., CUZZI-MAYA T., FIALHO-MONTEIRO P.C., REIS R.S., PEREZ M.A. & WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001) 2004.

SERGEANT, E. T.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v.5, p.93-98, 1912.

SILVA, A.V. M.; CÂNDIDO, C. D. S.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CABRERA, C. A. The first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.105, p. 92-94, 2008.

SILVA, C. B. **Diagnóstico sorológico e aspectos epidemiológicos da leishmaniose canina na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro**. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no curso de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária, 2012.

SILVA, C. L. G. Nematocera- Mosquitos. In: MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo, Roca, p. 97-108, 2014.

SILVA, S.; RABELO, P.; GONTIJO, N.; RIBEIRO, R.; MELO, M.; RIBEIRO, V. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil; *Veterinary Parasitology*, 174(1-2), pp. 150-154, 2010.

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M. R. F.; POMPEU, M. M. L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p.79-87, 2004.

SOARES, I. R. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagente para Leishmania sp. no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, Belo Horizonte, Escola de Veterinária – UFMG, 2012.

SOBRINHO, VICENTE; SILVA, LUDMILA. **Leishmaniose felina e sua associação com imunodeficiência viral e toxoplasmose em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral**. Dissertação apresentada à UNESP, Araçatuba como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, São Paulo, Universidade Estadual Paulista, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PÓRTUS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, n.4, p.676-680, 2007.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do Município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, Curitiba, n.36, p.14-21, 2001.

TEVA, A.; FERMAMDEZ, J. C. C; LAURENTINO-SILVA, V. Imunologia. *In*: MOLINARO, E. M; CAPUTO, L. F. G; AMENDOEIRA, M. R. R (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Oswaldo Cruz, Escola Pólitcnica de Saúde Joaquim Venâncio, v.4, p.19 - 124. 2009.

VIDES, J. P.; SCHWARDTA, T. F.; SOBRINHO, L. S. V.; MARINHO, M.; LAURENTIC, M. D.; BIONDO, A. W.; LEUTENEGGERE, C. Leishmania chagasi infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil; **Veterinary Parasitology**, 178, pp. 22–28, 2011.

VIDES, J. P. **Infecção por Leishmania chagasi em gatos com dermatopatias provenientes de área endêmica para Leishmaniose visceral**. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal 2010.

VITA, S.; SANTORI, D.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline Leishmaniosis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. **Veterinary Research Communications**, v.29, Suppl. 2, p.319-321, 2005.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.N.N. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bull World Health Organization**, v.53, p.55-65; 1976;

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Division of Control of Tropical Diseases. Epidemiological analyses of retrospective cases of Leishmania/HIV co-infection**. Disponível em: < www.who.int/LEISH/96.39.1996>. Acesso em: 21 de fev. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO apud CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzootico de transmissão da Leishmania (Leishmania) chagasi (Cunha e Chagas, 1937) no éctopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras**, 1999. 84f. Tese (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, **WHO Library Cataloguing-in-Publication**, Geneva, 22-26 March 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016. **Leishmaniasis Burden and distribution**. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 23 de fev. 2017.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO B - Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados nos municípios de Seropédica e Itaguaí, Rio de Janeiro.

ANEXO C- Critério utilizado para a leitura do teste rápido, de acordo com as recomendações descritas no manual de treinamento TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, por BioManguinhos, Fiocruz/RJ.

ANEXO D - Planilha com identificação de cada amostra através de número, sexo, e resultado nos testes.

ANEXO E – Quando com os principais sintomas encontrados em felinos reagentes à infecção por *Leishmania* spp., de acordo com vários autores.

ANEXO A



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ CPF/RG: _____ Endereço:
o: _____ telefone: _____

_____, recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, visando estudos de Leishmanioses. Autorizo a coleta de material biológico em meus gatos, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Tendo sido orientado(a) quanto ao teor de tudo aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente dos riscos da doença.

Em ___/___/___ Assinatura: _____

ANEXO B



Ficha de Identificação individual animal n° _____

Data: __/__/__ Propriedade N° _____ Zona: () Rural () Urbana Localidade: _____

Proprietário: _____

Nome do animal: _____ Sexo: () Macho () Fêmea Raça: _____ Cor: _____

Animal nascido na propriedade? () sim () não Se não, de onde veio o animal? _____

Há quanto tempo está com o animal? _____

Pelo: () curto () médio () longo/Porte: () pequeno () médio () grande

Score: () caquético () magro () normal () obeso

Comportamento: () triste () ativo/normal () agitado

Idade: () <6 meses () 6 meses a 2 anos () 2 a 5 anos () 5 a 10 anos () > 10 anos

Temperatura: _____ Pulso: _____ FR: _____ FC: _____ TPC: _____ Turgor: _____

Linfonodos: _____

Mucosa ocular: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Mucosa oral: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Distúrbios atuais de coagulação na pele: () petéquias () equimoses () outros: _____

Histórico de epistaxe, hemorragia: () sim () não

Animal vive dentro da residência: () sim () não () às vezes

Locais de acesso do animal: () pastagens () córregos () matas () ambiente urbano

Contato direto com outras espécies de animais: () sim () não Quais? _____

Histórico de patologias: _____

Tipo de alimentação: () comida () ração () ambos

Possui água e comida à disposição o tempo todo? () sim () não

Vermifugação: () sim () não Há quanto tempo? _____ Qual produto? _____

Critério para escolha: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

Possui ectoparasitos? () sim () não

Quais e quantidade?

() pulgas _____ () piolhos _____ () sarnas _____

() carrapatos _____ Fases: _____ espécies: _____

Faz tratamento? () sim () não Qual produto? _____

Se não trata, qual motivo? _____

Critério para escolha do produto: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

Dermatopatias? () sim () não

Outros tipos de lesões: _____

Sinais de otite? () sim () não

Hábito do animal?

() sempre preso () preso de dia e solto à noite () solto () outros _____

Apresenta abrigo? () sim () não Tipo: _____

Tipo de ambiente do animal:

() ladrilhado () cimentado () de terra () outros

Condição de limpeza do ambiente do animal: () ruim () moderada () satisfatória

Frequência de recolhimento e limpeza das fezes:

() diariamente () 2 a 3 vezes por semana () 1 vez por semana () não faz

Tem assistência Veterinária? () sim () não

Frequência? () a cada 6 meses () 1 x por ano () só qd fica doente

Animal é vacinado? () sim () não Quais vacinas? _____

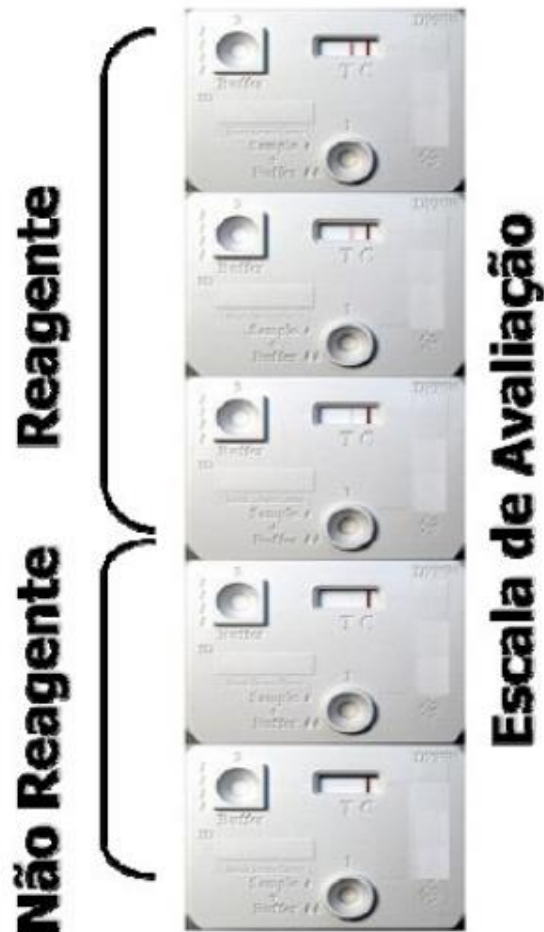
Banho: () semanal () quinzenal () mensal () outros

Usa produtos parasiticidas? () sim () não Quais? _____

Outras obs. relevantes: _____

ANEXO C

ESCALA DE AVALIAÇÃO DE INTENSIDADE
TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA



ANEXO D

AMOSTRA	SEXO	DPP LVC	RIFI 1:40	RIFI 1:80	RIFI 1:160	RIFI 1:320
1	M	NEGATIVO	+	+	-	X
2	M	NEGATIVO	-	X	X	X
			-	X	X	X
4	F	NEGATIVO	-	X	X	X
5	F	NEGATIVO	-	X	X	X
6	F	NEGATIVO	-	X	X	X
7	F	NEGATIVO	-	X	X	X
8	M	NEGATIVO	+	+	-	X
9	M	NEGATIVO	-	X	X	X
10	M	NEGATIVO	-	X	X	X
11	F	POSITIVO	-	X	X	X
12	F	NEGATIVO	-	X	X	X
13	M	NEGATIVO	+	-	X	X
14	M	NEGATIVO	-	X	X	X
15	F	NEGATIVO	-	X	X	X
16	M	NEGATIVO	-	X	X	X
17	M	NEGATIVO	-	X	X	X
18	F	NEGATIVO	-	X	X	X
19	F	NEGATIVO	+	+	+	-
20	M	POSITIVO	-	X	X	X
21	M	NEGATIVO	-	X	X	X
22	M	NEGATIVO	-	X	X	X
23	M	NEGATIVO	-	X	X	X
24	M	NEGATIVO	-	X	X	X
25	M	NEGATIVO	-	X	X	X
26	M		-	X	X	X
27	F	NEGATIVO	-	X	X	X
28	M	NEGATIVO	-	X	X	X
29	F	NEGATIVO	-	X	X	X
30	M	NEGATIVO	-	X	X	X
31	M	NEGATIVO	-	X	X	X
32	M	NEGATIVO	-	X	X	X
33	M	NEGATIVO	-	X	X	X
34	M	NEGATIVO	-	X	X	X
35	F	NEGATIVO	-	X	X	X
36	M	NEGATIVO	-	X	X	X
37	M	NEGATIVO	-	X	X	X
38	F	NEGATIVO	-	X	X	X
39	M	NEGATIVO	+	+	+	-

40	M	NEGATIVO	-	X	X	X
41	F	NEGATIVO	-	X	X	X
42	F	NEGATIVO	-	X	X	X
43	F	NEGATIVO	-	X	X	X
44	F	NEGATIVO	-	X	X	X
45	F	NEGATIVO	-	X	X	X
46	F	NEGATIVO	-	X	X	X
47	M	NEGATIVO	-	X	X	X
48	M	NEGATIVO	-	X	X	X
49	M	NEGATIVO	-	X	X	X
50	M	NEGATIVO	-	X	X	X
51	F	NEGATIVO	+	+	+	+
52	F	NEGATIVO	-	X	X	X
53	F	NEGATIVO	-	X	X	X
54	F	NEGATIVO	-	X	X	X
55	F	NEGATIVO	-	X	X	X
56	M	NEGATIVO	-	X	X	X
57	F	NEGATIVO	-	X	X	X
58	M	NEGATIVO	-	X	X	X
59	F	NEGATIVO	-	X	X	X
60	M	NEGATIVO	-	X	X	X
61	M	NEGATIVO	-	X	X	X
62	M	NEGATIVO	-	X	X	X
63	M	NEGATIVO	-	X	X	X
64	M	NEGATIVO	-	X	X	X
65	M	NEGATIVO	-	X	X	X
66	M	POSITIVO	-	X	X	X
67	M	NEGATIVO	-	X	X	X
68		NEGATIVO	-	X	X	X
69		NEGATIVO	-	X	X	X
70	F	NEGATIVO	+	+	-	X
71	M	NEGATIVO	+	+	+	-
72	M	NEGATIVO	-	X	X	X
73	F	NEGATIVO	-	X	X	X
74	M	NEGATIVO	-	X	X	X
75	M	NEGATIVO	-	X	X	X
76	M	NEGATIVO	-	X	X	X
77	M	NEGATIVO	-	X	X	X
78	M	NEGATIVO	-	X	X	X
79	M	NEGATIVO	-	X	X	X
80	M	NEGATIVO	-	X	X	X
81	F	NEGATIVO	-	X	X	X
82	M	NEGATIVO	-	X	X	X
83	M	NEGATIVO	-	X	X	X

84	F	NEGATIVO	-	X	X	X
85	M	NEGATIVO	-	X	X	X
86	M	NEGATIVO	-	X	X	X
87	F	NEGATIVO	+	+	-	X
88	M	NEGATIVO	-	X	X	X
89	M	NEGATIVO	-	X	X	X
90	M	NEGATIVO	-	X	X	X
91	F	NEGATIVO	+	+	+	-
92	M	NEGATIVO	-	X	X	X
93	F	NEGATIVO	-	X	X	X
94	F	NEGATIVO	+	+	-	X
95	F	NEGATIVO	+	+	+	+
96	M	NEGATIVO	-	X	X	X
97	M	NEGATIVO	+	-	X	X
98	M	NEGATIVO	-	X	X	X
99	F	NEGATIVO	-	X	X	X
100	F	NEGATIVO	-	X	X	X
101	M	NEGATIVO	+	-	X	X
102	F	NEGATIVO	-	X	X	X
103	F	NEGATIVO	+	+	+	-
104	M	NEGATIVO	+	-	X	X
105	M	NEGATIVO				
106	F	NEGATIVO	+	+	+	-
107	F	NEGATIVO	-	X	X	X
108	F	NEGATIVO	-	X	X	X
109	F	NEGATIVO	-	X	X	X
110	M	NEGATIVO	-	X	X	X
111	F	NEGATIVO	-	X	X	X
112	F	NEGATIVO	-	X	X	X
113	F	NEGATIVO	-	X	X	X
114	F	NEGATIVO	+	-	-	X
115	F	NEGATIVO	-	X	X	X
116	F	NEGATIVO	+	-	X	X
117	F	NEGATIVO	+	-	X	X
118	F	POSITIVO	-	X	X	X
119	F	NEGATIVO	+	-	X	X
120	F	NEGATIVO	-	X	X	X
121	F	NEGATIVO	-	X	X	X
122	M	NEGATIVO	-	X	X	X
123	M	NEGATIVO	-	X	X	X
124		NEGATIVO	+	+	-	X
125		NEGATIVO	-	X	X	X
126		NEGATIVO	+	+	-	X
127		NEGATIVO	-	X	X	X

128		NEGATIVO	-	X	X	X
129		NEGATIVO	+	+	-	X
130	F	NEGATIVO	+	+	-	X
131		NEGATIVO	-	X	X	X
132		NEGATIVO	-	X	X	X
133	F	NEGATIVO	-	X	X	X
134		NEGATIVO	+	+	-	X
135		NEGATIVO	-	X	X	X
136	M	NEGATIVO	+	+	-	X
137	M	NEGATIVO	-	X	X	X
138		NEGATIVO	+	+	-	X
139		NEGATIVO	+	+	+	-
140	F	NEGATIVO	+	-	X	X
141		NEGATIVO	-	X	X	X
142		NEGATIVO	-	X	X	X
143		NEGATIVO	-	X	X	X
144		NEGATIVO	-	X	X	X
145	M	NEGATIVO	-	X	X	X
146		NEGATIVO	-	X	X	X
147		NEGATIVO	-	X	X	X
148		NEGATIVO	-	X	X	X
149		NEGATIVO	-	X	X	X
150	F	NEGATIVO	-	X	X	X
151		NEGATIVO	+	+	-	X
152		NEGATIVO	+	+	-	X
153		NEGATIVO	-	X	X	X
154		NEGATIVO	-	X	X	X
155		NEGATIVO	-	X	X	X
156		NEGATIVO	-	X	X	X
157	F	NEGATIVO	-	X	X	X
158	F	NEGATIVO	-	X	X	X
159	M	NEGATIVO	-	X	X	X
160	M	NEGATIVO	-	X	X	X
161	M	NEGATIVO	-	X	X	X
162	M	NEGATIVO	-	X	X	X
163	F	NEGATIVO	-	X	X	X
164	F	NEGATIVO	-	X	X	X
165	M	NEGATIVO	-	X	X	X
166	M	NEGATIVO	+	-	X	X
167	M	NEGATIVO	-	X	X	X
168			+	+	+	+
169	F	NEGATIVO	-	X	X	X
170	M	NEGATIVO	-	X	X	X
171	M	NEGATIVO	-	X	X	X

172	F	NEGATIVO	-	X	X	X
173	F	NEGATIVO	-	X	X	X
174	F	NEGATIVO	-	X	X	X
175	M	NEGATIVO	-	X	X	X
176	M	NEGATIVO	-	X	X	X
177	F	NEGATIVO	-	X	X	X
178	M	NEGATIVO	-	X	X	X
179	F	NEGATIVO	-	X	X	X
180	M	NEGATIVO	-	X	X	X
181	F	NEGATIVO	-	X	X	X
182	F	NEGATIVO	-	X	X	X
183	F	NEGATIVO	-	X	X	X
184	M	NEGATIVO	-	X	X	X
185	M	NEGATIVO	-	X	X	X
186	F	NEGATIVO	-	X	X	X
187	F	NEGATIVO	-	X	X	X
188	M	NEGATIVO	-	X	X	X
189	M	NEGATIVO	-	X	X	X
190	F	NEGATIVO	-	X	X	X
191	F	NEGATIVO	+	-	X	X
192	F	NEGATIVO	-	X	X	X
193	F	NEGATIVO	-	X	X	X
194	M	NEGATIVO	-	X	X	X
195	M	NEGATIVO	-	X	X	X
196	F	NEGATIVO	-	X	X	X
197	M	NEGATIVO	-	X	X	X
198	F	NEGATIVO	-	X	X	X
199	M	NEGATIVO	-	X	X	X
200	F	NEGATIVO	-	X	X	X
201	F	NEGATIVO	-	X	X	X
202	F	NEGATIVO	-	X	X	X
203	F	NEGATIVO	-	X	X	X
204	M	NEGATIVO	-	X	X	X
205	M	NEGATIVO	-	X	X	X
206	F	NEGATIVO	+	+	+	+
207	F	NEGATIVO	+	-	X	X
208	F	NEGATIVO	-	X	X	X
209	M	NEGATIVO	-	X	X	X
210	F	NEGATIVO	-	X	X	X
211	F	NEGATIVO	-	X	X	X
212	M	NEGATIVO	-	X	X	X
213	F	NEGATIVO	-	X	X	X
214	F	NEGATIVO	-	X	X	X
215	M	NEGATIVO	-	X	X	X

216	M	NEGATIVO	+	-	X	X
217	M	NEGATIVO	+	+	+	-
218	F	NEGATIVO	-	X	X	X
219	M	POSITIVO	-	X	X	X
220	M	NEGATIVO	-	X	X	X
221	M	NEGATIVO	-	X	X	X
222	F	NEGATIVO	-	X	X	X
223	F	NEGATIVO	-	X	X	X
224	F	NEGATIVO	-	X	X	X
225	F	NEGATIVO	-	X	X	X
226	M	NEGATIVO	-	X	X	X
227	M	NEGATIVO	-	X	X	X
228	F	NEGATIVO	-	X	X	X
229	M	NEGATIVO	-	X	X	X
230	M	NEGATIVO	-	X	X	X
231	M	NEGATIVO	-	X	X	X
232	M	NEGATIVO	-	X	X	X
233	M	NEGATIVO	+	-	X	X
234	M	NEGATIVO	-	X	X	X
235	F	NEGATIVO	+	+	+	-
236	M	NEGATIVO	+	+	+	-
237	F	NEGATIVO	-	X	X	X
238	M	NEGATIVO	-	X	X	X
239	F	NEGATIVO	-	X	X	X
240	M	NEGATIVO	-	X	X	X
241	F	NEGATIVO	-	X	X	X
242	F	NEGATIVO	-	X	X	X
243	F	NEGATIVO	-	X	X	X
244	F	NEGATIVO	-	X	X	X
245	M	NEGATIVO	-	X	X	X
246	M	NEGATIVO	-	X	X	X
247	M	NEGATIVO	+	-	X	X
248	F	NEGATIVO	-	X	X	X
249	M	NEGATIVO	-	X	X	X
250	F	NEGATIVO	-	X	X	X
251	M	NEGATIVO	-	X	X	X
252	F	NEGATIVO		X	X	X
253	M	NEGATIVO	-	X	X	X
254	M	NEGATIVO	-	X	X	X
255	M	NEGATIVO	-	X	X	X
256	M	NEGATIVO	-	X	X	X
257	M	NEGATIVO	-	X	X	X
258	M	NEGATIVO	+	-	X	X
259	F	NEGATIVO	-	X	X	X

ANEXO E

PRINCIPAIS SINAIS CLÍNICOS	AUTORES
LINFADENOMEGALIA	(SOBRINHO, 2010), (MAROLI, 2007), (SIMÕES-MATTOS ET AL., 2004), (HERVÁS, 1999), (PENNISI, 2015)
DERMATOPATIAS	(SIMÕES-MATTOS ET AL., 2004), (VIDES, 2010), (ROSSI, 2007), (POLLI, 2002), (SERRANO), (HERVÁS, 1999), (PENNISI, 2015), (SOLANO-GALLEGO, 2007)_
DESIDRATAÇÃO	(SOBRINHO, 2010)
OPACIDADE DE CÓRNEA	(SOBRINHO, 2010)
SECREÇÃO NASAL	(SOBRINHO, 2010)
SECREÇÃO OCULAR	(SOBRINHO, 2010)
PERDA DE PESO	(SOBRINHO, 2010)
GENGIVITE	(SOBRINHO, 2010), (MAROLI, 2007)
DIARREIA	(VIDES, 2010)
HEPATOESPLENOMEGALIA	(SOBRINHO, 2010)
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS	(SOBRINHO, 2010)