

GEOVANNA VIOTI

**XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*)  
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

São Paulo

2020

GEOVANNA VIOTI

**XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*)  
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

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

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientadora:**

Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

De acordo: Trícia Maria F. de S. Oliveira

Orientadora

São Paulo  
2020

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

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3946  
FMVZ

Vioti, Geovanna  
Xenodiagnóstico em gatos domésticos (*Felis catus*) naturalmente infectados por  
*Leishmania infantum* / Geovanna Vioti. – 2020.  
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

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

1. Leishmaniose felina. 2. *Lutzomyia longipalpis*. 3. Leishmaniose visceral. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*", protocolada sob o CEUA nº 8541011019 (ID 007589), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Geovanna Vioti** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/03/2020.

We certify that the proposal "XENODIAGNOSIS IN DOMESTIC CATS (*Felis catus*) NATURALLY INFECTED BY *Leishmania infantum*", utilizing 105 Cats (males and females), protocol number CEUA 8541011019 (ID 007589), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Geovanna Vioti** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/18/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2018](#) a [04/2020](#) Área: [Doenças Parasitárias](#)

Origem:	<a href="#">Animais provenientes de outros projetos</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade:	<a href="#">1 a 30 anos</a>	N:	<a href="#">5</a>
Espécie:	<a href="#">Gatos</a>			Peso:	<a href="#">1 a 30 kg</a>		
Linhagem:	<a href="#">sem raça definidas</a>						
Origem:	<a href="#">Animais provenientes de outros projetos</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade:	<a href="#">1 a 30 anos</a>	N:	<a href="#">100</a>
Espécie:	<a href="#">Gatos</a>			Peso:	<a href="#">1 a 30 kg</a>		
Linhagem:	<a href="#">sem raça definidas</a>						

Local do experimento: LMVPA- FZEA/USP Laboratório de Imunoparasitologia-Departamento de Zootecnia e Biologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS/UNESPP Laboratório de Entomologia de Flebotomíneo da Faculdade de Saúde Pública (LESP)

São Paulo, 22 de março de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Camilla Mota

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIOTI, Geovanna

Título: **XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*)  
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*À minha avó (Elisabetha), aos meus queridos pais (Tereza e Gilberto), à minha  
sobrinha (Annabel) e ao meu grande companheiro (Diego).*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Gilberto e Tereza por terem compreendido e apoiado meu objetivo de continuar os estudos mesmo em tempos difíceis;

Às minhas lindas sobrinhas Annabel e Helena, donas de sorrisos iluminados, repletos de carinho e amor, e à minha irmã Poliana por me ensinar a nunca desistir;

Ao meu grande companheiro da vida Diego, que com suas palavras sábias, foi capaz de me guiar nos momentos mais difíceis e de compartilhar comigo as experiências mais felizes e únicas;

Aos meus incríveis amigos Isadora, Thalita, Kess e Edimarco que, mesmo longe e com a correria do dia a dia, sempre me deram apoio e me confortaram;

Aos meus sogros Isabel e Arlindo, por sempre me transmitirem bons sentimentos e amizade;

Às minhas grandes amigas Aninha e Kátia, por me aturarem diariamente e por compartilharem seus conhecimentos;

À minha orientadora, Trícia, por ter confiado a mim este belo e importante projeto;

Ao Dr. Freddy e à Mariana, ambos do laboratório de entomologia da Faculdade de Saúde Pública, por terem realizado os xenodiagnósticos e, principalmente, pela paciência, pelos ensinamentos e pela disponibilidade de sempre ajudar;

Aos meus amigos Júlia, João e Nuno por toda colaboração, parceria e ensinamentos desde a graduação;

Aos meus amigos de Ilha Solteira Diogo, Maria Luana e Júlio, pela grande colaboração e parceria nas coletas;

Aos secretários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal Danival Lopes e Vanessa Alves, por toda ajuda e disposição em todo este período;

Às profas. Eunice Bianchi Galati e Wilma Aparecida Starke Buzetti, por terem disponibilizado seus laboratórios para realização de parte do experimento;

Ao pessoal do Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública Márcia Bicudo e Vanessa Gusmon, por terem me recebido tão bem e compartilhado o conhecimento sobre flebotomíneos;

Aos professores Lara Keid e Rodrigo Soares pela disponibilidade e pelos ensinamentos;

Enfim, meus profundos agradecimentos a todos que de alguma forma estiveram presentes em minha vida durante esses dois anos.



## RESUMO

VIOTI, G. **XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***. 2020. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O papel dos gatos na transmissão de leishmaniose visceral (LV) tem ganhado espaço desde a primeira evidência da transmissibilidade de *Leishmania infantum* para flebotomíneos através de xenodiagnóstico. Com o objetivo de ampliar os estudos sobre o papel destes animais no ciclo de transmissão da LV em áreas urbanas, quatro gatos naturalmente infectados por *L. infantum*, diagnosticados através de RIFI, ELISA e PCR com sequenciamento 100% compatível com *L. infantum*, foram avaliados quanto à presença de sinais clínicos e alterações hematológicas e submetidos a xenodiagnóstico. Dos quatro animais positivos, todos apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença e alterações hematológicas, três apresentaram parasitológico positivo, com a presença de amastigotas em medula óssea e/ou linfonodo. Um total de 203 flebotomíneos foram expostos para alimentação nos 4 gatos, resultando em 100% das fêmeas ingurgitadas. Ensaio parasitológico e molecular foram realizados para avaliar a presença de *L. infantum* no intestino dos flebotomíneos. Dez fêmeas de *Lu. longipalpis* (4,9%) foram positivas no ensaio parasitológico de um dos gatos e 17 (8,4%) fêmeas alimentadas em dois gatos resultaram na amplificação de DNA de *L. infantum*, o que evidencia que gatos naturalmente infectados são competentes em transmitir *L. infantum* ao vetor.

Palavras-chave: Leishmaniose Felina. *Lutzomyia longipalpis*. Leishmaniose visceral.

## ABSTRACT

VIOTI, G. **Xenodiagnosis in cats naturally infected by *Leishmania infantum***. 2020. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Cats have been gained attention on visceral leishmaniasis (VL) transmissibility since the first evidence of phlebotomine's infection by *Leishmania infantum* from naturally infected cat. Aiming to expand studies regarding feline's role on *L. infantum* VL cycle at urban areas, four naturally infected cats diagnosed using IFAT, ELISA and PCR with sequencing 100% compatible with *L. infantum* were evaluated according to clinical signs and haematological changes and subjected to xenodiagnosis. All cats presented clinical signs compatible with the disease and/or haematological changes. Three of them presented amastigotes at parasitological assay from bone marrow and/or lymph nodes. Parasitological and molecular assays were used to identify *L. infantum* at *Lutzomyia longipalpis*' gut from 203 phlebotomines fed on the 4 cats, which resulted in 100% of engorged females. Ten (4,9%) *Lu. longipalpis* female feed in one cat showed promastigotes at parasitological assay, while 17 (8,4%) feed in two cats amplified *L. infantum* DNA, evidencing that naturally infected cats are competent to transmit *L. infantum* to *Lu. longipalpis*.

Keywords: Feline leishmaniasis. *Lutzomyia longipalpis*. Visceral leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fluxograma dos xenodiagnósticos. Todos os experimentos foram conduzidos com a mesma metodologia e manutenção das fêmeas. **PCR** – Reação em Cadeia pela Polimerase; **IVS6 – CAC** – domínio IVS6 para o gene *cacophony* de insetos; **kDNA – 13A/13B** – gene 13A/13B do DNA do kinetoplasto de *Leishmania* spp.; **rDNA – ITS1** – *Internal Transcribed Spacer 1* do DNA ribossomal de Trypanosomatídeos.....58
- Figura 2:** Experimento de xenodiagnóstico. A – Cabanas individuais dispostas acima da bancada. B – Gatos dentro das cabanas individuais. C – Fêmea flebotomínea realizando o repasto sanguíneo em um gato naturalmente infectado por *L. infantum*. .....60
- Figura 3:** Gato 4; A – Gato 4, positivo em todos os exames diagnósticos, com importantes alterações hematológicas e bioquímicas e apresentando magreza. B – Alta parasitemia por formas promastigotas de *Leishmania* spp. em intestino de fêmea flebotomínea alimentada em gato naturalmente infectado por *L. infantum*. C – Eletroforese de gel de agarose, resultante da amplificação do DNA ribossomal gene ITS1. **L** – Ladder; **C+** - Controle positivo; **C-** - Controle negativo; 1 a 16 – Fêmeas de flebotomíneos alimentadas em gatos naturalmente infectados por *L. infantum* 60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Manifestações clínicas e alterações laboratoriais que podem acometer cães infectados por <i>L. infantum</i> . Adaptado de Solano-Gallego et al (2011).....	19
<b>Tabela 2:</b> Avaliações clínica e diagnóstica dos gatos selecionados para participar do xenodiagnóstico .....	59
<b>Tabela 3:</b> Descrição dos resultados dos xenodiagnósticos A e B.....	61
<b>Tabela 4:</b> Comparação entre os estudos xenodiagnósticos disponíveis e o presente estudo, realizados em gatos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> .....	62

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL .....	16
2.1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL EM SERES HUMANOS .....	17
2.1.2	LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES .....	17
2.1.3	LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS .....	20
2.2	CICLO BIOLÓGICO DAS LEISHMANIAS .....	21
2.2.1	RESERVATÓRIOS .....	22
2.3	BIOLOGIA DOS VETORES .....	23
2.3.1	PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE FLEBOTOMÍNEOS .....	24
2.4	CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	25
3	OBJETIVOS .....	27
4	REFERÊNCIAS .....	27
5	ARTIGO.....	41
	XENODIAGNÓSTICO EM GATOS DOMÉSTICOS NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	41
1	INTRODUÇÃO .....	44
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	45
2.1	ÁREA DE ESTUDO.....	45
2.2	SELEÇÃO DOS ANIMAIS .....	45
2.3	XENODIAGNÓSTICO .....	46
2.3.1	O VETOR: <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i> .....	46
2.3.2	REPASTO SANGUÍNEO DAS FÊMEAS NOS GATOS .....	46
2.3.3	ENSAIOS PARASITOLÓGICOS .....	47
2.3.4	ENSAIOS MOLECULARES .....	47
3	RESULTADOS.....	47
4	DISCUSSÃO .....	48
5	CONCLUSÃO.....	51
6	AGRADECIMENTOS .....	52
7	REFERÊNCIAS.....	52

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, o qual é composto por 31 espécies capazes de parasitar mamíferos, dentre as quais 20 são patogênicas ao homem, sendo que diferentes espécies causam diferentes doenças (AKHOUNDI et al., 2016; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Estas doenças atingem 98 países ao redor do mundo, sendo estimados de 700 mil a 1 milhão de novos casos e 26 a 65 mil mortes por ano (NEVES, 2016; WHO, 2019). A espécie *Leishmania infantum*, do complexo *Leishmania donovani*, é o agente causador da Leishmaniose Visceral (LV) zoonótica na Europa, nas Américas e em alguns países da África e da Ásia, com regiões endêmicas que se estendem desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, incluindo o Brasil (KUHLS et al., 2011).

Dentre as leishmanias capazes de causar doença no homem estão: (1) complexo *Leishmania donovani* que, a princípio, era composta por três espécies causadoras das leishmanioses visceral: *L. donovani*, agente causadora da leishmaniose visceral antroponótica, endêmica na Índia e na África Central, regiões nas quais humanos são os reservatórios do parasita (WERNECK, 2014); e *L. infantum* e *L. chagasi*, agentes causadoras da LV, presentes no sul da Ásia, na Europa e nas Américas, respectivamente. Com a evolução de pesquisas morfológicas e moleculares hoje *L. infantum* e *L. chagasi* são consideradas a mesma espécie *L. infantum*; (2) complexo *L. mexicana*, formada por três espécies (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e as Leishmanias do subgênero *Viannia* composta por 4 espécies (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*) (KUHLS et al., 2011; CDC, 2019).

As Leishmanias são usualmente transmitidas através da picada da fêmea de vetores flebotomíneos. Nas américas, o vetor responsável pela transmissão da *L. infantum* pertence ao gênero *Lutzomyia*, e a principal espécie transmissora no Brasil é *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*), pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, embora já tenha sido identificada a espécie *Lutzomyia cruzi* como transmissora no Mato Grosso e, posteriormente no Mato Grosso do Sul (MISSAWA et al., 2011; NEVES, 2016), além da competência vetorial do flebotomíneo da espécie *Lutzomyia migonei* também já ter sido comprovada (GUIMARÃES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). Essa espécie possui ampla distribuição geográfica,

incluindo áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas (NEVES, 2016). A hematofagia realizada pela fêmea é crucial para que ocorra o desenvolvimento ovariano adequado e maturação dos ovos. Normalmente a oviposição ocorre depois do primeiro repasto sanguíneo, porém pode ocorrer um segundo repasto antes da oviposição, situação que aumenta as chances de transmissão dos parasitos aos animais vertebrados e enfatiza sua importância epidemiológica no contexto das leishmanioses (PIMENTA; SECUNDINO; BLANCO, 2003).

No entanto, outras formas de transmissão já foram descritas tanto em humanos, através de transfusão sanguínea e de órgãos, congênita, compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas e por acidentes em laboratórios (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018); quanto em cães, por meio de transfusão sanguínea, via transplacentária e sexual (OWENS et al., 2001; ROSYPAL et al., 2005; SILVA et al., 2009). Ainda em relação a cães, é possível que mordidas sejam capazes de transmitir o parasita a outro cão (NAUCKE; AMELUNG; LORENTZ, 2016). Por fim, promastigotas de *L. infantum* já foram detectadas em glândulas salivares do carrapato de espécie *Rhipicephalus sanguineus*, no entanto, sua capacidade vetorial em transmitir *L. infantum* não foi confirmada (VIOL et al., 2016). Além dos meios conhecidos, também foram descritos casos autóctones em regiões dos Estados Unidos e do Reino Unido onde não há o vetor biológico e a forma de transmissão ainda não foi evidenciada (DAVAL et al., 2016).

Com as mudanças na epidemiologia da LV, o envolvimento de outras espécies domésticas como reservatórios, além dos cães passou a ser considerado possível (DESJEUX, 2002). Em diversas partes do mundo, diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo *L. infantum*, já foram descritas infectando animais domésticos como equinos (AGUILAR; RANGEL; DEANE, 1986; SOARES et al., 2013; GAMA et al., 2014), bovinos (LOBSIGER et al., 2010; GAO et al., 2015; VIOTI et al., 2019) e gatos (SAVANI et al., 2004; PENNISI et al., 2015a). Já no meio silvestre, raposas e marsupiais são considerados reservatórios da doença (BRASIL, 2014). O xenodiagnóstico é uma técnica capaz de comprovar a transmissibilidade de *Leishmania* spp. de um animal infectado para o vetor da doença e até o momento, existem três trabalhos sobre xenodiagnóstico em gatos domésticos, sendo dois com as espécies *Lu. longipalpis* e *L. infantum* como vetor e parasito, respectivamente e outro com *Phlebotomus perniciosus* e *L. infantum* (MAROLI et al., 2007; DA SILVA et

al., 2010; DE MENDONÇA et al., 2020). Dois trabalhos realizaram a técnica em apenas um gato com sinais clínicos da doença, enquanto o mais recente ampliou a pesquisa para 12 animais com sinais clínicos sugestivos de LV, sem avaliar as alterações hematológicas dos animais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses formam um complexo de doenças que se manifestam no ser humano de três formas diferentes: a cutânea, que é a mais comum, a mucocutânea e a visceral, que é a mais grave. Estão presentes na África, Ásia, Europa e nas Américas e juntas somam de 700 mil a 1 milhão novos casos humanos por ano, com taxa de mortalidade anual de 26 a 65 mil em todo o mundo (WHO, 2019).

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave das leishmanioses, sendo estimados de 50 a 90 mil novos casos por ano. Apesar de estar presente em mais de 80 países, mais de 94% dos casos reportados em 2017 estavam concentrados em apenas 7, sendo eles: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (DE ARRUDA et al., 2019; WHO, 2020).

Suas características epidemiológicas e clínicas variam de acordo com a região acometida, com diferenças entre agentes causadores, reservatórios e vetores. Na Índia, em Bangladesh e em Nepal, apesar de haver indícios de possíveis reservatórios animais, a doença acomete principalmente humanos e é causada pela espécie *L. donovani*, protozoário transmitido principalmente pelo flebotomíneo *Phlebotomus argentipes* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CHAPMAN et al., 2018). Na Europa, nas Américas e na China, a LV é uma zoonose causada pela *L. infantum*, cujo principal reservatório é o cão, e transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos (MAIA; CAMPINO, 2011). Na África, apesar da *L. donovani* estar presente, a maioria dos casos são causados por *L. infantum* e há muitas regiões nas quais o reservatório ainda não foi identificado (KONE et al., 2019).

No Brasil, a LV é uma doença em expansão de áreas, com aumento do número de municípios reportando a enfermidade ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN (DOS REIS et al., 2017). A princípio, possuía caráter rural e hoje atinge áreas suburbanas e grandes cidades como Belo Horizonte, Brasília e Natal, além de estar concentrada em municípios com população maior de 200 mil habitantes



(JERONIMO et al., 1994; CARRANZA-TAMAYO et al., 2010; ROMERO, 2016; DE ARRUDA et al., 2019). Neste país, novos focos endêmicos ocorreram devido à urbanização rápida e não planejada, com baixa qualidade de moradias e saneamento básico, com processos migratórios intensos de pessoas com cães de áreas rurais às áreas urbanas somada a alterações ambientais, o que favorece a emergência de doenças transmitidas por vetores, uma vez que o desmatamento reduz a disponibilidade de alimento ao vetor (DESJEUX, 2002; CERBINO NETO; WERNECK; COSTA, 2009; LANA et al., 2018). No estado de São Paulo é possível perceber que as alterações ambientais geradas pela construção do gasoduto Bolívia-Brasil, ligando a regiões endêmicas do Mato Grosso do Sul a São Paulo, com mudança no habitat do vetor e remoção da vegetação nativa favoreceram a emergência da LV? (SEVÁ et al., 2017). Em países desenvolvidos, a LV tem se espalhado devido à migração de pessoas de áreas endêmicas a não endêmicas, e também ao turismo (DE NARVAJAS et al., 2019). Já na África, além das precárias condições socioeconômicas e sanitárias, a migração forçada pela guerra civil do Sudão entre 1983 e 2005 resultou em epidemias massivas no sul do país e, com a volta dos conflitos em 2014, mais de 1,5 milhões de pessoas migraram para locais endêmicos (AL-SALEM; HERRICKS; HOTEZ, 2016).

### **2.1.1 Leishmaniose Visceral em seres humanos**

A sintomatologia clínica da LV depende do parasita, do hospedeiro e de outros fatores e, apesar de muitos casos serem assintomáticos em regiões endêmicas, a LV é caracterizada clinicamente por perda de peso, fraqueza, hepatoesplenomegalia, febre persistente e pancitopenia, podendo evoluir para caquexia, inflamação sistêmica, infecções bacterianas secundárias, hemorragias e morte. Também ocorrem alterações hematológicas como anemia, neutropenia e monocitose (COLMENARES et al., 2002; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CDC, 2019).

### **2.1.2 Leishmaniose Visceral em cães**

Cães são considerados os principais reservatórios urbanos da *L. infantum* devido à grande prevalência de cães infectados em áreas endêmicas e à alta taxa de infecção cutânea, responsável pela elevada infectividade destes animais ao flebotomíneo (COURA-VITAL et al., 2013; PENNISI, 2015). A doença clínica afeta apenas uma parcela da população de cães infectados, que podem manter a doença sem manifestação clínica por anos ou pela vida toda. No entanto, ambos os grupos

de animais, com e sem sinais clínicos são capazes de transmitir o protozoário ao flebótomo (DANTAS-TORRES, 2007; BELO et al., 2013; PENNISI, 2015). Nestes animais, a doença é sistêmica e pode envolver qualquer órgão, tecido ou fluido, gerando sinais clínicos inespecíficos. Lesão de pele é a manifestação clínica mais frequente devido à elevada parasitemia de pele nesta espécie. A doença renal crônica é o estágio final da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A tabela 1, adaptada de Solano-Gallego et al. (2011), expõe os principais sinais clínicos apresentados por cães infectados.

**Tabela 1:** Manifestações clínicas e alterações laboratoriais que podem acometer cães infectados por *L. infantum*. Adaptado de Solano-Gallego et al (2011).

<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Alterações laboratoriais</b>
<p><u>Sistêmicas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Linfadenomegalia generalizada;</li> <li>- Perda de peso;</li> <li>- Distúrbios alimentares;</li> <li>- Letargia;</li> <li>- Mucosas hipocoradas;</li> <li>- Esplenomegalia;</li> <li>- Poliúria e polidipsia;</li> <li>- Febre</li> <li>- Vômito</li> <li>- Diarreia (incluindo colite crônica)</li> </ul>	<p><u>Proteínas séricas e eletroforetograma:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hiperglobulinemia policlonal beta ou gamaglobulinemia;</li> <li>- Hipoalbuminemia;</li> <li>- Diminuição da razão albumina/globulina</li> </ul>
<p><u>Cutânea:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dermatite esfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia;</li> <li>- Dermatite erosiva-ulcerativa;</li> <li>- Dermatite nodular;</li> <li>- Dermatite papular;</li> <li>- Dermatite pustular;</li> <li>- Onicogribose</li> </ul>	<p><u>Hemostasia:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa a moderada anemia não regenerativa;</li> <li>- Leucocitose ou leucopenia;</li> <li>- Trombocitopatia;</li> <li>- Trombocitopenia;</li> <li>- Hemostasia secundária prejudicada e fibrinólise</li> </ul>
<p><u>Ocular:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Blefarite (esfoliativa, ulcerativa ou nodular) e conjuntivite (nodular);</li> <li>- Ceratoconjuntivite (comum ou seca);</li> <li>- Uveíte/endoftalmite</li> </ul>	<p><u>Perfil bioquímico e urinálise:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteinúria média a severa;</li> <li>- Azotemia renal;</li> <li>- Aumento de enzimas hepáticas ativadas</li> </ul>
<p><u>Outras:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lesões nodulares ou ulcerativas mucocutâneas ou mucosas (oral, genital e/ou nasal);</li> <li>- Epistaxe;</li> <li>- Claudicação (poliartrite erosiva ou não-erosiva, osteomielite, polimiosite);</li> <li>- Miosite atrófica mastigatória;</li> <li>- Desordens vasculares (vasculite sistêmica, tromboembolismo arterial);</li> <li>- Desordens neurológicas.</li> </ul>	

### 2.1.3 Leishmaniose Visceral em gatos

Casos de Leishmaniose Felina (LF) foram descritos em países da América do Sul (FIGUEIREDO et al., 2009; COELHO et al., 2011; NETO et al., 2011; ROUGERON et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; BRAGA; LANGONI; LUCHEIS, 2014; OLIVEIRA et al., 2015; BENASSI et al., 2018), Europa (MAROLI et al., 2007; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; AYLLÓN et al., 2012; SPADA et al., 2013; PAŞA et al., 2015; MONTOYA et al., 2018) e Ásia (NASEREDDIN; SALANT; ABDEEN, 2008; HATAM et al., 2010), relatando a infecção em gatos domésticos por diversas espécies de *Leishmania*. Os principais sinais clínicos apresentados em gatos com LV são semelhantes aos observados em outras enfermidades infecciosas comuns em gatos, causadas por vírus, bactérias, fungos e outros protozoários, sendo fundamental associar LV como diagnóstico em gatos com presença de lesões dermatológicas em região endêmica (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; VIDES et al., 2011; PENNISI, 2015).

A progressão clínica da LV tanto em gatos quanto em cães é associada ao aumento de titulação de anticorpos, com alta parasitemia relacionada à doença clínica em gatos (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). Apesar de a maioria dos gatos não apresentar sinais clínicos, devido a uma aparente resistência natural da espécie, os sinais clínicos muitas vezes estão associados a doenças imunossupressoras como Imunodeficiência Felina a Vírus (FIV) e Leucemia Felina a Vírus (FeLV) e incluem principalmente aumento de linfonodos, lesões ulcerativas, dermatite, lesões oculares, síndrome da gengivoestomatite felina, além de alterações hematológicas (PENNISI et al., 2015b).

Silva (2019) realizou um trabalho no qual gatos foram avaliados quanto à presença de sinais clínicos e então diagnosticados para LV, sendo divididos em grupo de animais infectados e grupo controle. Neste trabalho, os sinais clínicos mais comuns nos gatos infectados foram magreza, alterações cutâneas e hipertrofia dos linfonodos. Com relação às alterações hematológicas e bioquímicas, as mais importantes foram redução de plaquetas e aumento de proteínas totais com diminuição da albumina, comparado ao grupo controle.

Casos de infecção por *Leishmania* spp. em gatos e sua prevalência tanto molecular quanto sorológica são menos frequentes quando comparado a cães em regiões endêmicas, apresentando uma variação de 0 a 60%. Apesar de casos geralmente serem descritos em regiões endêmicas para LV canina, a primeira

descrição de um gato acometido por *L. infantum* no Brasil foi feita em Cotia, SP, município onde casos de LV não haviam sido reportados nem em humanos, nem em cães até a data da descrição em gatos (SAVANI et al., 2004).

Pouco se sabe se gatos naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam parasitismo tecidual elevado e, desta forma, sejam potenciais fontes de infecção para flebotomíneos. Além disso, há uma escassez de trabalhos descrevendo a resposta imune desses gatos e se esses animais possuem algum mecanismo de susceptibilidade ou resistência ao parasito e/ou infecção (PENNISI & PERSICETTI, 2018).

## 2.2 CICLO BIOLÓGICO DAS LEISHMANIAS

As leishmanias apresentam ciclo de vida heteroxênico obrigatório, com forma flagelada no hospedeiro invertebrado e forma amastigota intracelular no hospedeiro vertebrado, no qual as leishmanias se multiplicam (PITA-PEREIRA, 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Inicia-se quando o flebotomíneo infectado por *Leishmania* spp. realiza repasto e regurgita a forma infectante (promastigota metacíclica) na pele do hospedeiro vertebrado (HV). No HV, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e por outras células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) de tecidos diversos, nos quais elas se diferenciam em amastigotas, que são metabolicamente ativas em pH ácido e multiplicam-se por divisão binária, causando rompimento da célula infectada com consequente liberação dos parasitos para o meio extracelular. Desta forma, são fagocitados por novas células do SFM e continuam se multiplicando. O flebotomíneo se infecta ao ingerir células do SFM parasitadas durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo do flebotomíneo, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas precoces de forma elíptica. Então, a *Leishmania* se adere ao epitélio intestinal diferenciando-se em leptomonas, que liberam um gel secretor e multiplicam-se intensamente. A partir de então, algumas se desenvolvem em haptomonas, que migram à válvula estomodeal lesando-a. Outras realizam a metaciclo gênese, ou seja, diferenciação de leptomonas em promastigotas metacíclicas, sua forma infectante. As promastigotas metacíclicas se desprendem do epitélio intestinal, o que permite que o parasito seja eliminado durante o repasto (PITA-PEREIRA, 2010; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; CDC, 2019).

Todo o processo de metaciclo gênese pode acontecer concomitantemente com o ciclo gonadotrófico da fêmea e, quando coincide com o período de um novo repasto

sanguíneo, as lesões na válvula estomodeal juntamente com o gel secretado pelas promastigotas, somadas às formas derivadas de leptomonas, bloqueiam o fluxo sanguíneo, dificultando o repasto da fêmea, o que permite a regurgitação de sangue com as formas infectantes. Além disso, por não conseguir se alimentar adequadamente, a fêmea busca outros hospedeiros para realizar o repasto, podendo transmitir a uma maior quantidade de hospedeiros a *Leishmania* (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

### 2.2.1 Reservatórios

A intensidade de transmissão ( $R_0$ ), ou seja, a quantidade de novos hospedeiros que a doença atinge a partir de um caso primário é fundamental para identificar os diferentes tipos de reservatórios que a LV pode apresentar. Um reservatório primário é aquele que mantém  $R_0$  maior que 1, ou seja, é ele o responsável por manter o parasita circulante. Portanto, ao realizar controle sobre o reservatório primário, é possível eliminar o parasita daquele ecossistema. No entanto, a maioria não apresenta sinais clínicos, dificultando seu diagnóstico e consequente controle. Já um reservatório secundário é aquele que pode transmitir a infecção, mas não consegue mantê-la na ausência do reservatório primário. Portanto, ao ser controlado, diminui  $R_0$ , mas não elimina o parasita do meio e as transmissões continuarão. Enquanto isso, um reservatório acidental é aquele que não tem papel na manutenção do parasita no ambiente, portanto, seu controle não tem efeito sobre  $R_0$  (ASHFORD, 2003; QUINNELL; COURTENAY, 2009; MAIA; CAMPINO, 2011).

O reservatório primário é aquele que: a proporção de animais infectados pelo parasita é suficientemente alta para manter a infecção em áreas endêmicas; mantém sua capacidade de transmitir o parasita ao vetor durante um longo período; é uma fonte de alimentação frequente ao vetor (QUINNELL; COURTENAY, 2009; MAIA; CAMPINO, 2011). Sabe-se que o cão é um reservatório primário da LV, uma vez que a infecção por *L. infantum* é frequente na população de cães; a infecção se mantém nos períodos de não transmissão, muitas vezes sem sinais clínicos; apresentam alta parasitemia na pele e no sangue, aumentando as chances de transmitir a doença para o flebotômíneo; tem relação próxima com o homem, sendo o animal que mais transmite doenças ao ser humano; e, por fim, além de serem infecciosos ao vetor, é uma fonte natural de alimentação para flebotômíneos (MAIA; CAMPINO, 2011; DAY, 2016; WHO, 2019). A influência do homem sobre  $R_0$  ainda é muito discutida. Um

estudo de Molina et al. (2020) com xenodiagnóstico em seres humanos utilizando *P. perniciosus* como vetor demonstrou que humanos imunocompetentes não tratados geram impactos limitados na transmissão de *L. infantum*, enquanto humanos imunossuprimidos ou com coinfeção HIV-*L. infantum* são mais infecciosos ao vetor. Já no Brasil, xenodiagnóstico realizado em humanos com *Lu. longipalpis* por Ferreira et al. (2018) demonstrou que humanos co-infectados por HIV-*L. infantum* são mais importantes na transmissão do parasito ao vetor do que estimado anteriormente. Quanto a gatos, seu papel na epidemiologia da LV ainda não é totalmente conhecido.

### 2.3 BIOLOGIA DOS VETORES

Segundo Killick-Kendrick (1990), para um inseto ser considerado vetor de uma doença, é necessário que ele realize repasto nas espécies hospedeiras, além de o parasita isolado no inseto ser o mesmo isolado de hospedeiros em regiões endêmicas.

As leishmanioses são transmitidas pela picada da fêmea de flebotomíneos. Já foram descritas mais de mil espécies de flebotomíneos no mundo inteiro, pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A maioria das espécies são encontradas em regiões tropicais do Globo, no entanto, habitam desde o sul do Canadá, França e Mongólia, até o sul da América do Sul, estando ausente apenas na Nova Zelândia. Das espécies conhecidas, 375 estão presentes na Europa, Ásia, Austrália e África, em sua maioria na região temperada paleoártica. No entanto, a distribuição geográfica das diferentes espécies é ampla, podendo ser também encontradas em savanas e semiáridos, em baixas ou altas altitudes, inclusive abaixo do nível do mar.

Nas américas, foram descritas 434 espécies, presentes desde o norte da América do Norte até o sul da América do Sul, mas concentram-se nas regiões tropicais. Neste continente, vetores da LV fazem parte do complexo *Lu. longipalpis*, ou seja, são insetos de espécies distintas por apresentarem diferenças genéticas, mas que são morfologicamente indistinguíveis e, por isso, todas essas espécies americanas são denominadas *Lu. longipalpis* (KILLICK-KENDRICK, 1999; BICKFORD et al., 2006; AKHOUNDI et al., 2016).

Flebotomíneos são insetos holometábolos, isso significa que passam por uma metamorfose completa, com início do ciclo no estágio de ovo, seguido por quatro estágios larvais, desenvolve-se como pupa e, por fim, chegam a fase de adultos. As fêmeas depositam os ovos em matéria orgânica úmida em decomposição. As formas

larvais se alimentam de qualquer matéria orgânica presente no ambiente e, quando adultos, tanto fêmea quanto macho alimentam-se de seiva de plantas. Apenas a fêmea realiza repasto sanguíneo a fim de promover, desta forma, nutrientes para produção de ovos. A oviposição ocorre entre 4 e 8 dias após o repasto e o primeiro repasto sanguíneo ocorre entre 2 e 4 dias após a eclosão da pupa. Todo o ciclo de desenvolvimento do inseto dura entre 30 e 60 dias, dependendo da espécie. Para o repasto sanguíneo, os machos e as primeiras fêmeas são atraídos pelo odor liberado pelo hospedeiro. Então, os machos começam a produzir um potente feromônio capaz de atrair fêmeas distantes. Flebotomíneos apresentam atividade crepuscular, sendo que a maioria das fêmeas preferem realizar o repasto e maturação dos ovos fora dos abrigos e, portanto, seu controle não é efetivo com inseticida dentro das casas. É provável que por este motivo cães tenham maior taxa de infecção de LV comparada ao ser humano (KILLICK-KENDRICK, 1999; SOARES; TURCO, 2003; LAINSON; RANGEL, 2005; DANTAS DA SILVA, 2019).

A presença dos mesmos vetores nos diferentes meios, incluindo o urbano com proximidades de habitações humanas, áreas florestais e monoculturas frutíferas indica que, com o desmatamento e outras modificações causadas no ambiente pelo homem, flebotomíneos estão rapidamente se adaptando ao meio urbano (BARATA et al., 2005; BELO et al., 2013; READY, 2013).

### **2.3.1 Preferência alimentar de flebotomíneos**

Flebotomíneos apresentam hábito alimentar oportunista e há diferentes formas de identificar as fontes de alimentação das fêmeas destes insetos. Uma delas é pela reação de precipitina, um método clássico amplamente utilizado que consiste na interação de proteínas presentes no soro do sangue digerido pelo inseto, confrontado com antissoros de vertebrados pré-selecionados, geralmente hospedeiros já caracterizados como fonte de repasto sanguíneo. Outra técnica sorológica que tem sido utilizada é a reação imunoenzimática (ELISA) através do sistema avidina-biotina (SILVA, 2010). Ambas as técnicas possuem a limitação de necessitar antissoros de hospedeiros pré-selecionados, impedindo identificação de reservatórios imprevisíveis (HAOUAS et al., 2007). A técnica descrita mais recentemente é a molecular, através da amplificação por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) do *cytochrome b*, gene mitocondrial, já que sua amplificação com posterior sequenciamento ou pela PCR-RLFP (polimorfismo de fragmento de restrição ou *restriction fragment length*



*polymorphism* - RLFP) permite distinguir espécies de mamíferos e aves (OSHAGHI; CHAVSHIN; VATANDOOST, 2006).

Pelas técnicas sorológicas, as investigações são realizadas utilizando-se antissoros de espécies já conhecidas como fonte de repasto de cão, boi, porco, ser humano, ave, gambá e roedores, além da pesquisa de reações mistas, com avaliação de espécies distintas na mesma fêmea (BARATA et al., 2005; CAMARGO-NEVES; RODAS; GOMES, 2007; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008). No Brasil, apenas o trabalho de Camargo-Neves et al. (2007) pesquisou gatos e cavalos além de cães, aves, roedores e seres humanos como fonte de repasto de *Lu. longipalpis* pela técnica da precipitina, resultando em alta cinofilia, seguido pela alimentação em seres humanos e em aves. Não houve identificação de repasto em gatos. Pelas técnicas moleculares, DNA de galinha, cães, ratos domésticos e humanos são os mais comumente encontrados (MACEDO-SILVA et al., 2014; CARVALHO et al., 2017; FONTELES et al., 2018; LEONEL, 2019), apesar de gatos já terem sido identificados como fontes de alimentação para *Lu. longipalpis* (SALES et al., 2015). Os resultados obtidos por todos os estudos têm demonstrado que a espécie transmissora da LV apresenta hábitos oportunistas e de fácil adaptação a novos ambientes (PIMENTA; DE FREITAS; SECUNDINO, 2012).

#### 2.4 CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma enfermidade dependente de três fatores: presença do reservatório, no caso da *L. infantum*, o cão; presença do vetor, que no Brasil é o *Lu. longipalpis* e, por fim, presença do parasita, que é *L. infantum*. Desta forma, o controle em humanos é baseado na caracterização da doença de acordo com sua evolução clínica e do diagnóstico laboratorial através da reação de Imunofluorescência Indireta e do ELISA, bem como através de aspirados de medula óssea e baço com presença de amastigotas do parasita, seguido pelo tratamento e notificação de indivíduos sintomáticos (BRASIL, 2014). Já em cães, o diagnóstico laboratorial é realizado através do teste rápido DPP seguida pelo ELISA em ou eutanásia; controle do vetor com inseticidas piretroides e melhorias de fatores socioambientais para inviabilizar a disseminação da doença, com educação em saúde à população (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; BRASIL, 2014; COURA-VITAL et al., 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019). A eutanásia dos cães soropositivos é amplamente criticada pela comunidade científica por diversos motivos: não há comprovação de sua eficácia;

pode haver reservatórios não conhecidos capazes de manter o parasito circulante; animais eutanasiados são rapidamente repostos por animais jovens; a baixa sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos determinantes para a eutanásia de positivos; e, por fim, não é viável para os órgãos oficiais nem para a comunidade, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2019).

O controle oficial ainda não recomenda utilização de coleira impregnada com deltametrina e o controle multifatorial é altamente criticado devido ao baixo repasse de verbas para este propósito, somado à dificuldade de operacionalização de técnicas diagnósticas e complexidade da doença. Segundo Dye (1996), o uso de inseticidas é a técnica mais efetiva na redução da prevalência da LV. O controle por utilização de coleira impregnada com deltametrina vem sendo cada vez mais estudada em diversas regiões endêmicas (OLIVEIRA-LIMA et al., 2002; QUINNELL; COURTENAY, 2009; WERNECK et al., 2014) e tem apresentado bons resultados, desde que utilizada de forma ininterrupta, além de ser recomendada pelos membros do tratado do Doenças dos Animais de Companhia Transmitidas por Vetores (CVBD – *Companion Vector-Borne Diseases*) (COURA-VITAL et al., 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019). Para complementar, um recente estudo realizado no Brasil indica o uso de colar impregnado com inseticida como a medida de controle mais eficiente contra LV (DANTAS-TORRES et al., 2020). No entanto alguns autores acreditam que não é viável no Brasil, uma vez que piretroides são pouco sustentáveis do ponto de vista econômico e de manejo devido ao curto poder residual da mesma, tornando necessária a substituição de coleiras a cada semestre (ROMERO; BOELAERT, 2010; ROMERO, 2016).

Como o controle da LV no Brasil ainda é baseado na eutanásia de cães positivos à sorologia, sem distinguir animais que realmente são infecciosos ao vetor (BRASIL, 2014; WERNECK et al., 2014), formas de identificar cães infectados por *L. infantum* que de fato atuam como fonte de infecção ao flebotomíneo, têm sido pesquisadas. O xenodiagnóstico é a única forma de identificar cães infecciosos. São focos dos atuais estudos de xenodiagnóstico a busca por diferenças de transmissibilidade entre presença ou ausência de sinais clínicos, bem como formas de diagnosticar estes animais (comparação entre diversos testes sorológicos e PCR), além da busca de parâmetros que os diferencie, como parasitemia nos tecidos (pele

e baço) e transmissibilidade após tratamento, no entanto, os estudos não apresentam um padrão e não há técnica diagnóstica disponível capaz de identificar cães infecciosos, o que dificulta o controle da doença (RIBEIRO et al., 2008; LAURENTI et al., 2013; BORJA et al., 2016; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016; DE MENDONÇA et al., 2017).

Em gatos com sinais clínicos, poucos estudos xenodiagnósticos, um deles realizado na Itália, com o vetor *Phlebotomus perniciosus* e dois no Brasil, considerando o *Lu. longipalpis* como vetor, foram realizados. Nos três estudos houve animais infecciosos aos flebotomíneos (MAROLI et al., 2007; DA SILVA et al., 2010; DE MENDONÇA et al., 2020), com taxa de infecção entre 21 % e 13,1%. No trabalho de Mendonça et al. (2020), a taxa de infecção nos flebotomíneos não foi mensurada, no entanto, de 12 gatos estudados, oito (67%) foram capazes de transmitir o parasito aos flebotomos.

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a infectividade de *Lu. longipalpis* por *L. infantum*, pelo repasto em gatos naturalmente infectados.

### 4 REFERÊNCIAS

AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; DEANE, L. M. **Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1986. .

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>>.

AKHTARDANESH, B. et al. Low susceptibility of domestic cats to experimental Leishmania infantum infection. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 3, p. 230–234, 2018.

AL-SALEM, W.; HERRICKS, J. R.; HOTEZ, P. J. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1743-7>>.

ASHFORD, R. W. When Is a Reservoir Not a Reservoir? [4]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1495–1496, 2003.

AYLLÓN, T. et al. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 2, p. 143–150, 2012.

BARATA, R. A. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421–425, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v38n5/a12v38n5.pdf>>.

BELO, V. S. et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 57, p. 1–13, 2013.

BENASSI, J. C. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 93–97, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.004>>.

BENASSI, J. C. et al. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1058–1063, 2018.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–155, 2006.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.004>>.

BRAGA, A. R. C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2014.

BRASIL. **Panorama do Município de Ilha Solteira, SP - Brasil.**

BRASIL, M. da S. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** 1. ed., f. ed. Brasília - DF: Departamento de Vigilância Eídemiológica, 2014.

BRASIL, M. da S. **Leishmaniose Visceral: Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - 2007 a 2017**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>>.

BRASIL, M. da S. **Ministério da Saúde – Leishmaniose Visceral: Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - 2001 a 2006**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinanwin/cnv/leishvsp.def>>.

BRUFORD, M. W. et al. Multi-Locus and Single-Locus DNA Fingerprinting. In: **Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach**. Oxford: IRL Press, 1998. p. 287–336.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de et al. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998-1999. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1263–1267, 2001.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. De; RODAS, L. A. C.; GOMES, A. de C. Evaluation of feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* in the State of São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, p. 2–7, 2007.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 396–399, 2010.

CARVALHO, G. M. L. et al. Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa Branca, Brazil, using the cytochrome b PCR method. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 1049–1054, 2017.

CDC, C. for D. C. and P. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

CERBINO NETO, J.; WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1543–1551, 2009.

CHAPMAN, L. A. C. et al. Age trends in asymptomatic and symptomatic *Leishmania donovani* infection in the Indian subcontinent: A review and analysis of data from diagnostic and epidemiological studies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1–24, 2018.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1748>>.

COELHO, W. M. D. et al. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2–3, p. 281–282, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.052>>.

COLMENARES, M. et al. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. S3–S7, 2002.

COSTA, T. A. C. et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 212, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26858>>.

COURA-VITAL, W. et al. Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 411–417, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.031>>.

COURA-VITAL, W. et al. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–17, 2018.

DA SILVA, S. M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 150–154, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.005>>.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 12, p. E1–E4, 2019.

DANTAS-TORRES, F. et al. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, n. xxxx, p. 1–6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.01.001>>.

DANTAS DA SILVA, M. **Investigação de fatores ecológicos relacionados ao potencial de transmissão de Leishmania infantum por dois quimiotipos do complexo Lutzomyia longipalpis**. 2019. São Paulo, 2019.

DAVAL, N. et al. First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: Implications for new control measures and recommendations on importation of dogs. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1388-6>>.

DAY, M. J. Cats are not small dogs: Is there an immunological explanation for why cats are less affected by arthropod-borne disease than dogs? **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1798-5>>.

DE ARRUDA, R. M. F. et al. Space-time analysis of the incidence of human visceral leishmaniasis (VL) and prevalence of canine VL in a municipality of southeastern Brazil: Identification of priority areas for surveillance and control. **Acta Tropica**, v. 197, n. March, p. 105052, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105052>>.

DE MENDONÇA, I. L. et al. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia Longipalpis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 483–488, 2017.

DE MENDONÇA, I. L. et al. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, p. 109058, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401720300388>>.

DE NARVAJAS, I. M. et al. Acute liver failure due to visceral leishmaniasis in Barcelona: a case report. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 854, p. 5, 2019.

DESJEUX, P. Canine leishmaniasis: moving towards a solution - Proceedings

of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. (Intervet, Ed.) In: Urbanisation of Leishmaniasis, Sevilla - Spain. **Anais...** Sevilla - Spain: 2002.

DINIZ, M. M. C. de S. L. et al. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. p. 1–11, 2014.

DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://centreforeuropeanreform.blogspot.com/2010/01/pipeline-politics-why-nabucco-is-stuck.html>>.

DYE, C. The Logic of Visceral Leishmaniasis Control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125–130, 1996.

EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575–579, 2000. Disponível em: <[https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)>.

FERREIRA, G. R. et al. Human Competence to transmit *leishmania infantum* to *lutzomyia longipalpis* and the influence of human immunodeficiency virus infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 126–133, 2018.

FIGUEIREDO, F. B. et al. 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 Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 141–145, 2009.

FONTELES, R. S. et al. Detection of *Leishmania* DNA and Blood Meal Identification in Sand Flies ( *Diptera* : *Psychodidae* ) From Lençóis Maranhenses National Park Region , Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. XX(X), n. January, p. 1–7, 2018.



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

GAMA, A. et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 189–192, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.005>>.

GAO, C. H. et al. Survey of wild and domestic mammals for infection with *Leishmania infantum* following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–9, 2015.

GONZÁLEZ, E. et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. **Acta Tropica**, v. 152, p. 96–102, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>>.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>>.

HAOUAS, N. et al. Development of a Molecular Tool for the Identification of *Leishmania* Reservoir Hosts by Blood Meal Analysis in the Insect Vectors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 1054–1059, 2007.

HATAM, G. R. et al. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 3, p. 313–316, 2010.

JERONIMO, S. M. B. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 386–388, 1994.

KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, R. The initial establishment of sandfly colonies. **Parassitologia**, v. 33, n. 1, p. 315–320, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.

KONE, A. K. et al. Visceral Leishmaniasis in West Africa: Clinical Characteristics, Vectors, and Reservoirs. **Journal of Parasitology Research**, v. 2019, p. 1–8, 2019.

KUHLS, K. et al. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

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

LANA, R. S. et al. Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial analysis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–20, 2018.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>>.

LEONEL, J. A. F. **Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

LINS, R.; SOUZA, N. A.; PEIXOTO, A. A. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production. v. 103, n. November, p. 736–740, 2008.

LOBSIGER, L. et al. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3–4, p. 408–414, 2010.

MACEDO-SILVA, V. P. et al. Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 237–244, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. et al. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 120–126, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.031>>.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341–344, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>>.

MARGONARI, C. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31–38, 2006.

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

MARTÍN-SÁNCHEZ, J. et al. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 267–273, 30 abr. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706006418?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

MIRÓ, G.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “ One Health ” principles into practice. **Veterinary Parasitology**, v. 254, n. March, p. 151–159, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>>.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76–78, 2011.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* ( Lutz & Neiva , 1912 ) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365–368, 2008.

MOLINA, R. et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008253, 2020.

MONTOYA, A. et al. Implications of zoonotic and vector-borne parasites to free-roaming cats in central Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 251, n. December 2017, p. 125–130, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.009>>.

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

NAUCKE, T. J.; AMELUNG, S.; LORENTZ, S. First report of transmission of canine leishmaniasis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1551-0>>.

NETO, L. da S. et al. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-Leishmania spp. antibodies in Felis catus. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3–4, p. 374–377, 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 13 ed. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

OLIVEIRA-LIMA, J. W. et al. Preliminary results of a field trial to evaluate deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis in northeast Brazil. **Canine leishmaniasis: Moving towards a solution.**, p. 7–14, 2002.

OLIVEIRA, A. M. et al. Dispersal of Lutzomyia longipalpis and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233–242, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.014>>.

OLIVEIRA, T. M. F. de S. et al. Conjunctival swab PCR to detect Leishmania spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 220–222, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612015000200220&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612015000200220&lng=en&tlng=en)>.

OSHAGHI, M. A.; CHAVSHIN, A. R.; VATANDOOST, H. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 4, p. 259–264, 2006.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339–345, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>>.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076–1083, 2001.

PAŞA, S. et al. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 3–4, p. 389–392, 2015.

PENNISI, M. G. et al. Leishmaniosis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 638–642, 2013.

PENNISI, M. G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>>.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 35–47, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>>.

PENNISI, M. G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>>.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology**, v. 251, n. December 2017, p. 131–137, 2018.

PIMENTA, P. F. P.; DE FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: MOLECULAR, I. N. DE C. E T. EM E. (Ed.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. 1. ed. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ-MG, 2012. p. 1–45.

PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; BLANCO, E. Interação vetor hospedeiro-interação *Leishmania* - hospedeiro invertebrado. **Flebotomíneos do Brasil**, p. 275–289, 2003.

PITA-PEREIRA, D. de. **Aviação de Infecção Natural De Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. Empregando eSaaios de PCR multiplex e PCR em Tempo Real**. 2010. Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

PITA-PEREIRA, D. De et al. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* ( *Viannia* ) *braziliensis* in Rio de Janeiro ( Brazil ) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay , a Carvalho Britto. p. 905–913, 2005.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 2009.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227–250, 2013.

RIBEIRO, R. R. et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2564–2572, 2008.

ROCHA, A. V. V. O. et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 273, n. August, p. 80–85, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.007>>.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–275, 1 out. 1990. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014489490900317?via%3Dihub>> . Acesso em: 2 mar. 2019.

RODRIGUES, A. C. M. et al. Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Veterinary Parasitology**, v. 220, p. 28–32, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.018>>.

ROMERO, G. A. S. O controle de leishmaniose visceral no Brasil: Transformar é preciso. **Cadernos de Saude Publica**, v. 32, n. 6, p. 1–3, 2016.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.

ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2005.

ROUGERON, V. et al. First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 325–328, 2011.

SALES, K. G. D. S. et al. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 4–9, 2015. Disponível em: <????>.

SAVANI, E. S. M. M. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229–233, 2004.

SERGENT, E.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 5, p. 93–98, 1912.

SEVÁ, A. da P. et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2017.

SILVA, D. T. da. **Avaliação da resosta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum***. 2019. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 2019.

SILVA, F. de O. L. e. **Leishmaniose Tegumentar Americana em Governador Valadares (minas Gerais, Brasil): estudo de reservatórios e vetores**. 2010. Centro de Pesquisa René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, 2010.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 2009.

SOARES, I. R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 665–669, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.014>>.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): A Review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301–330, 2003.

SOBRINHO, L. S. V. et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.

187, n. 1–2, p. 302–306, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1–16, 2011. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>>.

SPADA, E. et al. Serological and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* Infection in Stray Cats in a Nonendemic Area in Northern Italy . **ISRN Parasitology**, v. 2013, n. January 2010, p. 1–6, 2013.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis in colombia: Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3–4, p. 119–124, 2001.

VIDES, J. P. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1–2, p. 22–28, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.042>>.

VIOL, M. A. et al. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, p. 3479–3484, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5111-5>>.

VIOTI, G. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp . in brazilian cattle by means of PCR using internal transcribed spacer 1. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2961, 2019.

WERNECK, G. L. et al. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3172, 2014.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saude Publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WHO, W. H. O. **News Room/Leishmaniasis - Key Facts.**

WHO, W. H. O. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>.



**1 5 ARTIGO****2 Xenodiagnóstico em gatos domésticos naturalmente infectados por *Leishmania*****3 *infantum***

4 Geovanna Vioti<sup>1</sup>, Mariana Dantas da Silva<sup>2</sup>, Freddy Galvis-Ovallos<sup>2</sup>, Maria Luana

5 Alves<sup>1</sup>, Diogo Tiago da Silva<sup>1</sup>, João Augusto Franco Leonel<sup>1</sup>, Nuno Wolfgang Pereira

6 Balbini<sup>1</sup>, Julia Cristina Benassi<sup>3</sup>, Júlio Cesar Pereira Spada<sup>1</sup>, Carla Maia<sup>5</sup> Eunice

7 Aparecida Bianchi Galati<sup>2</sup>, Wilma Aparecida Starke-Buzetti<sup>4</sup>, Trícia Maria Ferreira de

8 Sousa Oliveira<sup>1,3</sup>

9 <sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da  
10 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo  
11 - SP

12 <sup>2</sup> Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São  
13 Paulo, São Paulo - SP

14 <sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de  
15 Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP

16 <sup>4</sup> Departamento de Biologia e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira,  
17 SP.

18 <sup>5</sup> Universidade NOVA de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical

19

20

21

22

23

**24           Resumo**

25           O papel dos gatos na transmissão de leishmaniose visceral (LV) tem ganhado  
26 espaço desde a primeira evidência da transmissibilidade de *Leishmania infantum* para  
27 flebotomíneos através de xenodiagnóstico. Com o objetivo de ampliar os estudos sobre o  
28 papel destes animais no ciclo de transmissão da LV em áreas urbanas, quatro gatos  
29 naturalmente infectados por *L. infantum*, diagnosticados através de RIFI, ELISA e PCR  
30 com sequenciamento 100% compatível com *L. infantum*, foram avaliados quanto à  
31 presença de sinais clínicos e alterações hematológicas e submetidos a xenodiagnóstico.  
32 Dos quatro animais positivos, todos apresentavam sinais clínicos compatíveis com a  
33 doença e alterações hematológicas, três apresentaram parasitológico positivo, com a  
34 presença de amastigotas em medula óssea e/ou linfonodo. Um total de 203 flebotomíneos  
35 foram expostos para alimentação nos 4 gatos, resultando em 100% das fêmeas  
36 ingurgitadas. Ensaios parasitológico e molecular foram realizados para avaliar a presença  
37 de *L. infantum* no intestino dos flebotomíneos. Dez fêmeas de *Lu. longipalpis* (4,9%)  
38 foram positivas no ensaio parasitológico de um dos gatos e 17 (8,4%) fêmeas alimentadas  
39 em dois gatos resultaram na amplificação de DNA de *L. infantum*, o que evidencia que  
40 gatos naturalmente infectados são competentes em transmitir *L. infantum* ao vetor.

41           **Palavras-chave:** Leishmaniose felina, *Lutzomyia longipalpis*, leishmaniose  
42 visceral

43

**44 Abstract**

45 Cats have been gained attention on visceral leishmaniasis (VL) transmissibility  
46 since the first evidence of phlebotomine's infection by *Leishmania infantum* from  
47 naturally infected cat. Aiming to expand studies regarding feline's role on *L. infantum*  
48 VL cycle at urban areas, four naturally infected cats diagnosed using IFAT, ELISA and  
49 PCR with sequencing 100% compatible with *L. infantum* were evaluated according to  
50 clinical signs and haematological changes and subjected to xenodiagnosis. All cats  
51 presented clinical signs compatible with the disease and/or haematological changes.  
52 Three of them presented amastigotes at parasitological assay from bone marrow and/or  
53 lymph nodes. Parasitological and molecular assays were used to identify *L. infantum* at  
54 *Lutzomyia longipalpis*' gut from 203 phlebotomines fed on the 4 cats, which resulted in  
55 100% of engorged females. Ten (4,9%) *Lu. longipalpis* female feed in one cat showed  
56 promastigotes at parasitological assay, while 17 (8,4%) feed in two cats amplified *L.*  
57 *infantum* DNA, evidencing that naturally infected cats are competent to transmit *L.*  
58 *infantum* to *Lu. longipalpis*.

59 **Keywords:** Feline leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, visceral leishmaniasis

## 60 1 Introdução

61 A leishmaniose visceral (LV) é uma doença transmitida por vetores que depende  
62 da tríade parasita-vetor-hospedeiro presentes no mesmo ambiente para se manter  
63 circulante (Lana et al., 2018). *Leishmania infantum* é o agente causador da LV zoonótica  
64 nas Américas e na Europa, continentes nos quais cães são considerados reservatórios  
65 primários da doença (Miró & López-vélez, 2018; Werneck, 2014).

66 No Brasil, o parasita é transmitido principalmente através da picada da fêmea do  
67 flebotomíneo *Lu. longipalpis*, um inseto bem adaptado a diferentes condições climáticas,  
68 com hábito de alimentação oportunista (Rocha et al., 2019). A princípio, o vetor habitava  
69 predominantemente áreas rurais. Contudo, ele tem se adaptado a ambientes urbanos e  
70 seguindo a migração humana e modificações do seu ecossistema natural (A. M. Oliveira  
71 et al., 2016). Ambientes com presença de animais domésticos, árvores frutíferas e matéria  
72 orgânica como lixo sustentam a proliferação de *Lu. longipalpis* (Lana et al., 2018; Rocha  
73 et al., 2019).

74 Devido ao aumento de casos de LV e do número de municípios endêmicos,  
75 reservatórios urbanos desconhecidos têm sido investigados. Apesar de LV felina já ter  
76 sido descrita nas Américas, Europa e Ásia (Pennisi & Persichetti, 2018; Vides et al.,  
77 2011), gatos infectados experimentalmente por *L. infantum* demonstraram que estes  
78 animais apresentam resistência à doença, reafirmando que gatos podem ser reservatórios  
79 assintomáticos (Akhtardanesh et al., 2018) e experimentos de xenodiagnósticos em gatos  
80 doentes resultaram no desenvolvimento de *L. infantum* em flebotomíneos na Itália e no  
81 Brasil, (da Silva et al., 2010; de Mendonça et al., 2020; Maroli et al., 2007). Nada se sabe  
82 sobre a diferença na infecção de flebotomíneos entre gatos que apresentem ou não sinais  
83 clínicos e que estejam em diferentes estágios da doença. Seguindo este raciocínio, o  
84 objetivo do presente estudo foi expandir em número e em variedade de gatos avaliados

85 nos experimentos, para compreender melhor o papel de gatos da transmissão da LV e  
86 avaliar a competência vetorial do *Lu. longipalpis* para transmitir *L. infantum*, ao  
87 alimentar-se em gatos naturalmente infectados.

## 88 **2 Material e Métodos**

### 89 **2.1 Área de estudo**

90 Os xenodiagnósticos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia da  
91 Universidade Estadual de São Paulo, localizada no município de Ilha Solteira, São Paulo,  
92 classificado como endêmico para LV (Brasil, 2019a). O município encontra-se às  
93 margens do rio Paraná, com fragmentos florestais e áreas rurais. Em 2018, o Instituto  
94 Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Brasil, 2018), estimou que Ilha Solteira  
95 possuía uma população de 26.582 pessoas e, segundo Brasil (2019b), de 2007 a 2017 o  
96 município notificou 5 casos humanos de LV.

97 A dissecação de flebotomíneos foi realizada no Laboratório de Entomologia em  
98 Saúde Pública, na cidade de São Paulo, e a detecção molecular foi realizada no  
99 Laboratório de Medicina Veterinária Aplicada no município de Pirassununga, ambos da  
100 Universidade de São Paulo (USP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da  
101 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, com número 8541011019.

### 102 **2.2 Seleção dos animais**

103 Quatro gatos participaram do estudo, sendo três fêmeas e um macho. Todos  
104 sorologicamente positivos para *Leishmania* spp. pela Reação de Imunofluorescência  
105 Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), realizados de acordo com Vides et al.  
106 (2011) e Costa et al. (2010) respectivamente. Todos também foram positivos pela PCR  
107 para *Leishmania* spp. descrita por Rodgers et al. (1990) e El Tai et al. (2000), a partir de  
108 DNA extraído de amostras sanguíneas dos gatos, com sequenciamento 100% idêntico a

109 *L. infantum*. A avaliação clínica incluiu caracterização dos sinais clínicos por exames  
110 clínicos, hemograma e bioquímica sérica (Tabela 1). Além disso, dos 4 gatos estudados,  
111 todos apresentaram amplificação com sequenciamento 100% idêntico a *L. infantum*  
112 (MN412821.1; KY658232.1; KY963127.1) e três apresentaram positividade no  
113 parasitológico de linfonodo/medula óssea.

## 114 **2.3 Xenodiagnóstico**

115 Experimentos xenodiagnósticos, com a mesma metodologia, foram realizados  
116 com os quatro animais (Figura 1), sendo que em 3 deles foram realizados dois  
117 xenodiagnósticos em diferentes momentos da evolução da doença, e em um animal, um  
118 experimento.

### 119 *2.3.1 O vetor: Lutzomyia longipalpis*

120 Foram utilizadas fêmeas de 3 a 5 dias, cultivadas em colônia fechada de *Lu.*  
121 *longipalpis*, mantidas de acordo com Killick-Kendrick (1991), modificada segundo  
122 Galvis-Ovallos et al. (2017) no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde  
123 Pública da Universidade de São Paulo. No primeiro xenodiagnóstico, foram submetidas  
124 ao experimento de 28 a 39 fêmeas em cada gato. Machos também foram soltos para  
125 estimular o repasto sanguíneo.

### 126 *2.3.2 Repasto sanguíneo das fêmeas nos gatos*

127 Os gatos foram anestesiados com Telazol (11mg/kg) (Zoetis-US) e tramadol  
128 (2mg/kg) e alocados em cabanas individuais de 50x30x30 cm, seguido pela soltura dos  
129 flebotomíneos nas cabanas. Os gatos foram mantidos completamente expostos ao repasto  
130 por 60 minutos (Figura 2).

### 131 2.3.3 Ensaio parasitológico

132 A dissecação foi realizada com o auxílio de lupa com amplificação de 60X, assim  
133 que as fêmeas morriam. Fêmeas vivas até o sétimo dia após a alimentação foram  
134 eutanasiadas por congelamento a -12°C durante 15 minutos. O intestino das fêmeas foi  
135 avaliado com microscópio óptico (400X) para cálculo da taxa de infecção segundo Diniz  
136 et al. (2014), com observação da presença ou ausência de sangue e de promastigotas. A  
137 intensidade de promastigotas foi expressa com a utilização de cruces de acordo com Travi  
138 et al. (2001), sendo (-) ausência de promastigotas; (+) presença de 1-50 promastigotas;  
139 (++) 51-100; (+++) 101-200; e (++++>) > 201 promastigotas.

### 140 2.3.4 Ensaio moleculares

141 Devido à presença de sangue ou da degradação em algumas fêmeas, houve  
142 também avaliação por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de todas as fêmeas. A  
143 extração do DNA das fêmeas de flebotomíneos foi realizada de acordo com Bruford et al.  
144 (1998) e modificado por Galvis-Ovallos et al. (2017). A qualidade da extração foi  
145 verificada através da amplificação do gene cacofônico IVS6, com primers 5LIcac (5'-  
146 GTGGCCGAACATAATGTTAG-3') e 3LIcac (5'-CCACGAACAAGTTCAACATC-  
147 3'), descritos por Lins et al. (2008) e a PCR foi realizada conforme descrito por Pita-  
148 Pereira et al. (2005). Para identificar a presença de *Leishmania* spp. em amostras das  
149 fêmeas de flebotomíneos, a região do minicírculo do kDNA foi amplificada de acordo  
150 com Rodgers et al. (1990). Como descrito anteriormente, amostras positivas no kDNA  
151 para *Leishmania* spp. tiveram o DNA ribossomal amplificado de acordo com El Tai et al.  
152 (2000).

## 153 3 Resultados

154 Dos 4 gatos estudados, 1 (25%) gato (número 4), apresentando apenas magreza  
155 como sinal clínico aparente e alterações hematológicas e bioquímicas evidentes, foi capaz

156 de transmitir *L. infantum* ao vetor pela análise parasitológica do intestino das fêmeas. Foi  
157 possível amplificar o DNA do parasito de fêmeas alimentadas em 2 (50%) gatos. No total,  
158 203 fêmeas foram utilizadas para realizar o repasto nos gatos naturalmente infectados por  
159 *L. infantum* durante os xenodiagnósticos. Todas as fêmeas de *Lu. longipalpis* ficaram  
160 completamente ingurgitadas. Destas, 154 (75,9%) foram dissecadas. A presença de  
161 sangue foi observada em 91 (44,8%) fêmeas. Nas análises parasitológicas, destacaram-se  
162 10 (4,9%) fêmeas alimentadas no gato 4 que estavam infectadas (Figura 3): 8 com  
163 intensidade de uma cruz (+); 1 (++) e 1 (++++). As análises moleculares resultaram em  
164 17 (8,4%) fêmeas positivas pela PCR, sendo 1 no gato 3 e 16 fêmeas alimentadas no gato  
165 4 (Figura 3), as fêmeas alimentadas nos demais gatos foram negativas (Tabela 3).

#### 166 4 Discussão

167 Desde o primeiro relato de LF (Sergent, Lombard, & Quilichini, 1912), casos da  
168 doença ou infecção vêm sendo descritas em todo o mundo, incluindo América do Sul  
169 (Benassi et al., 2017; T. M. F. de S. Oliveira et al., 2015; Savani et al., 2004; Vides et al.,  
170 2011), Europa (Maroli et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2007; Pennisi et al., 2013) e  
171 Ásia (Hatam et al., 2010; Nasereddin, Salant, & Abdeen, 2008). Além do mais, até o  
172 momento foram descritos três xenodiagnósticos que obtiveram resultados confirmando a  
173 transmissibilidade de *L. infantum* a duas espécies de flebotomíneos, a partir do repasto  
174 em gatos naturalmente infectados (da Silva et al., 2010; de Mendonça et al., 2020; Maroli  
175 et al., 2007). O primeiro foi realizado na Itália, tendo como vetor a espécie *Phlebotomus*  
176 *pernicius* (Maroli et al., 2007), que apresenta grandes diferenças quando comparado ao  
177 *Lu. longipalpis*, incluindo hábitos alimentares e desenvolvimento do parasita no  
178 flebótomo (Ready, 2013). Quinnell & Courtenay (2009) enfatiza que a proporção de *P.*  
179 *pernicius* infectados por *L. infantum* quando alimentado em cães é maior do que *Lu.*  
180 *longipalpis*, o que indica maior susceptibilidade do flebotomíneo europeu. No Brasil, da



181 Silva et al., (2010) usou *Lu. longipalpis* para estudar a possibilidade de o flebotômíneo  
182 ser infectado por *L. infantum* a partir do repasto em um gato naturalmente infectado. Já  
183 em um experimento similar a este, Mendonça et al. (2020) estudaram 12 gatos, resultando  
184 em 8 (67%) animais capazes de transmitir o parasito a flebotômíneos. De um total de 542  
185 flebotômíneos, 158 (29,2%) foram infectados. Nos três estudos, a maioria dos felinos  
186 capazes de transmitir *L. infantum* ao vetor apresentavam ao menos três alterações clínicas  
187 e todos eram positivos pela citologia de medula óssea (tabela 4).

188 O presente estudo resultou em 100% das fêmeas ingurgitadas. Das 203 fêmeas  
189 que participaram do estudo, 10 (4,9%) estavam infectadas no parasitológico, a PCR com  
190 primers direcionados ao kDNA de *L. infantum* foi positiva em 14 (6,9%) e 16 (7,9%)  
191 foram positivas na PCR tendo o ITS1 como alvo. No total, foram 17 fêmeas positivas nas  
192 diferentes técnicas e nos dois felinos. Assim como nos demais estudos, foi possível  
193 observar o desenvolvimento de *L. infantum* em flebótomos alimentados no gato 4, que  
194 apresentava magreza, títulos sorológicos elevados (nível ELISA 9 e RIFI 1:360) e  
195 intensas alterações hematológicas e bioquímicas, como diminuição de plaquetas e  
196 hiperglobulinemia, podendo ser classificado no estágio III da doença, de acordo com o  
197 estadiamento sugerido por Solano-Gallego et al. (2011) para cães, o que enfatiza a  
198 importância de realizar exames hematológicos e bioquímicos no diagnóstico da doença.  
199 No experimento de Silva et al., (2010), os animais infecciosos ao vetor apresentaram  
200 aumento de ureia sérica e de Aspartato aminotransferase (AST), com titulação de RIFI de  
201 1:160. Já no experimento de Maroli et al. (2007), não houve pesquisa de alterações  
202 hematológicas ou bioquímicas, mas a titulação de RIFI também foi 1:160, enquanto no  
203 xenodiagnóstico realizado por Mendonça et al., (2020) não houve pesquisa por alterações  
204 hematológicas e bioquímicas, nem diagnóstico sorológico (tabela 4).

205 Juntamente com xenodiagnósticos, é fundamental investigar fontes naturais de  
206 repasto do *Lu. longipalpis* (Maia & Campino, 2011), uma vez que para ser considerado  
207 reservatório, é necessário que o hospedeiro seja frequente fonte de alimentação ao vetor  
208 (Ashford, 2003; Quinnell & Courtenay, 2009). No Brasil, dentre as pesquisas por hábitos  
209 alimentares de flebotomíneos, apenas um estudo utilizando técnica sorológica pesquisou  
210 felinos como fonte de alimentação de *Lu. longipalpis* e não houve repasto nestes animais  
211 (Camargo-Neves, Rodas, & Gomes, 2007). Através da identificação molecular, os DNAs  
212 mais comumente encontrados foram de galinha, cães, ratos domésticos e humanos  
213 (Carvalho et al., 2017; Fonteles et al., 2018). No entanto, Sales et al. (2015) identificaram  
214 uma fêmea de *Lu. longipalpis* que realizou repasto em humanos, cães e gatos e o DNA de  
215 gatos foi encontrado em *Phlebotomus perniciosus* na Espanha, utilizando-se a técnica de  
216 *cyt-B* (González et al., 2015). É importante mencionar que flebotomíneos oportunistas  
217 como *Lu. longipalpis* possuem maior capacidade vetorial de transmitir o protozoário a  
218 outros hospedeiros, uma vez que estão mais expostos à infecção por *Leishmania* spp.  
219 (Pimenta, de Freitas, & Secundino, 2012). Além disso, a maioria dos estudos que  
220 pesquisam pelos hábitos alimentares de flebotomíneos utilizam armadilhas do tipo CDC  
221 para captura dos vetores, técnica que não atrai grande número de fêmeas ingurgitadas  
222 (Galvis-Ovallos et al., 2017). Sales et al. (2015), que identificaram o gato como fonte de  
223 repasto para *Lu. longipalpis*, realizaram captura ativa dos flebotomíneos.

224 Assim como em cães, nem todos os gatos foram infecciosos, sendo que dos 4  
225 felinos testados, dois (50%), foram infecciosos às fêmeas e em um deles apenas uma  
226 fêmea foi positiva, pela análise molecular. Cães são importantes hospedeiros de  
227 flebotomíneos e ainda são considerados os principais reservatórios urbanos da LV (Barata  
228 et al., 2005; Chappuis et al., 2007; Quinnell & Courtenay, 2009). Enquanto o foco atual  
229 de xenodiagnósticos realizados em cães é identificar diferenças entre animais que são

230 realmente infecciosos aos flebotomíneos, com comparações entre inúmeras situações  
231 diferentes como presença ou ausência de sinais clínicos; parasitemia no sangue, na pele e  
232 em outros tecidos ou técnicas diagnósticas, em gatos estes estudos ainda são embrionários  
233 (Borja et al., 2016; De Mendonça et al., 2017; Ribeiro et al., 2008). Vale ressaltar que o  
234 gato infeccioso aos flebotomíneos apresentava magreza como sinal clínico aparente e era  
235 positivo pela citologia de medula óssea, como os gatos infecciosos do estudo de  
236 Mendonça et al. (2020). Este estudo também demonstra a importância de investigar as  
237 diferenças entre gatos que realmente são fontes de infecção em relação aos que não são.

238         Apesar de a LV humana ser, ao longo do tempo, correlatada com a LV canina  
239 (Belo et al., 2013; Camargo-Neves et al., 2001; Margonari et al., 2006), com maior  
240 prevalência em cães do que em humanos ou gatos (Pennisi & Persichetti, 2018), dados  
241 epidemiológicos inconsistentes já foram relatados no Brasil quanto ao papel de gatos. O  
242 primeiro caso autóctone de gato infectado por *L. infantum* nas Américas ocorreu em um  
243 município na época não endêmico do estado de São Paulo, Brasil, no qual nem casos  
244 humanos nem casos caninos autóctones haviam sido relatados (Savani et al., 2004). É  
245 fundamental avaliar o que é essencial e periférico no que se diz respeito à prevenção e ao  
246 controle da LV. A eliminação da transmissão pode acontecer controlando a doença em  
247 reservatórios primários, enquanto o controle em reservatórios secundários pode reduzir a  
248 transmissibilidade. Portanto, modelos matemáticos são necessários para estimar a  
249 contribuição de felinos em manter o parasita circulante (Quinnell & Courtenay, 2009).

## 250         **5 Conclusão**

251         Dois dos quatro gatos estudados foram capazes de transmitir o parasito aos  
252 flebotomos, um deles confirmado por testes parasitológico e molecular e outro apenas  
253 pelo molecular. A presença da magreza como sinal aparente da LF e várias alterações  
254 hematológicas e sorológicas no gato infeccioso pelo parasitológico mostram a

255 importância do diagnóstico laboratorial da doença em gatos de área endêmica. Maiores  
 256 estudos para identificar as principais características dos gatos capazes de transmitir *L.*  
 257 *infantum* ao vetor e hábitos alimentares de flebotomíneos são necessários, além de ensaios  
 258 epidemiológicos que correlacionem gatos como fator de risco para a LV humana para que  
 259 seja possível determinar a infectividade dos vetores a partir de gatos.

## 260 6 Agradecimentos

261 Agradecemos à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),  
 262 processos: 2017/14855-9 e 2016/08018-4 e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
 263 de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001.

## 264 7 Referências

- 265 Akhtardanesh, B., Kheirandish, R., Sharifi, I., Mohammadi, A., Mostafavi, A.,  
 266 Mahmoodi, T., & Ebrahimi, M. (2018). Low susceptibility of domestic cats to  
 267 experimental *Leishmania infantum* infection. *Journal of Vector Borne Diseases*,  
 268 55(3), 230–234. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.249481>
- 269 Ashford, R. W. (2003). When Is a Reservoir Not a Reservoir? [4]. *Emerging Infectious*  
 270 *Diseases*, 9(11), 1495–1496.
- 271 Barata, R. A., França-Silva, J. C., Mayrink, W., da Silva, J. C., Prata, A., Lorosa, E. S.,  
 272 ... Dias, E. S. (2005). Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos  
 273 em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Revista Da Sociedade*  
 274 *Brasileira de Medicina Tropical*, 38(5), 421–425. Retrieved from  
 275 <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v38n5/a12v38n5.pdf>
- 276 Belo, V. S., Struchiner, C. J., Werneck, G. L., Barbosa, D. S., de Oliveira, R. B., Teixeira  
 277 Neto, R. G., & da Silva, E. S. (2013). A systematic review and meta-analysis of the  
 278 factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary*  
 279 *Parasitology*, 195(57), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.010>
- 280 Benassi, J. C., Benvenga, G. U., Ferreira, H. L., Pereira, V. F., Keid, L. B., Soares, R., &  
 281 Oliveira, T. M. F. de S. (2017). Detection of *Leishmania infantum* DNA in  
 282 conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Experimental*  
 283 *Parasitology*, 177, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.004>
- 284 Borja, L. S., Sousa, O. M. F. de, Solcà, M. da S., Bastos, L. A., Bordoni, M., Magalhães,  
 285 J. T., ... Veras, P. S. T. (2016). Parasite load in the blood and skin of dogs naturally  
 286 infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly  
 287 vectors. *Veterinary Parasitology*, 229, 110–117.  
 288 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.004>
- 289 Brasil. (2018). Panorama do Município de Ilha Solteira, SP - Brasil.
- 290 Brasil, M. da S. (2019a). Leishmaniose Visceral: Casos Confirmados Notificados no

- 291 Sistema de Informação de Agravos de Notificação - 2007 a 2017. Retrieved from  
292 Ministério da Saúde, Brasília website:  
293 <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>
- 294 Brasil, M. da S. (2019b). Ministério da Saúde – Leishmaniose Visceral: Casos  
295 Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação -  
296 2001 a 2006. Retrieved from São Paulo, Brasília website:  
297 <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinanwin/cnv/leishvsp.def>
- 298 Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfiend, J. F. ., & Burke, T. (1998). Multi-Locus and  
299 Single-Locus DNA Fingersprinting. In *Molecular Genetic Analysis of Population:*  
300 *A Prctical Approach* (pp. 287–336). Oxford: IRL Press.
- 301 Camargo-Neves, V. L. F. de, Katz, G., Rodas, L. A. C. R., Poletto, D. W., Lage, L. C.,  
302 Spínola, R. M. F. S., & Cruz, O. G. (2001). Use of spatial analysis tools in the  
303 epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São  
304 Paulo, Brazil, 1998-1999. *Cadernos de Saúde Pública / Ministério Da Saúde,*  
305 *Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 17(5), 1263–1267.*  
306 <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2001000500026>
- 307 Camargo-Neves, V. L. F. De, Rodas, L. A. C., & Gomes, A. de C. (2007). Evaluation of  
308 feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* in te State of São Paulo. *Boletim*  
309 *Epidemiológico Paulista, 4, 2–7.*
- 310 Carvalho, G. M. L., Rêgo, F. D., Tanure, A., Silva, A. C. P., Dias, T. A., Paz, G. F., &  
311 Andrade Filho, J. D. (2017). Bloodmeal identification in field-collected sand flies  
312 from Casa Branca, Brazil, using the cytochrome b PCR method. *Journal of Medical*  
313 *Entomology, 54(4), 1049–1054.* <https://doi.org/10.1093/jme/tjx051>
- 314 Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., ... Boelaert, M.  
315 (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and  
316 control? *Nature Reviews Microbiology, 5(11), S7–S16.*  
317 <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- 318 Costa, T. A. C., Rossi, C. N., Laurenti, M. D., Gomes, A. A. D., Vides, J. P., Vicente  
319 Sobrinho, L. S., ... Mary, M. (2010). Ocorrência de leishmaniose em gatos de área  
320 endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*  
321 *Animal Science, 47(3), 212.* <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2010.26858>
- 323 da Silva, S. M., Rabelo, P. F. B., Gontijo, N. de F., Ribeiro, R. R., Melo, M. N., Ribeiro,  
324 V. M., & Michalick, M. S. M. (2010). First report of infection of *Lutzomyia*  
325 *longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of  
326 Brazil. *Veterinary Parasitology, 174(1–2), 150–154.*  
327 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.005>
- 328 de Mendonça, I. L., Batista, J. F., Lopes, K. S. P. do P., Neto, F. das C. R. M., Alcântara,  
329 D. S., Merigueti, Y. F. F. B., & Costa, C. H. N. (2020). Infection of *Lutzomyia*  
330 *longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology,*  
331 *109058.* <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109058>
- 332 De Mendonça, I. L., Batista, J. F., Werneck, G. L., Soares, M. R. A., Costa, D. L., &  
333 Costa, C. H. N. (2017). Serological tests fail to discriminate dogs with visceral  
334 leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia*

- 335 Longipalpis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(4), 483–  
336 488. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0014-2017>
- 337 Diniz, M. M. C. de S. L., Galves-Ovallos, F., de Castro, M. C., Gomes, Lavitschka, C. D.  
338 O., & Galati, A. E. B. (2014). *Host-biting rate and susceptibility of some suspected*  
339 *vectors to Leishmania braziliensis*. 1–11.
- 340 El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Genetic  
341 heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of  
342 *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand  
343 conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of*  
344 *Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575–579. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)
- 346 Fonteles, R. S., Pereira Filho, A. A., Moraes, J. L. P., Pereira, F. S. R., Rodrigues, B. L.,  
347 & Rebêlo, M. J. M. (2018). Detection of *Leishmania* DNA and Blood Meal  
348 Identification in Sand Flies (Diptera : Psychodidae) From Lençóis Maranhenses  
349 National Park Region, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, XX(X)(January), 1–  
350 7. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx230>
- 351 Galvis-Ovallos, F., Casanova, C., Sevá, A. da P., & Galati, E. A. B. (2017). Ecological  
352 parameters of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia*  
353 *longipalpis* complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil.  
354 *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2211-8>
- 355 González, E., Molina, R., Abras, A., Alcover, M. M., Ballart, C., Fernández, A., &  
356 Jiménez, M. (2015). Identification of blood meals in field captured sand flies by a  
357 PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. *Acta Tropica*, 152, 96–102.  
358 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>
- 359 Hatam, G. R., Adnani, S. J., Asgari, Q., Fallah, E., Motazedian, M. H., Sadjjadi, S. M., &  
360 Sarkari, B. (2010). First report of natural infection in cats with *leishmania infantum*  
361 in Iran. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 313–316.  
362 <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0023>
- 363 Killick-Kendrick, M., & Killick-Kendrick, R. (1991). The initial establishment of sandfly  
364 colonies. *Parassitologia*, 33(1), 315–320.
- 365 Lana, R. S., Michalsky, M., Lopes, L. O., Lara-Silva, F. O., Nascimento, J. L., Pinheiro,  
366 L. C., ... Dias, E. S. (2018). Ecoepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in  
367 an endemic area in the Steel Valley in Brazil: An ecological approach with spatial  
368 analysis. *PLoS ONE*, 13(10), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206452>
- 369 Lins, R., Souza, N. A., & Peixoto, A. A. (2008). *Genetic divergence between two*  
370 *sympatric species of the Lutzomyia longipalpis complex in the paralytic gene, a*  
371 *locus associated with insecticide resistance and lovesong production*.  
372 103(November), 736–740.
- 373 Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of  
374 zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341–344.  
375 <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>
- 376 Margonari, C., Freitas, C. R., Ribeiro, R. C., Moura, A. C. M., Timbó, M., Gripp, A. H.,  
377 ... Dias, E. S. (2006). Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial  
378 analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Memorias*

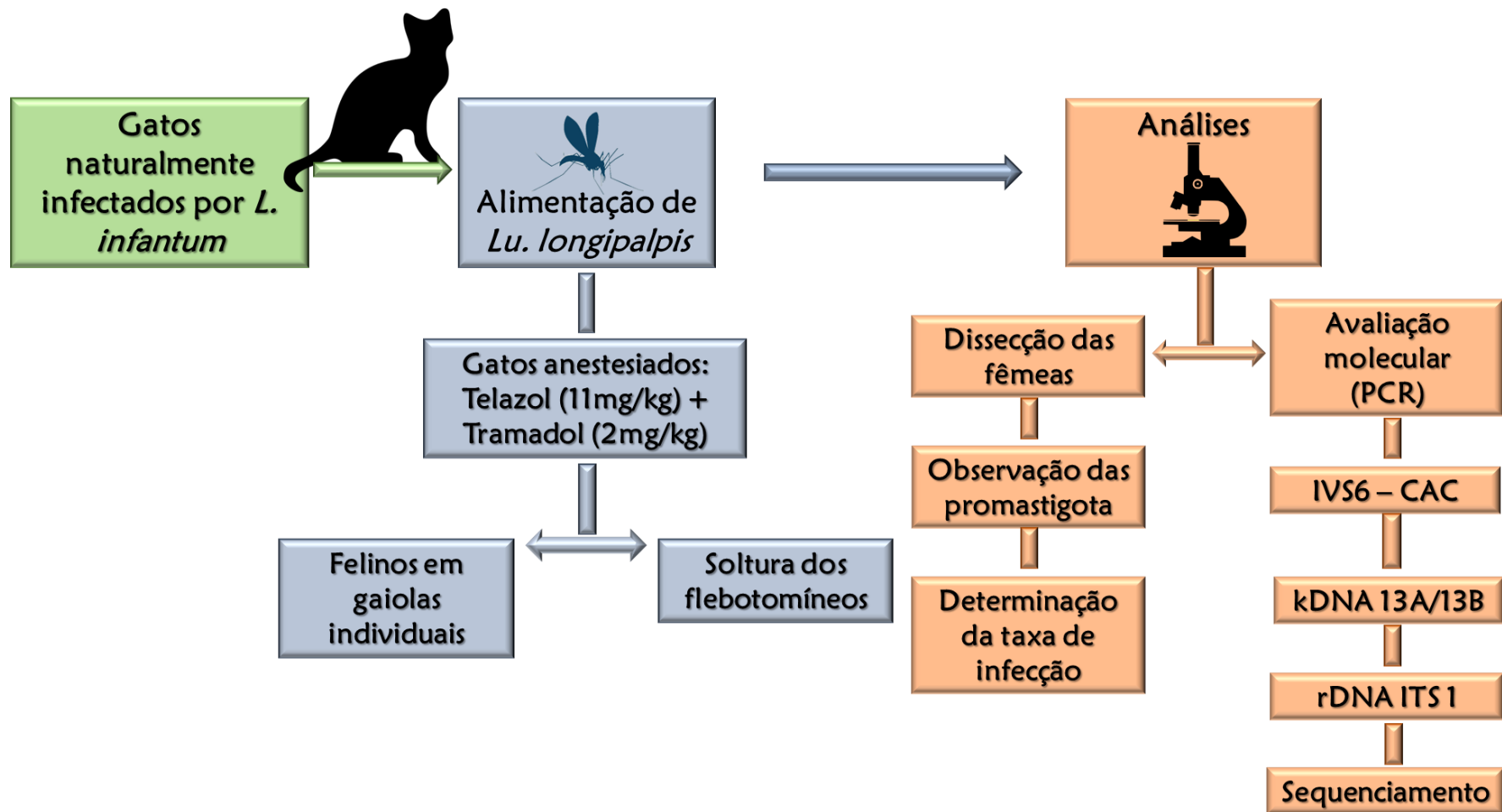
- 379 *Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1), 31–38. <https://doi.org/10.1590/S0074->  
380 02762006000100007
- 381 Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., & Gramiccia, M.  
382 (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*.  
383 *Veterinary Parasitology*, 145(3–4), 357–360.  
384 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.009>
- 385 Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., & Morillas-  
386 Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological  
387 study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145(3–4), 267–273.  
388 <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.11.005>
- 389 Miró, G., & López-vélez, R. (2018). Clinical management of canine leishmaniosis versus  
390 human leishmaniasis due to *Leishmania infantum* : Putting “ One Health ” principles  
391 into practice. *Veterinary Parasitology*, 254(March), 151–159.  
392 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>
- 393 Nasereddin, A., Salant, H., & Abdeen, Z. (2008). Feline leishmaniasis in Jerusalem:  
394 Serological investigation. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 364–369.  
395 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.022>
- 396 Oliveira, A. M., Vieira, C. P., Dibo, M. R., Guirado, M. M., Rodas, L. A. C., &  
397 Chiaravalloti-Neto, F. (2016). Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of  
398 canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. *Acta Tropica*,  
399 164, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.014>
- 400 Oliveira, T. M. F. de S., Pereira, V. F., Benvenga, G. U., Martin, M. F. A., Benassi, J. C.,  
401 Silva, D. T. da, & Starke-Buzetti, W. A. (2015). Conjunctival swab PCR to detect  
402 *Leishmania* spp. in cats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(2),  
403 220–222. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015016>
- 404 Pennisi, M. G., Lloret, A., Möstl, K., Horzinek, M. C., Belák, S., Hartmann, K., ... Addie,  
405 D. (2013). Leishmaniosis in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7),  
406 638–642. <https://doi.org/10.1177/1098612x13489229>
- 407 Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?  
408 *Veterinary Parasitology*, 251(December 2017), 131–137.  
409 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>
- 410 Pimenta, P. F. P., de Freitas, V. C., & Secundino, N. F. C. (2012). A Interação do  
411 Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In I. N. de C. e T. em E.  
412 Molecular (Ed.), *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular* (1st ed., pp. 1–45).  
413 Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ-MG.
- 414 Pita-pereira, D. De, Roberto, C., Barbosa, M., & Figueiredo, D. (2005). *Identification of*  
415 *naturally infected Lutzomyia intermedia and Lutzomyia migonei with Leishmania (*  
416 *Viannia ) braziliensis in Rio de Janeiro ( Brazil ) revealed by a PCR multiplex non-*  
417 *isotopic hybridisation assay , a Carvalho Britto.* 905–913.  
418 <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>
- 419 Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of  
420 zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915–1934.  
421 <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>

- 422 Ready, P. D. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents.  
423 *Annual Review of Entomology*, 58, 227–250. [https://doi.org/10.1146/annurev-ento-](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557)  
424 120811-153557
- 425 Ribeiro, R. R., Moura, E. P., Pimentel, V. M., Sampaio, W. M., Silva, S. M., Schettini,  
426 D. A., ... Michalick, M. S. M. (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity  
427 to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*  
428 following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate.  
429 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2564–2572.  
430 <https://doi.org/10.1128/AAC.00223-08>
- 431 Rocha, A. V. V. O., Moreno, B. F. S., Cabral, A. D., Louzeiro, N. M., Miranda, L. M.,  
432 Santos, V. M. B. dos, ... Costa, A. P. da. (2019). Diagnosis and epidemiology of  
433 *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region,  
434 Brazil. *Veterinary Parasitology*, 273(August), 80–85.  
435 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.007>
- 436 Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA  
437 as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*,  
438 71(3), 267–275. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)
- 439 Sales, K. G. D. S., Costa, P. L., De Morais, R. C. S., Otranto, D., Brandão-Filho, S. P.,  
440 Cavalcanti, M. D. P., & Dantas-Torres, F. (2015). Identification of phlebotomine  
441 sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasites and Vectors*, 8(1), 4–9.  
442 <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3>
- 443 Savani, E. S. M. M., De Oliveira Camargo, M. C. G., De Carvalho, M. R., Zampieri, R.  
444 A., Dos Santos, M. G., D’Áuria, S. R. N., ... Floeter-Winter, L. M. (2004). The first  
445 record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania)*  
446 *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State,  
447 Brazil. *Veterinary Parasitology*, 120(3), 229–233.  
448 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.008>
- 449 Sergent, E., Lombard, J., & Quilichini, M. (1912). Infection simultanée d’un enfant, d’un  
450 chien et d’un chat dans la même habitation. *Bull Soc Pathol Exot*, 5, 93–98.
- 451 Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ...  
452 Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine  
453 leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4, 1–16. Retrieved from  
454 <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>
- 455 Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., & Osorio, Y. (2001). Canine visceral  
456 leishmaniasis in colombia: Relationship between clinical and parasitologic status  
457 and infectivity for sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,  
458 64(3–4), 119–124.
- 459 Vides, J. P., Schwardt, T. F., Sobrinho, L. S., Marinho, M., Laurenti, M. D., Biondo, A.  
460 W., ... Marcondes, M. (2011). *Leishmania chagasi* infection in cats with  
461 dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil.  
462 *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), 22–28.  
463 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.042>
- 464 Werneck, G. L. (2014). Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related  
465 to reservoir control. *Revista de Saude Publica*, 48(5), 851–856.



466 <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005615>

467



468

469

470

471

**Figura 1:** Fluxograma dos xenodiagnósticos. Todos os experimentos foram conduzidos com a mesma metodologia e manutenção das fêmeas. **PCR** – Reação em Cadeia pela Polimerase; **IVS6 – CAC** – domínio IVS6 para o gene *cacophony* de insetos; **kDNA – 13A/13B** – gene 13A/13B do DNA do kinetoplasto de *Leishmania* spp.; **rDNA – ITS1** – *Internal Transcribed Spacer 1* do DNA ribossomal de Trypanosomatídeos.

472 **Tabela 2:** Avaliações clínica e diagnóstica dos gatos selecionados para participar do xenodiagnóstico.

Animal	Sinais clínicos	Hemograma e Perfil Bioquímico	Cultura	Parasitológico	Sorologia		Molecular		Sequenciamento
					ELISA/N <sub>E</sub>	IFAT/ Tit.	Primer 13A/13B	Primer ITS1	
1	Magreza, linfonodo poplíteo aumentado, alopecia, descamação de pele, micro lesões na ponta da orelha	↑ leucócitos e de eosinófilos; ↑ Ureia, AST, FA e globulinas; ↑ PT	+	+	+ / 6	+ / 1:40	+	+	<i>L. infantum</i>
2	Magreza, lesões de pele por todo o corpo e alopecia	↑ leucócitos e de eosinófilos; ↑ globulina; ↑ PT	N	-	+ / 6	+ / 1:40	+	+	<i>L. infantum</i>
3	Magreza, lesões nas orelhas e no focinho	↑ leucócitos e de eosinófilos; ↑ FA; ↑ PT.	N	-	+ / 5	+ / 1:40	+	+	<i>L. infantum</i>
4	Magreza	↑ leucócitos e CHCM, ↓ VCM e plaquetas; ↓ GGT e albumina, ↑ PT e globulina; ↑ Linfócitos	+	+	+ / 9	+ / 1:320	+	+	<i>L. infantum</i>

473 **Notas:**  
474 **NE** – Nível ELISA; **Tit** – Titulação – ponto de corte: 1:40; + - Positivo; **N** – Negativo; **PT** – Proteína Total; **AST** – Aspartato aminotransferase; **FA** – Fosfatase alcalina; **GGT**  
475 – Glutamil Transferase; **VCM** – Volume Corpuscular Médio; **CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; **13A/13B** – kDNA de *Leishmania* spp.; **ITS1** -  
476 rDNA – SSU-rDNA Trypanosomatídeos Internal Transcribed Spacer 1  
477 ↑ - Níveis acima dos valores de referência; ↓ - Níveis abaixo dos valores de referência, propostos por Jericó et al. (2014).



478

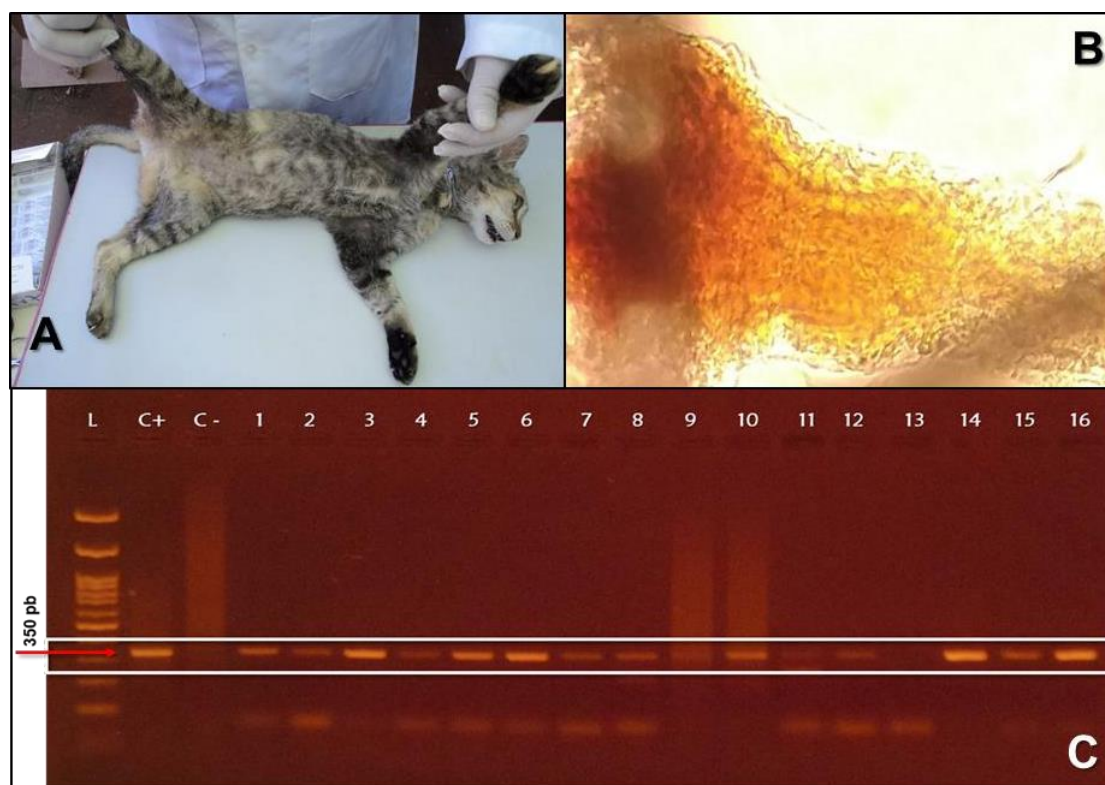
479

480

481

482

**Figura 2:** Experimento de xenodiagnóstico. A – Cabanas individuais dispostas acima da bancada. B – Gatos dentro das cabanas individuais. C – Fêmea flebotomínea realizando o repasto sanguíneo em um gato naturalmente infectado por *L. infantum*.



483

484

485

486

487

488

489

**Figura 3:** Gato 4; A – Gato 4, positivo em todos os exames diagnósticos, com importantes alterações hematológicas e bioquímicas e apresentando magreza. B – Alta parasitemia por formas promastigotas de *Leishmania* spp. em intestino de fêmea flebotomíneo alimentada em gato naturalmente infectado por *L. infantum*. C – Eletroforese de gel de agarose, resultante da amplificação do DNA ribossomal gene ITS1. L – Ladder; C+ - Controle positivo; C- - Controle negativo; 1 a 16 – Fêmeas de flebotomíneos alimentadas em gatos naturalmente infectados por *L. infantum*.

490 **Tabela 3:** Descrição dos resultados dos xenodiagnósticos A e B.

FELINO	XENODIAGNÓSTICO A						XENODIAGNÓSTICO B											
	N	Eng <sup>†</sup>	Dissec <sup>‡</sup>	Sangue <sup>§</sup>	Paras <sup>¶</sup>	PCR	N	Eng.	Dissec	Sangue	Paras	PCR	N	Eng.	Dissec	Sangue	Paras	PCR
<b>1</b>	38	38	15 39,5%	23 60,5%	0	0	25	25	25 100,0%	9 36,0%	0	0	63	63	40 63,5%	32 50,8%	0	0
<b>2</b>	28	28	21 75,0%	7 25,0%	0	0	23	23	19 82,6%	10 43,5%	0	0	51	51	40 78,4%	17 33,3%	0	0
<b>3</b>	31	31	28 90,3%	3 9,7%	0	1 3,2%	19	19	18 94,7%	9 47,4%	0	0	50	50	46 92,0%	12 24,0%	0	1 2,0%
<b>4</b>	-	-	-	-	-	-	39	39	28 71,8%	30 76,9%	10 25,6%	16 41,03%	39	39	28 71,8%	30 76,9%	10 25,6%	16 41,03%
<b>T</b>	<b>97</b>	<b>97</b>	<b>64</b> <b>66,0%</b>	<b>33</b> <b>95,2%</b>	<b>0</b>	<b>1</b> <b>1,0%</b>	<b>106</b>	<b>106</b>	<b>90</b> <b>84,9%</b>	<b>58</b> <b>54,7%</b>	<b>10</b> <b>9,4%</b>	<b>16</b> <b>15,09%</b>	<b>203</b>	<b>203</b>	<b>154</b> <b>75,9%</b>	<b>91</b> <b>44,8%</b>	<b>10</b> <b>4,9%</b>	<b>17</b> <b>8,4%</b>

491 N – Número de fêmeas flebotomíneos;

492 † Fêmeas ingurgitadas; ‡ Quantidade de fêmeas dissecadas e porcentagem (%); § Presença de sangue; ¶ Resultado do parasitológico; PCR - Teste molecular para o gene kDNA  
493 13A/13B.

494

495 **Tabela 4:** Comparação entre os estudos xenodiagnósticos disponíveis e o presente estudo, realizados em gatos naturalmente infectados por *L. infantum*.

Estudo	N	Competência	Taxa de infecção	Citologia de medula	Titulação	Cultura	Sinais Clínicos	Alterações hematológicas
Maroli et al (2007)	1	1	20 a 21%	+	1:160	+	Estomatite, periodontite, linfadenopatia, hipertrofia dos linfonodos	NA
Silva et al (2010)	1	1	13,1%	+	1:160	+	Hipertrofia do linfonodo poplíteo, dermatite furfurácea, onicogribose, caquexia, atrofia muscular, fadiga, anorexia, fraqueza e ferida na orelha direita.	↑ Ureia sérica e AST
Mendonça et al (2020)	12	8	NA	+	NA	+	Mais de 3 (NE)	NA
Vioti et al (2020)	4	1	25,6%	+	1:320	+	Magreza	↑ leucócitos e CHCM, ↓ VCM e plaquetas; ↓ GGT e albumina, ↑ PT e globulina; ↑ Linfócitos

496 **Notas:**

497 N – Número de gatos estudados em cada xenodiagnóstico; **Competência** – número de gatos que foram infecciosos ao vetor; **NA** – Não apresenta; **NE** – não especificado; + -  
498 Positivo; **Titulação** – pela RIFI, com ponto de corte: 1:40; + - Positivo; **PT** – Proteína Total; **AST** – Aspartato aminotransferase; **GGT** – Glutamil Transferase; **VCM** – Volume  
499 Corpuscular Médio; **CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

500 Fonte: Maroli et al., (2007); Silva et al. (2010); Mendonça et al. (2020).

501