UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ROSANA KARLA AIRES DE MACÊDO

ESTUDO SOROLÓGICO EXPLORATÓRIO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NA CIDADE DE NATAL RN.

NATAL–RN
2024

ROSANA KARLA AIRES DE MACÊDO

ESTUDO SOROLÓGICO EXPLORATÓRIO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NA CIDADE DE NATAL RN.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sousa Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Gabriela Santos Gomes

NATAL–RN

2024

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Macedo, Rosana Karla Aires de.
Estudo sorológico exploratório da presença de anticorpos anti-Leishmania spp. em gatos domésticos (Felis catus) na cidade de Natal RN / Rosana Karla Aires de Macedo. - 2024.
118f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Marcelo Sousa Silva.

1. Leishmaniose - Dissertação. 2. Leishmaniose felina - Dissertação. 3. Imunodiagnóstico - Dissertação. 4. Zoonose - Dissertação. I. Silva, Marcelo Sousa. II. Título.

RN/UF/BS-CCS CDU 616.993.161

Elaborado por ANA CRISTINA DA SILVA LOPES - CRB-15/263

ESTUDO SOROLÓGICO EXPLORATÓRIO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NA CIDADE DE NATAL RN.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 19/12/2023

BANCA EXAMINADORA

_____

Presidente: Prof. Dr. Marcelo Sousa Silva

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) – UFRN

_____

Coorientadora: Prof(a). Dra. Gabriela Santos-Gomes

IHMT-UNL- Universidade Nova de Lisboa, Portugal

_____

Examinador interno: Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes

Departamento de Morfologia (DMOR) – UFRN

_____

Examinador externo: Profa. Dra. Silvia Tavares Donato

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

Ao meu pai (in memoriam),

À minha mãe,

À minha irmã e meus irmãos,

Aos meus amigos,

Às vítimas da leishmaniose, especialmente aos animais,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus.

Agradeço à toda a minha família, especialmente à minha mãe Rosana Lúcia, minha irmã Sarah e meu irmão Pascoal e Luiz. Vocês são fonte eterna de amor, apoio, inspiração e fortaleza para mim.

Agradeço também à minha madrinha Nizia Aires e à minha avó, Maria Rocha. Nada disso teria sentido se vocês não estivessem na minha vida.

À minha amiga, Fabíola Gouveia, agradeço o seu apoio e incentivo em todos os momentos. Também agradeço de coração aos meus amigos de longa jornada: Ana Luiza, Raquel, André, Lázaro, Ana Irene, Myrella e Lara. Às minhas amigas do trabalho: Eloheka, Luciana, Zélia, Raissa, Jaqueline e Flávia. E a minha psicóloga Dra. Glaúcia. Sem vocês, essa jornada não teria leveza, apoio e amor.

Agradeço a todos do laboratório de Imunoparasitologia da UFRN, em especial ao meu orientador Dr. Marcelo Silva, que abriu as portas para que tudo isso fosse possível e contribuiu de maneira ímpar para a minha vida acadêmica.

Agradeço especialmente a Bárbara, Dyonatan, Johny, José, Annamairla e Aline. Sem vocês, nada disso seria possível.

Obrigada à secretaria do PPGCF-UFRN, em especial a Fábia.

Meus sinceros agradecimentos a todos do UVZ-Natal, em especial aos veterinários Joussie e Ciro, ao diretor Jan Pierre, pela oportunidade de usar os animais do UVZ Natal.

Ao professor Danilo Ayres, pela oportunidade de trabalhar junto ao projeto de extensão da UFRN "Animais e Comunidade" e pela contribuição para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço a todos os estudantes envolvidos no projeto "Animais e Comunidade" da UFRN, em especial Lara e Rita, pelas contribuições nas coletas. Minha gratidão também à colega microbiologista do HUOL Gabriela Gomes pelos ensinamentos e contribuição nesse trabalho. Obrigada também a Anne e Felipe, colegas veterinários que me ajudaram nessa jornada.

Agradeço a Amora Bryan e a Julimar, por permitirem que os felinos dos abrigos fossem examinados. E a todas as outras pessoas que não mencionei, mas que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Minha gratidão não é dirigida apenas às pessoas, mas sim aos seres adoráveis que trouxeram alegria e companhia em minha jornada. Aos gatos, expresso meu sincero agradecimento.

“Apressa-te a viver bem e pensa que
cada dia é, por si só, uma vida”.
(Sêneca)

RESUMO

Em felinos domésticos, o número de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania* torna-se cada vez mais significativo, embora ainda não esteja claro o papel dos gatos nesse ciclo. As leishmanioses são enfermidades causadas pelo protozoário *Leishmania* spp. que acomete os homens, animais selvagens e domésticos, sendo considerada uma zoonose. Possui como hospedeiro e reservatório os cães domésticos e selvagens, contudo há casos relatados em outras espécies, dentre elas os gatos domésticos (*Felis catus*). O parasita é transmitido vetorialmente através do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos, prevalecendo no Brasil, a *Lutzomya longipalpis*. Nos gatos, estudos já relataram que esses animais são acometidos por leishmaniose visceral, podendo se infectar e desenvolver essa doença manifestando sinais clínicos variáveis. Dessa forma, a maioria dos estudos são limitados a cães e poucos são focados na investigação de *Leishmania* sp. em outros mamíferos. O objetivo desta pesquisa consistiu em identificar a soroprevalência de anticorpos igG por meio do teste ELISA indireto e estabelecer um protocolo padronizado de teste ELISA *in house* utilizando antígenos de *Leishmania infantum* nas amostras sorológicas de felinos domésticos provenientes de abrigos localizados em Natal e Parnamirim e do programa de mutirão de esterilização conduzido pela UVZ (Unidade de Vigilância e Zoonoses) na cidade de Natal, localizado no estado do Rio Grande do Norte. Ao todo foram avaliados 130 felinos domésticos, os quais passaram por exame clínico e coletadas amostras de sangue através da veia jugular ou cefálica. Os resultados do teste ELISA *in house* indicaram que 28 felinos domésticos (21,54%) apresentaram maior reatividade sorológica, 9 felinos domésticos (6,92%) demonstraram menor reatividade sorológica e 93 felinos domésticos (71,53%) apresentaram reatividade sorológica intermediária, que denominamos de inconslusivos para IgG anti-*Leishmania infantum*. Torna-se necessário mais estudos voltados para o aprimoramento e padronização de testes ELISA para o diagnóstico de leishmaniose felina. Esse estudo pôde demonstrar a participação e a exposição dos felinos de Natal-RN a esta zoonose e sua possível participação na cadeia epidemiológica de transmissão da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose felina; *Felis catus*; Zoonose; Sorologia; ELISA.

ABSTRACT

In domestic felines, the number of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* is becoming increasingly significant, although the role of cats in this cycle is still unclear. *Leishmania*ses are illnesses caused by the protozoan *Leishmania* spp., affecting humans, wild animals, and domestic animals, and are considered a zoonosis. The domestic and wild dogs serve as hosts and reservoirs, but there are reported cases in other species, including domestic cats (*Felis catus*). The parasite is vector-borne and transmitted through the blood meal of female sandflies, with *Lutzomya longipalpis* prevailing in Brazil. Studies in cats have reported that these animals can be affected by visceral *Leishmania*sis (VL), potentially becoming infected and developing the disease with variable clinical signs. Thus, most studies are limited to dogs, and few focus on investigating *Leishmania sp.* in other mammals. This research aimed to identify the seroprevalence of antibodies against *Leishmania* spp. through indirect ELISA testing and to establish a standardized in-house ELISA protocol using *Leishmania infantum* antigens in serological samples from domestic felines from shelters in Natal and Parnamirim city, and from the sterilization outreach program conducted by the UVZ (Zoonosis Surveillance Unit) in Natal city, located in the state of Rio Grande do Norte. A total of 130 domestic felines were evaluated and underwent a clinical examination. Blood samples were collected via the jugular or cephalic vein. The results of the in-house ELISA test indicated that 28 domestic felines (21.54%) showed higher serological reactivity, 9 domestic felines (6.92%) demonstrated lower serological reactivity, and 93 domestic felines (71.53%) exhibited intermediate serological reactivity, referred to as inconclusive for anti-*Leishmania* infantum IgG. Due to the increasing reported cases of *Leishmania*sis in animals in Brazil and considering the endemic nature of the Northeast region, further studies are necessary for the improvement and standardization of ELISA tests for feline *Leishmania*sis diagnosis. This study demonstrates the participation and exposure of felines in Natal, RN, to this zoonosis and their potential involvement in the epidemiological chain of visceral *Leishmania*sis transmission.

Keywords: Feline *Leishmania*sis; *Felis catus*; Zoonosis; Serology; ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vetor *Lutzomyia longipalpis* durante repasto sanguíneo.....26
Figura 2 - Mapa da taxa de incidência de Leishmaniose Visceral Humana em Natal-RN. 31
Figura 3 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* sp. durante o repasto sanguíneo 38
Figura 4 - Sintomas clínicos de Leishmaniose felina.....44
Figura 5 - Fluxograma da obtenção de amostras de sangue dos felinos domésticos na área de Natal e região Metropolitana (Parnamirim).....64
Figura 6 - Abrigo de animais em Pium (distrito litoral), Parnamirim-RN. 68
Figura 7 - Animal P80 sorologicamente reativo para anticorpos IgG anti *L. infantum* no Elisa *in house*. 70
Figura 8 - Animal P30 sorologicamente inconclusivo para anticorpos anti-*L. infantum* no ELISA *in house*.....76
Figura 9 - Visualização de uma amostra de imprint nasal do felino P30 em microscópio óptico com objetiva de 100x, na qual foi identificada estruturas com características leveduriformes coradas em azul de algodão. 76
Figura 10 - Distribuição por região dos gatos que apresentaram anticorpos IgG reativos anti-*Leishmania infantum* no ELISA *in house* 77
Figura 11 - Gráfico da distribuição da reatividade sorológica para anticorpos IgG total anti-*Leishmania* spp. da população amostral de soros dos 130 animais analisados no estudo.....80
Figura 12 - Gráfico da distribuição da densidade óptica relativa para anticorpos IgG total anti-*Leishmania* spp. da população amostral de soros de 130 gatos analisados no estudo.....81
Figura 13 - Gráfico da distribuição da reatividade sorológica para anticorpos IgG total anti-*Leishmania* spp. em três diferentes populações de reatividade 82
Figura 14 - Distribuição dos gatos com maior reatividade sorológica de anticorpos IgG anti-*L. infantum* no ensaio ELISA *in house*, com base no quadro clínico. Os gatos estão divididos em duas categorias: assintomáticos e sintomáticos com a descrição dos achados clínicos 84
Figura 15 - Gráfico da Proporção de gatos sorologicamente menos reativos e mais reativos frente a IgG anti-*L. infantum* de acordo com o sexo 85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Manifestações clínicas dos gatos domésticos potencialmente sorologiamente reativos (n = 48) no ELISA *in house* para anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. 71
Quadro 2 - Manifestações clínicas dos gatos domésticos potencialmente sorologicamente não reativos (n = 11) no ELISA *in house* para anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. 73
Quadro 3 - Manifestações clínicas dos gatos domésticos sorologicamente inconclusivos (n = 72) no ELISA in house para anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp..74
Quadro 4 – Estudos sobre diagnóstico de leishmaniose felina no brasil (1940-2022). 108
Quadro 5 – Distribuição por regiões dos gatos sorologicamente reativos frente a *L. infantum* por ELISA *in house*.....116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do ELISA *in house* nas diluições 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. 111
Tabela 2 – Inclusão de amostras (na cor amarela) após estabelecimento do novo ponto de corte oriundo das DOs relativas. 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IQR	Intervalo interquartil
Q3	Terceiro quartil
ITS-1	Espaçador transcrito interno 1
LC	Leishmaniose cutânea
LCA	Leishmaniose cutânea americana
LCan	Leishmaniose canina
LF	Leishmaniose felina
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
UTD	Unidades de Tipagem Discretas
UVZ	Unidade de Vigilância em Zoonoses
WB	Western Blott

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DE LITERATURA 22
2.1 Leishmaniose felina – um breve histórico 22
2.2 O agente etiológico da leishmaniose 23
2.3 Epidemiologia da leishmaniose felina (LF) 28
2.4 Prevalência da leishmaniose felina 32
2.5 Mecanismos de transmissão da leishmaniose 36
2.6 Sinais clínicos da leishmaniose felina 40
2.7 Diagnóstico 44
2.7.1 Diagnóstico indireto 49
2.7.1.1 Métodos Sorológicos 49
2.7.2 Métodos Moleculares 53
2.7.3 Xenodiagnóstico 54
2.8 Aspectos imunológicos da leishmaniose felina 55
2.9 Tratamento e controle da leishmaniose felina 59
3 OBJETIVOS 62
3. 1 Objetivo geral 62
3.2 Objetivos específicos 62
4 MATERIAL E MÉTODOS 63
3.1 Área de estudo e aspectos éticos 63
3.2 A obtenção dos soros dos gatos envolvidos no estudo 63
3.3 Determinação de anticorpos IgG total anti *Leishmania* em amostras de soros de gatos domésticos 64
3.3.1 Cultivo dos parasitas e obtenção do extrato protéico total de *Leishmania* infantum 64
3.3.2 Otimização do ensaio imunoenzimático (ELISA) para a determinação de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* em gatos domésticos 65
3.4 Análise estatística 66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
4.1 Obtenção das amostras biológicas e população amostral 67
4.2 Determinação do quadro clínico da população felina estudada 68
5.3 Presença de anticorpos IgG total anti-*Leishmania spp.* 78

5.4 Relações entre dados sorológicos e clinicos da população estudada 83
6 CONCLUSÃO 89
REFERÊNCIAS.....90
APÊNDICE A 106
APÊNDICE B 107
APÊNDICE C 108
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....118

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade complexa, transmitida por vetores que após a malária e a filariose linfática, representa a terceira doença tropical negligenciada mais relevante para a saúde pública. A *Leishmania* é um parasita intracelular, causador da leishmaniose que abrange um conjunto de doenças envolvendo uma diversidade de parasitas, vetores de flebotomíneos e hospedeiros vertebrados em regiões endêmicas, que se não tratada, pode provocar óbitos no homem e em animais (Mendonça *et al.*, 2020).

Esta doença é endêmica em 88 nações situadas no sul da Europa, África, Ásia, América do Sul e América Central. Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença. Adicionalmente, os cães são reconhecidos como o principal reservatório da *Leishmania* (Solano-Gallego *et al*., 2009; Alcover *et al*., 2021). Existem três formas principais de manifestações clínica da doença em humanos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (Nascimento *et al*., 2021). No Brasil, a LC e LV são enfermidades endêmicas. Nesse país, a LC é ocasionada por diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto a LV está principalmente relacionada à infecção por *Leishmania infantum* (Brasil, 2021). Entre as zoonoses transmitidas por vetores, a LV causada por *Leishmania infantum* é uma das principais patologias dentre as doenças tropicais negligenciadas (Latta *et al*., 2019).

A LV apresenta uma incidência estimada de 300.000 novos casos e 20.000 mortes anualmente, e mais de um bilhão de pessoas que vivem em áreas endêmicas estão sob o risco de infecção (World Health Organization, 2017). Mais de 90% das incidências anuais de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Sudão, Índia, Nepal, Etiópia, Brasil e Sudão do Sul. A África Oriental é o segundo maior centro de LV depois do continente indiano e adiciona anualmente 30.000 a 40.000 novos casos (Bruno *et al*., 2022). Essa zoonose ocorre em 98 países, afetando cerca de 1,2 milhões de pessoas na forma de LC e 400.000 na forma LV, levando a aproximadamente 40.000 mortes por ano (Asfaram *et al*., 2019). Essa afecção é considerada uma das sete endemias de prioridade absoluta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e representa uma antropozoonose de grande relevância na saúde coletiva, devido ao seu alto dinamismo epidemiológico relacionado a condições de transmissão em

constante mudança, dependendo do ambiente, demografia, comportamento humano, status socioeconômico e sistema imunológico humano (Torres-Guerrero *et al*., 2017; Bruno *et al*., 2022).

No âmbito da medicina veterinária, a leishmaniose canina (aqui denominada de LCan) causada *pela Leishmania infantum,* assume uma importância fundamental. Isso ocorre, porque os cães desempenham o papel principal de reservatório do parasita em relação aos seres humanos (Baneth *et al*., 2008; Miró *et al*., 2017). Atualmente, as técnicas sorológicas e moleculares demonstraram que as taxas de prevalência da LCan no mediterrâneo Europeu são muito mais altas, provavelmente devido à alta porcentagem de infecções assintomáticas (mais de 50%). No entanto, outros mamíferos infectados com *L. infantum* já foram relatados, sendo que a ampla dispersão da LV indica novos reservatórios da doença e o provável envolvimento de animais domésticos, como gatos, no ciclo biológico da *Leishmania* (Bourdeau *et al*. 2020; Bruno *et al*., 2022). Assim, atualmente compreendemos que *L. infantum* possui múltiplos hospedeiros mamíferos, e em certos contextos ecológicos específicos, hospedeiros não caninos podem desempenhar um papel epidemiológico significativo (Silva *et al*. 2018; Courtenay *et al*. 2019).

A LV é transmitida aos humanos e animais através da picada de fêmeas flebotomíneos pertencentes à ordem Diptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*. Várias espécies de *Leishmania* podem infectar gatos (*Leishmania infantum*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*) contudo, a *L. Infantum* é a espécie mais frequentemente relatada tanto em cães quanto em gatos em países da região do Mediterrâneo, América Central e do Sul, notadamente Brasil e Irã (Pennisi; Persichetti, 2018; Madruga *et al*., 2018). Nesse contexto, há também vários relatos de infecção por *L. infantum* em gatos ao redor do mundo, inclusive no Brasil (Metzdorf *et al*., 2017).

Com base nos estudos de xenodiagnóstico, que revelaram a capacidade de gatos serem infecciosos para vetores competentes de LV (Maroli *et al*., 2007; Silva *et al*., 2010), esses animais têm sido apontados como reservatório secundário para o parasita em áreas endêmicas de LV (Pennisi; Persichetti, 2018; Asfaram *et al*., 2019; Nascimento *et al*., 2022). Contudo, os gatos desempenham um papel importante na abordagem de saúde única para leishmaniose devido ao seu status social como

animais de companhia (Pennisi *et al.*, 2015). Portanto, a relevância da infecção por *Leishmania* spp. em gatos tem recebido cada vez mais destaque, especialmente considerando o crescente número de gatos ocupando espaços que antes eram dominados por cães nas residências ao longo das últimas décadas (Silvia *et al*., 2023).

No velho mundo, a leishmaniose em gatos domésticos (*Felis catus*) foi relatado especialmente em países do mediterrâneo (Miró *et al*., 2014; Asfaram *et al*., 2019; Latta *et al*., 2019; Urbani *et al*., 2020) e recentemente demonstrou ser uma doença preocupante em gatos errantes no Irã (Asgari *et al*., 2020). Quanto ao continente americano, os registros dessa enfermidade vêm crescendo no Centro e América do Sul, especialmente no Brasil (Soares *et al*., 2015; Asfaram *et al*., 2019).

As infecções em felinos causadas por espécies de *Leishmania* dermotrópicas abrangem no Velho Mundo, onde se destacam *L. tropica* na Turquia e no Irã, bem como *L. major* na Turquia (Paşa *et al*., 2015; Can *et al*., 2016; Akhtardanesh *et al*., 2020). Já no Novo Mundo, essas infecções são ocasionadas por *Leishmania mexicana* no Texas (EUA) e Venezuela, conforme relatado em estudos anteriores (Trainor *et al*., 2010; Rivas *et al*., 2018; Mondolfi *et al*., 2019). Além disso, *L. braziliensis* é responsável por casos no Brasil e na Guiana Francesa (Schubach *et al*., 2004; Rougeron *et al*., 2018; Mondolfi *et al*., 2019), *L. amazonensis* é encontrada no Brasil (Souza *et al*., 2005; Carneiro *et al*., 2020), e *L. venezuelensis* está presente na Venezuela (Bonfante-Garrido *et al*., 1992).

A LF há muito tempo foi desconsiderada por médicos veterinários e parasitologistas, assim a distribuição atual dessa doença pode estar subestimada. Outro ponto a se considerar é o de que a apresentação subclínica de LF faz do diagnóstico uma tarefa bastante complexa. Há também as infecções concomitantes com agentes virais, como vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), coronavírus felino (FCoV) e o protozoário *Toxoplasma gondii*, os quais já foram determinados junto com a LF (Latta *et al*., 2019). Embora, o número de gatos com leishmaniose seja atualmente considerado insignificante em áreas endêmicas, uma alta porcentagem de gatos é positiva para a doença por meio da sorologia, reação em cadeia da polimerase (PCR) ou ambos (Garcia-Torres *et al*., 2011).

A maioria dos gatos infectados com LF permanece sem sintomas clínicos e pode manter esse estado por um longo período, até mesmo anos. Quando ocorre o desenvolvimento de sinais clínicos, estima-se que aproximadamente 50% desses

casos estejam relacionados a um sistema imunológico comprometido devido a condições imunossupressoras coexistentes, tais como a infecção pelo FIV, FeLV e neoplasias (Pennisi; Persichetti, 2018). Nos gatos que apresentam sinais clínicos de LF, as manifestações mais frequentes são lesões cutâneas e mucocutâneas, sendo a dermatite nodular e/ou ulcerativa as mais comuns, além de perda de peso, anorexia e linfadenopatia periférica. As anormalidades clinicopatológicas mais observadas em gatos infectados incluem anemia não regenerativa, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e proteinúria, conforme mencionado por Pennisi & Persichetti (2018).

As taxas de infecção apresentam variação significativa, possivelmente devido a diferenças na metodologia empregada, na localização geográfica e na população estudada. As taxas de detecção positiva de PCR no sangue variam amplamente, situando-se entre 0,43% e 61% na população de gatos testados. Enquanto a prevalência de anticorpos varia de 3% a 59%, sendo raros os estudos que não encontram nenhuma positividade (Pennisi *et al*., 2015). No entanto, geralmente, a percentagem de positividade é menor em comparação com cães nas mesmas regiões (Maia *et al*., 2010; Otranto *et al*., 2017).

O uso de repelentes de flebotomíneos em cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) com o intuito de prevenir a Lcan tem acarretado o direcionamento do parasita para procurar outros mamíferos hospedeiros. Considerando que existem indícios de aumento da virulência do parasita ao infectar um hospedeiro secundário, é de suma importância para a saúde global, tanto animal quanto humana, controlar e erradicar a infecção por *Leishmania* spp. em todas as espécies de mamíferos. Dentre esses novos hospedeiros-alvo, destacam-se os gatos domésticos (*Felis catus*), nos quais tem sido observado, nos últimos anos, um incremento na ocorrência de LF causada por *L. infantum*, especialmente em áreas onde a doença é endêmica (Ahuir-Baraja *et al*., 2021).

Atualmente, estima-se que no Brasil cerca de 22,1 milhões felinos domésticos compartilham ambiente conjunto com os humanos e este contato próximo pode facilitar o compartilhamento de patógenos (incluindo *Leishmania* spp.) entre esses hospedeiros (Berenguer *et al*., 2020). A epidemiologia e a prevalência da infecção em gatos são ainda pouco conhecidas, e os resultados obtidos variam significativamente, dependendo da técnica empregada para o diagnóstico ou da região geográfica em

questão (Ahuir-Baraja *et al*., 2021). Apesar da disparidade nos dados coletados até o momento sobre a prevalência da infecção em gatos, o aumento de casos é motivo de preocupação, especialmente considerando que os gatos são o segundo animal de estimação mais comum no mundo. Porém, há escasso conhecimento sobre os sinais clínicos da doença em gatos, e estes não podem ser equiparados aos encontrados em cães, pois as duas espécies apresentam diferenças significativas em suas respostas imunes a patógenos, como os níveis de anticorpos no sangue. Dessa forma, a prática clínica rotineiramente aplicada em cães não é aplicável a gatos infectados (Ahuir-Baraja *et al*., 2021).

As espécies de *Leishmania* identificadas em gatos suscitam preocupações quanto à zoonose, porém, atualmente, não existem informações disponíveis acerca do risco para os tutores de gatos infectados (Bourdeau *et al*., 2020). Dessa forma, torna-se primordial para a saúde pública a averiguação de que os gatos possam estar servindo como reservatórios acidentais da *Leishmania* sp, propagando o parasita ao vetor, por vezes despercebidos, já que os cães são os alvos prioritários da atenção em decorrência das maiores taxas de prevalência na população canina (Mendonça, 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose felina – um breve histórico

No século passado, relatos de casos clínicos de gatos infectados por *Leishmania* spp. eram raros e os felinos até então considerados resistentes a esse parasita (Pennisi *et al*., 2015). No entanto, nas últimas décadas, foi observado um crescimento na população felina, ocupando cada vez mais o espaço anteriormente ocupado pelos cães nas residências. Essa mudança gerou um importante desenvolvimento na ciência da medicina felina e nos métodos diagnósticos, aumentando assim o número de relatos de casos sobre LF (Leonel *et al*., 2020).

Desde 1977, foram relatados 53 casos naturais de LF em todo o mundo. A maioria desses casos, ocorreram em países da bacia do Mediterrâneo, embora também tenham sido notificados no sul dos Estados Unidos, na América Central e do Sul, no Brasil e no Irã. Diferentes estudos identificaram uma ampla variação na prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em gatos em áreas endêmicas, variando de 0% a 68,5% (Fernández-Gallego *et al*., 2020). Atualmente, a LF tem sido relatada principalmente na América do Sul, Mediterrâneo e Países do Oriente Médio (Pennisi *et al*., 2015; Asfaram *et al*., 2019).

O primeiro relato de LF foi descrito em 1912, na Argélia, nessa ocasião identificaram formas amastigotas de *Leishmania* spp. na medula óssea de um gato doméstico sem a identificação da espécie causadora da enfermidade (Sergent *et al*., 1912). Desde a data, essa doença em felinos vem sendo alvo de estudos em diversas regiões do mundo. Em Portugal, o primeiro caso de LF, foi descrito por Costa-Durão *et al*. (1994) e entre os anos de 1977 e 2014 foram publicados 46 casos clínicos, nos quais a leishmaniose foi confirmada em gatos por métodos sorológicos e/ou parasitológicos (Teives, 2015). Por conseguinte, mais de 40 casos clínicos foram relatados na Europa, incluindo Portugal, Itália, França, Espanha, Grécia e, em países como Israel/Palestina, Egito, Suíça, Irã, Guiana Francesa, Venezuela e Brasil, países estes que apresentam áreas endêmicas para *Leishmania* spp. (Pirajá *et al*., 2013).

Nesse contexto, historicamente no Brasil, em 1936, foi relatado um caso de LF em Belo Horizonte, Minas Gerais em um gato que manifestou lesões na região interdigital no membro posterior esquerdo, sem observar as formas amastigotas

(Passos *et al*., 1996). Contudo, o primeiro caso de infecção natural por *Leishmania* sp. em gatos domésticos, no território brasileiro ocorreu no estado do Pará em 1939, o animal apresentou úlceras nas orelhas e no nariz, porém, a espécie do parasito não foi identificada (Batista *et al.*, 2020). Logo depois, por meio da PCR, os autores confirmaram a presença de *Leishmania* do subgênero *viannia*, mas sem identificar a espécie. Contudo, no ano de 2000 surgiu o primeiro caso autóctone de LF relatado no estado de São Paulo, no qual identificaram *L. infantum* (Savani *et al*., 2004).

Posteriormente Silva *et al*. (2010) relataram o primeiro caso de infecção por *L. infantum* transmitida por *L. longipalpis* em um gato naturalmente infectado, nesse estudo, através do xenodiagnóstico foram encontradas formas promastigota no intestino médio do vetor, demonstrando que esses vetores são capazes de ser infectado por *L. infantum* durante a hematofagia em gatos com sintomas clínicos de leishmaniose. No ano de 2020, através de um estudo foi confirmada a capacidade dos felinos de se infectar com *L. longipalpis*. Neste estudo, oito animais infectados com *L. infantum* na medula óssea e pele e com sintomas clínicos foram capazes de infectar o vetor (Batista *et al*. 2020). Diferentes estudos identificaram que a prevalência da infecção por *Leishmania* em gatos em áreas endêmicas varia de 0% a 68,5% (Fernández-Gallego *et al*., 2020).

Dessa forma, nos últimos 40 anos, cerca de 80 estudos transversais sobre a prevalência de LF em todo o mundo mostraram uma soroprevalência média mundial de 12% (Asfaram *et al*. 2019). Concomitantemente, o número de artigos publicados sobre LF tem aumentado em áreas endêmicas, principalmente na Europa, América do Sul e notadamente no Brasil (Nascimento *et al*., 2022).

2.2 O agente etiológico da leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecciosas e parasitárias de caráter zoonótico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, dentre os quais 22 espécies são patogênicas para o homem (Pirajá *et al*., 2013). O agente etiológico da leishmaniose é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatide, composta pelo grupo das *Leishmania*s viscerais e *Leishmania*s tegumentares (Silveira *et al*., 2018).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são dimórficos e contém dois estágios morfológicos principais: amastigota e promastigota. Sendo a forma amastigota encontrada no fagolisossomo de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro mamífero, apresentando forma arredondada ou oval, medindo aproximadamente 2,5-6,8 µm em diâmetro e possuindo cinetoplasto intracelular contendo o ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial. A forma promastigota é a forma extracelular presente no intestino dos vetores flebotomíneos, possui um longo flagelo anterior, é dotada de motilidade e mede cerca de 15-30µm de comprimento (Gramiccia, 2011).

Já foram relatadas aproximadamente 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (L.) distribuídas mundialmente (Silveira *et al*., 2018). No Brasil, ambas as espécies viscerotropicais (leishmaniose visceral americana – LVA) e dermotropical (leishmaniose cutânea americana - LCA) foram relatadas até o momento, com alta prevalência em algumas áreas endêmicas. Em relação à LCA, as seguintes espécies de parasitas são reconhecidamente causadoras de doenças humanas: *L (Viannia) braziliensis*, L (V.) *guyanensis*, L (V.) *lainsoni,* L (V.) *shawi,* L (V.) *naiffi*, L (V.) *lindenbergi* e L (*Leishmania*) *amazonensis* (Silva *et al*., 2010). Enquanto as espécies de LV são *L. donovani, L. infantum e L. chagasi,* contudo estudos recentes caracterizaram essas duas últimas como idênticas, podendo ser usada na nomenclatura como *Leishmania infantum chagasi* (Pereira *et al*., 2008).

No Brasil a prevalência de LF é estimada entre 7 e 8% e diagnosticado por métodos sorológicos e moleculares, sendo as espécies mais comuns a *L. braziliensis, L. infantum* e *L. amazonensis* (Nascimento *et al*., 2021). Em Portugal já foi descrito a presença de *L. infantum* e recentemente de *L. major*. Os gatos são naturalmente infetados pelas mesmas espécies que afetam os cães e os humanos em todo o mundo: *L. infantum* na zona mediterrânica, Irã e Brasil; *L. mexicana* no Texas, EUA; *L. braziliensis* no Brasil e Guiana Francesa; *L. amazonensis* no Brasil e *L. venezuelensis* na Venezuela (Teives, 2015).

A maioria dos trabalhos reporta a infecção de gatos pela espécie *L. infantum*, responsável pela LV (Pennisi; Persichetti, 2018). No entanto, esses animais também podem ser afetados por espécies dermotrópicas que são responsáveis pela leishmaniose tegumentar, sendo relatada a infecção por *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*. e *L. amazonensis*, nas Américas e por *L. tropica* e *L. major* na Turquia. Baneth *et al*. (2022) relataram uma alta taxa de infecção por

Leishmania spp. em cães e gatos em um sítio de infecção humana por *L. tropica* em Israel. Através do PCR foi determinado que na maioria dos cães predominou a *L. infantum* e em quase metade dos gatos a infecção foi por *L. Tropica*, além dos mesmos apresentarem sintomas de infecção sistêmica e dermatites, que ainda não havia sido relatada na infecção felina por *L. tropica*.

As ocorrências de LV no Brasil estão crescendo de acordo com o aumento da dispersão do seu vetor principal, *Lutzomyia longipalpis*. Dessa forma, a dinâmica modificada da doença nos últimos anos, devido às mudanças geográficas e ambientais, resultou no avanço da LV para áreas antes livres da doença, principalmente nas regiões rurais do Brasil (Reis *et al*., 2017).

Esse vetor está bem adaptado a diversas condições climáticas e habitats, com capacidade de alimentar-se de diferentes animais. A sua presença está relacionada à urbanização, que é um fator de risco para LV (Rocha *et al*., 2019). Sendo perceptível no Brasil, a LV como uma doença em expansão de áreas, com aumento no número de municípios reportando a enfermidade ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN (Reis *et al*., 2017). A priori possuía caráter rural, porém atualmente atinge áreas suburbanas e metrópoles como Belo Horizonte, Brasília e Natal, além disso, está concentrada também em municípios com população maior que 200 mil habitantes (Carranza-Tamayo *et al*., 2010; Romero, 2016; De Arruda *et al.,* 2019).

No Brasil 54 espécies vetores já foram descritos, sendo as principais *Lutzomia ubiquitalis* e *Lutzomia umbratilis* (Pezente; Benedetti, 2019). Um estudo realizado por Silva et al. (2010), confirmaram o primeiro relato de transmissão experimental de *Leishmania infantum* de um gato doméstico com LF ao vetor *L. longipalpis* (Figura 1). Isso destaca o fato de que a presença de gatos infectados em áreas endêmicas não deve ser negligenciada. Os felinos já foram diagnosticados infectados por *Leishmania infantum* por meio de xenodiagnóstico (Marolli *et al*., 2007; Sousa, 2017; Vioti *et al*., 2021). Além disso, no Brasil, as espécies que já foram isoladas de felinos domésticos foram a *L. infantum*, *L. amazonensis* e L*. braziliensis* (Bezerra *et al*., 2019).

Estudos realizados em Israel detectaram a presença do vetor da espécie *Phlebotomus papatasi*. sendo identificado em seu repasto sanguíneo o DNA de gatos, dessa forma, as fêmeas de *Ph. papatasi* podem se alimentar de gatos e, possivelmente, atuar como transmissoras de *L. major* para esses animais e para os

seres humanos. Nesse estudo ainda foi detectado *L. major* e *L infantum* em gatos vadios dentro da mesma região em Israel (Kleinerman *et al*. 2023).

Figura 1 - Vetor *Lutzomyia longipalpis* durante repasto sanguíneo

Fonte: Fernandes (2022).

Ressalta-se ainda, que vetores como *L. Longipalpis*, principal espécie vetora da LV no Brasil, apresenta hábitos alimentares eclético, alimentando-se de sangue de aves, roedores, humanos, gambás, bois, cavalos e cães. Dessa forma, os gatos também poderiam atuar como fonte de alimento para esse parasita (Sousa, 2017). Animais silvestres como *Speothos venaticus* (cão do mato), *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará) e *Cerdocyon thous* (raposa do mato) podem atuar como reservatórios, apesar do cão doméstico ser considerado o principal reservatório urbano. Dessa forma, a infecção também foi relatada em outros mamíferos que coabitam os espaços onde cães parasitados estão presentes (Sousa, 2017). Nas regiões onde a LCan é endêmica, os gatos são frequentemente expostos a *L. infantum*, com soroprevalência variando de 0,7% a 30% de acordo com o animal, estilo de vida e técnica de diagnóstico utilizada (Latta *et al*., 2019).

Os mamíferos domésticos e silvestres podem se infectar por *Leishmania* spp. de acordo com a OMS. Os reservatórios pertencem a diferentes ordens, incluindo os primatas (humanos), o cão doméstico (*Canis familiaris*), Rodentia, Edentata e Marsupialia (Monteiro *et al*., 1994; OMS, 2020). Dessa forma, infecções por *Leishmania* foram descritas em várias outras espécies a partir das ordens acima

mencionadas, bem como em outros, que podem, em alguns casos, atuar como reservatórios secundários ou simplesmente como hospedeiros acidentais (Bezerra *et al.*, 2019).

Outras espécies animais, como animais selvagens, incluindo lebres, que foram envolvidas como reservatórios em um surto de LV no Sudoeste Madri, Espanha. Sendo assim, variadas espécies já foram relatadas com a infecção, como a preguiça (*Choloepus hoffmanni* e *Choloepus didactilus*), roedores dos gêneros *Proechmys*, *Rhipidomys*, *Oryzomys*, *Akodon*, *Rattus* e marsupiais (*Didelphis)*, considerados primariamente reservatórios de *Leishmania* spp*.* no contexto da LT. Contudo, algumas espécies possivelmente desempenham um papel secundário, como os equídeos, felídeos e canídeos selvagens, considerados hospedeiros acidentais, uma vez que não há evidências que comprovem o papel desses animais como reservatórios do parasita (Latta, *et al*., 2019).

Em um estudo realizado por Danhroug, Almeida, Sousa *et al*. (2011), no Mato Grosso, Brasil, um leão *Panthera leo* foi soropositivo para *Leishmania infantum chagasi* no teste de PCR, elucidando assim, que felídeos selvagens também podem estar agindo como reservatórios do parasita em áreas endêmicas. Contudo, no ambiente silvestre as principais fontes de infecção são algumas espécies de tamanduás e raposas (Latta *et al*., 2019). Infecções por *Leishmania* em ouriços foram confirmadas em alguns países, como Tunísia, Espanha e Irã. Na Argélia, ouriços foram infectados com *L. major*, o que está de acordo com outros achados na Tunísia e no Irã, sugerindo, portanto, que os ouriços podem ser considerados como potenciais hospedeiros reservatórios de *Leishmania* (Asgari *et al*., 2020).

Em 2022, Alcover e colaboradores investigaram a prevalência da infecção por *L. infantum* em furões domésticos aparentemente saudáveis (*Mustela putorius furo*) em uma região endêmica da Espanha (Comunidade de Valência), e constataram resposta imunológica a exposição repetida de inoculações com o parasita, sendo, pois, os furões um potencial reservatório, porém, limitado na ausência de um hospedeiro primário (Alcover *et al*., 2022). Além disso, Gazzonis *et al*. (2022) relataram um caso de lesão cutânea por *L. infantum* ocorrido em um cavalo italiano e Touhami *et al*. (2022) observaram na Argélia a prevalência da leishmaniose em gatos vadios (25,3%), ouriços (20,8%) e chacais (50%). Assim, a confirmação da infecção por

Leishmania em gatos e ouriços sugere que estes podem ser considerados como potenciais hospedeiros reservatórios do parasita (Touhami *et al*., 2022).

Outro estudo realizado por Lima *et al*., (2022) descreveram pela primeira vez a ocorrência de infecção natural por *L. infantum* entre uma população de lince-ibérico (*L. Pardinus*) reintroduzido, que vivia no Parque Português do Vale do Guadiana. Os gatos e alguns animais selvagens (por exemplo, raposas e lebres) foram implicados na epidemiologia da infecção, sendo as lebres, envolvidas como hospedeiros reservatórios em um surto de LV no sudoeste de Madri, Espanha.

Os cães (*Canis familiaris*) são tidos como o principal reservatório doméstico da LV no ciclo zoonótico da enfermidade e, em conjunto com os vetores da LV (especialmente *Lutzomyia longipalpis*, mas também *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia migonei*), constituem o cenário epidemiológico da doença em regiões endêmicas de LV no Brasil (Brasil, 2021). Os caninos têm papel fundamental na disseminação da doença em áreas endêmicas, correspondendo com mais de 30% dos animais soropositivos nessas regiões e varaiando de acordo com o animal, estilo de vida e da técnica de diagnóstico utilizada (Otranto *et al*., 2017; Latta *et al*., 2019). Entretanto, a epidemiologia da leishmaniose é intrincada e a transmissão por vetores pode envolver diversas espécies hospedeiras que atuam como reservatórios (Maroli *et al*., 2007; Gonzales *et al*., 2017; Cardoso *et al*., 2021).

Nos lugares onde a LCan é endêmica, os gatos são frequentemente expostos a *L. infantum*, com soroprevalência variando de 0,7% a 30% Em referência à localização geográfica destas espécies nas cidades brasileiras, as pesquisas relataram que *L. braziliensis* estava restrita a região sudeste do Brasil, tanto em áreas endêmicas quanto em áreas não endêmicas do estado do Rio de Janeiro e em endêmicas nos municípios do estado de Minas Gerais. A espécie *L. amazonensis* foi relatada em gatos de municípios endêmicos do Centro-Oeste, Mato Grosso do estado do Sul e no Norte, estado do Pará, enquanto a *L. infantum* foi relatada em 12 dos 27 estados do Brasil, com um menor número em regiões não endêmicas para LV e principalmente em regiões endêmicas (Nascimento *et al*., 2021).

2.3 Epidemiologia da leishmaniose felina (LF)

A Leishmaniose é uma doença zoonótica reemergente e um sério problema de saúde pública, uma vez que está vastamente distribuída nos continentes, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Oriente Médio, sul da Europa, norte da África, América do Sul e Central, contudo, 90% dos casos estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Afeganistão, Bangladesh e Brasil. Essa enfermidade ocorre no Antigo e no Novo Mundo, contudo os estudos sobre LF são limitados, porém, tornaram-se mais numerosos internacionalmente nos últimos anos, especialmente no Brasil, sendo o maior número de estudos relatados (30,8%). Além disso, o Brasil é um dos países com a maior prevalência e vasta distribuição geográfica dessa zoonose (Asfaram *et al*., 2019).

Embora pouco investigada, a infecção por *L. infantum* e os casos clínicos de leishmaniose em gatos foram recentemente relatados em vários países da bacia do Mediterrâneo, com grande variabilidade nos dados de prevalência (Latta *et al*., 2019). Mundialmente, LF não se limita a países europeus, tendo diversos países relatados casos como: Egito, Irã, Tailândia, Texas (EUA), Venezuela e México (Asfaram *et al*., 2019). Além disso, destacam-se casos de leishmaniose felina 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), continente europeu (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 continente asiático (Nasereddin; Salant; Abdeen, 2008; Hatam *et al*., 2010), reportando a infecção em gatos domésticos por diferentes espécies de *Leishmania.*

Na Itália, a incidência foi elevada e os valores totais variaram de 8,6 a 12,5% em sítios diferentes de uma região não endêmica, sendo a *L. infantum* confirmada por diagnóstico (Spada *et al*., 2020; Urbani *et al*., 2020). Contudo, o risco de infecção pode aumentar de acordo com a área, por exemplo, no sul da Itália a prevalência foi de 10,5% entre os 645 animais estudados (Latta *et al*., 2019). Enquanto na Espanha, a soroprevalência entre gatos errantes foi de 3,2%, destacando-se as coinfecções por parasitas zoonótico como *Toxoplasma gondii* e *Toxocara cati* (Miró *et al*., 2014). Na região central e no norte da Grécia, Diakou *et al*. (2009) e Giannakopoulos *et al*. (2017) observaram a prevalência de LF variando de 3,78 a 12,3%.

Em Portugal, a soroprevalência de LF foi de 3,7% em um estudo de 271 gatos na região sul, sendo, pois, considerada alta para o local e uma das razões foi o maior

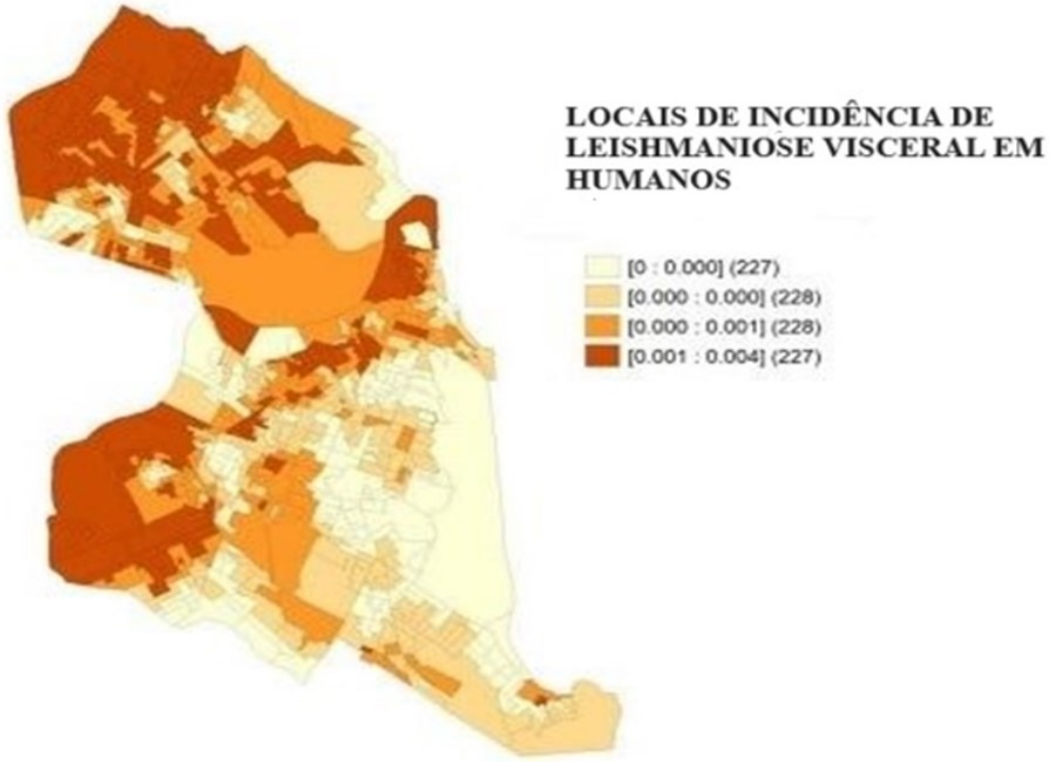
contato entre o vetor infectado e os gatos (Maia *et al*., 2015). Enquanto na região norte de Portugal, em um estudo envolvendo 316 animais, a prevalência foi menor em felinos machos (2,8%) e os gatos da área rural apresentaram maior número de positivos, quando comparados aos gatos da área urbana (Cardoso *et al*., 2010). Isto é importante destacar que os dados de prevalência de LF são caracterizados por uma alta variabilidade devido a diferentes fatores como o método de diagnóstico utilizado (sorológico ou molecular) a área geográfica e a população de gatos avaliados. Assim, esses estudos demonstraram um número crescente de gatos infectados e evidenciaram a importância de investimentos mais precisos sobre o papel dos gatos na epidemiologia atual de leishmaniose (Nascimento *et al*., 2021).

No Novo Mundo, onde áreas endêmicas se estendem do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, o principal agente causador da LV é a *L. infantum chagasi*, todavia em torno de 97% dos casos humanos descritos são originados do Brasil (Brasil, 2012). Os países em desenvolvimento possuem fatores de riscos como a desnutrição das populações carentes e as baixas condições higiênicas, que facilitam a disseminação da infecção de leishmaniose em pacientes humanos (Latta *et al*., 2019). As regiões brasileiras de maior incidência são o Norte, Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, apresentando um comportamento epidemiológico cíclico, com aumento no número de casos em períodos médios a cada cinco anos (Pirajá *et al*., 2013). A LV é considerada uma doença em expansão, uma vez que, até o ano de 1980, sua ocorrência era exclusivamente em municípios da região Nordeste, atualmente, todas as regiões do país confirmam casos anualmente (Brasil, 2019). Inicialmente a LV era relatada como uma doença rural, depois ocorreu casos nas áreas urbanas e, atualmente, ocorre em grandes cidades, revelando o processo de periurbanização da doença (Carneiro *et al*.,2020., Pirajá *et al*., 2013). O Brasil enfrenta expansão geográfica e urbanização da LV, havendo uma correlação entre o desmatamento e a possível emergência de surtos, já que a doença persiste em áreas com mudanças ambientais (Reis *et al*., 2017).

Atualmente, a LV em humanos é um importante problema de saúde pública em Natal no estado do Rio Grande do Norte, com a notificação crescente de casos e óbitos (Barbosa, 2016). Nesse estado, a maior ocorrência de casos de Leishmaniose Visceral Humana foi observada nos municípios de Mossoró (152 casos), Natal (89 casos), Açu (28 casos), Parnamirim (21 casos), Extremoz (17 casos) e São Gonçalo

do Amarante (12 casos), assim, a característica de urbanização da doença, onde o maior número de casos autóctones pertence a municípios da região metropolitana de Natal, a capital do estado do RN, e em municípios mais urbanizados, como no município de Mossoró (Barbosa, 2013). Em Natal, a visualização do mapa (Figura 2) mostra os bairros com maior taxa de incidência nas regiões norte e oeste, e menores taxas na região leste e sul. A população das áreas com maior incidência da doença apresentou um menor percentual de domicílios com água canalizada, rede de esgotamento sanitário, coleta de lixo e percentual de renda igual ou inferior a um salário-mínimo (Fernandes, 2022).

Figura 2 - Mapa da taxa de incidência de Leishmaniose Visceral Humana em Natal-RN.



Fonte: Adaptado de Fernandes (2022).

No nordeste brasileiro foi detectado 82,5% dos casos de LV humana no país entre os anos de 1980 e 2005, sendo, portanto, uma das regiões de maior relevância epidemiológica para essa doença no país (Maia-Elkhoury *et al*., 2008; Silva *et a*l., 2014; Mendonça *et al*., 2017). De acordo com Bezerra et al., (2019) os levantamentos epidemiológicos dessa parasitose em felinos realizados no Brasil, apresentaram uma prevalência de 0 a 54% em áreas endêmicas para leishmaniose humana e canina.

Poucos estudos investigaram leishmaniose felina na região Nordeste. Já no estado de São Paulo, a LV canina teve sua primeira notificação em 1998, no município de Araçatuba. Dessa forma, a infecção por *Leishmania* spp. foi relatada em animais selvagens e felinos domésticos, em 5 dos 27 estados federativos do Brasil (Carneiro *et al*., 2020; Pirajá *et al*., 2013). Um estudo realizado por Carneiro *et al*. (2020) descreveu pela primeira vez, um caso de LF em um gato doméstico causada por L. *amazonensis* em Belém, uma área metropolitana na região amazônica brasileira.

2.4 Prevalência da leishmaniose felina

Com relação à epidemiologia, nos últimos anos, várias pesquisas sobre a prevalência de LF em todo o mundo demonstraram soroprevalência média mundial de 12% (Asfaram *et al.*, 2019). Concomitantemente o número de publicações e artigos sobre LF cresceu em áreas endêmicas, principalmente na Europa e América do Sul, destacando-se o Brasil. Na Europa, a maior parte das pesquisas em LF são de países do sul da Itália, Espanha, Portugal e Grécia. Enquanto no continente americano os registros dessa enfermidade vêm aumentando na América Central e América do Sul, especialmente no Brasil (Soares *et al*., 2015; Asfaram *et al*., 2019).

A LF foi relatada em animais de vários países do mundo, como por exemplo, Turquia (Can *et al*., 2016), Portugal (Maia *et al*., 2015), Grécia (Diakou *et al*., 2009), México (Langoni *et al*., 2012) e Israel (Baneth *et al*., 2022), todos utilizando a sorologia como método de diagnóstico. Dessa forma, as frequências de LF encontradas por pesquisadores foram: 30%, observada na Itália e 0,52%, relatada no Brasil, respectivamente. Esses dados auxiliam na visualização da distribuição mundial da leishmaniose felina e servem de alerta quanto à infecção, chamando atenção para a necessidade de medidas de controle que envolva os gatos domésticos.

Os casos clínicos de LF descritos foram causados por diferentes espécies do agente incluindo: *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. infantum chagasi*. (Pirajá *et al*., 2013). A prevalência de *L. infantum* em gatos variou de 07 a 30% em estudos realizado em todo o mundo, incluindo países do Brasil e da Europa, variando regionalmente na Itália. A Itália mostrou-se alta, com valores totais variando de 8,6 a 12,5% em diferentes sítios de uma região não endêmica, com a presença de *L. infantum* confirmada por diagnóstico (Spada *et al*., 2020; Urbani *et al*., 2020).

Nesse contexto, foi realizado um estudo com 95 gatos de dois estados do México e verificaram a presença de anticorpos anti-*L. mexicana*, anti-*L. braziliensi*s e anti-*L. panamensis*, utilizando as técnicas de ELISA e Western blot (LONGONI *et al*., 2012). Outra pesquisa realizada na área metropolitana de Lisboa, Portugal, investigou a leishmaniose em 138 felinos e demonstraram que de todos estes animais, em 28 foram detectados no sangue periférico a espécie *L. infantum*, utilizando a PCR. Além disso, obtendo resultados diferentes no Oriente Médio, na região de Jerusalém, encontraram soroprevalência em felinos por *L. infantum* de 6,7 %, utilizando a técnica de ELISA.

Na Espanha, estudos sorológicos realizados em diversas regiões demonstraram taxa de soroprevalência variando de 1, 7 a 60 % em gatos. Em Madrid, área endêmica para LCan pesquisas em felinos identificaram soroprevalência de 1,29% (3/233) pela RIFI, utilizando ponto de corte de 1/100. Nesse estudo, também relataram que sete gatos foram sororreativos para *Leishmania infantum*, com diluição de corte de 1/50, resultando em 4,29% de sororreativos, contudo, na técnica de PCR, apenas um animal (0,43%) apresentou positividade (Pirajá *et al.,* 2013).

Outro estudo realizado por Latta *et al*., (2019) avaliaram a prevalência de infecção por *L. infantum* em gatos na Itália por testes sorológicos e moleculares e identificação de potenciais fatores de risco. Amostras de sangue de 2.659 gatos das regiões do norte (n = 1.443), central (n = 471) e sul (n = 645) da Itália foram testados para anticorpos contra *L. infantum*, por teste de anticorpos por imunofluorescência e para o DNA dos parasitas, por PCR em tempo real. Uma prevalência cumulativa geral de *L. infantum* de 3,9% foi registrada por sorologia (3,3%) e / ou PCR (0,8%), com uma taxa mais alta (10,5%) no sul da Itália. O risco de infecção por *L. infantum* nos gatos foi significativamente associada às áreas geográficas, faixa etária, condição de castração e infecção por FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina).

Um estudo conduzido por Kleinerman *et al*. (2023) constatou que a infecção por *Leishmania* estava amplamente disseminada em uma população de felinos durante um surto de leishmaniose cutânea humana no sul de Israel. Oito dos 29 gatos analisados foram identificados como soropositivos para *Leishmania* (28%), enquanto 7/29 (24%) apresentaram resultados positivos no teste de PCR para o espaçador transcrito interno 1 (ITS-1). Destes, quatro (14%) foram positivos para *L. major* e três (10%) para *L. infantum*. Cinco gatos com resultado positivo apresentaram lesões

cutâneas, como úlceras, alopecia e crostas, e outros cinco manifestaram lesões oculares. Os resultados demonstram, pela primeira vez, a existência da infecção por *L. major* em gatos em Israel, assim como foi relatado em pesquisas realizadas em Portugal e Turquia.

Na Grécia, região metropolitana de Atena, Matralis *et al*., (2023) realatram um caso de LF em um gato que apresentou inchaço facial e lesões oculares. O diagnóstico de LF com panniculite causada pela *L. infantum* foi estabelecido por meio de citologia, histopatologia, PCR e detecção de anticorpos contra *Leishmania* (por meio de Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI).

Uma revisão sistemática foi relatada a prevalências de anticorpos e PCR em populações felinas em todo o mundo. Os resultados estimaram uma prevalência global de 10%. Notavelmente, a Itália apresentou a maior prevalência de anticorpos (24%) e PCR (21%) em comparação com outros países (Asfaram *et al*., 2019). É importante destacar que a epidemiologia de *L. infantum* possui uma característica peculiar, caracterizada por uma disseminação desigual, com focos endêmicos ou hiperendêmicos em áreas onde a prevalência de vetores ou hospedeiros infectados é menor ou inexistente (Gradoni, 2018; Baneth *et al*., 2020).

Nas áreas brasileiras tidas como endêmicas, a prevalência da LF encontrada variou bastante tanto na RIFI como no ELISA (Costa *et al*., 2010). Serrano e colaboradores (2008) relataram o primeiro caso de LF em Araçatuba-SP, em uma área endêmica para LV. Nesse caso, o animal apresentava alopecia e descamação na região do ouvido e temporal, típico de dermatite crostosa. Foram usados os métodos RIFI e ELISA para verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp., associado ao exame parasitológico e a técnica de PCR, confirmando a infecção. Assim, estudos em Andradina e Araçatuba, municípios do Estado de São Paulo, demonstraram soroprevalência felina variando entre 4,2 e 51,9% dos animais respectivamente (Coelho *et al*., 2011).

Uma pesquisa envolvendo 200 gatos adultos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), a presença da infecção foi confirmada por meio da detecção direta do parasita em esfregaços obtidos através de punção aspirativa de linfonodo, medula óssea, baço e fígado. Além disso, a confirmação foi realizada através da identificação de anticorpos anti-L. infantum chagasi no ensaio de ELISA indireto. Os resultados revelaram uma prevalência de infecção de 14,5%, sendo 4%

diagnosticados por métodos parasitológicos e 11,5% por meio de sorologia. Dois gatos soropositivos apresentaram lesões de pele e hepatoesplenomegalia, no entanto, não foi possível determinar definitivamente se tais alterações eram resultantes da infecção por Leishmania spp., uma vez que outras doenças infecciosas não foram excluídas (Costa et al., 2010).

Em um caso de Leishmaniose Tegumentar Americana em um cão na cidade de Barra Mansa, no Rio de Janeiro, uma área considerada não endêmica, foi conduzido um levantamento sorológico envolvendo 177 cães e 43 gatos. Pela técnica de RIFI, foram identificados 10,7% de cães com sororreagentes e 5,6% com resultados inconclusivos. No caso dos felinos, nenhum deles apresentou reatividade à RIFI; no entanto, por meio do ELISA, 2,4% exibiram sororreatividade e 4,8% apresentaram resultados indeterminados (Souza et al., 2009).

Silva *et al*. 2008 relataram em área endêmica do município do Rio de Janeiro soroprevalência elevada (25%) para *Leishmania* spp. em gatos domésticos assintomáticos. Outro estudo realizado em Bauru, São Paulo, avaliou a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em animais da espécie felina por testes sorológicos de RIFI e ensaio imunoenzimático (ELISA), e associou as seguintes variáveis: gênero, idade, raça e forma de criação. Dos soros de 276 felinos, 82 foram reagentes pelo método ELISA, 17 pelo RIFI e 10 em ambos os testes. Houve associação estatística significativa para a variável forma de criação, em que 100% dos animais errantes foram soropositivos em pelo menos um dos testes. Tal associação não foi encontrada para as demais variáveis analisadas. Dessa forma, não houve concordância entre o resultado dos testes, uma vez que o método ELISA é mais sensível que o método RIFI (Campriger *et al.*, 2019).

Inquéritos epidemiológicos realizados em vários países têm demonstrado taxas preocupantes de infecção nos gatos domésticos (Bezerra *et al*., 2019). Dessa forma, Asfaram *et al*., (2019) em um estudo envolvendo metanálise observou que a prevalência de infecção em gatos por leishmaniose por soroprevalência foi de 24% e por PCR de 21%, sendo encontradas mais na Itália do que em outros países. Além disso, os dados mostraram uma alta taxa de soroprevalência (12,2%) de LF em países do sul da Europa, incluindo Itália, Espanha, Portugal e Grécia. No entanto, isso poderia ser justificado pelo aumento da descoberta de casos ativos em gatos,

desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos e elevada taxa de prevalência dessa doença nesses países.

Dessa forma, é importante notar que os dados de prevalência de LF são caracterizados por uma alta variabilidade em decorrência dos diferentes fatores como o método de diagnóstico utilizado, sorológico ou molecular, a área geográfica e a população de gatos rastreados (Miró *et al*., 2014; Latta *et al*., 2019).

Em um estudo realizado por Rocha e colaboradores (2019) investigaram a infecção por *L. infantum* em gatos que viviam na região do bioma Amazônia, utilizando métodos sorológicos e moleculares. Nesse estudo foram coletadas amostras de sangue de 105 gatos para avaliação sorológica de anticorpos imunofluorescentes e determinação dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Foram coletados também cotonetes conjuntivais desses gatos e realizado o teste de PCR convencional e sequenciamento visando genes de *L. infantum* e *Leishmania* (ITS-1). Nesse estudo, foi detectado soropositividade em 32 animais, confirmando que estava ocorrendo contato entre esses gatos e o parasita.

A cidade de Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte, é considerada uma área endêmica para LV e classificada pelo Ministério da Saúde como uma região de transmissão intensa dessa enfermidade, onde se observa a persistência de velhas áreas de ocorrência e surgimento de novos focos, o que demonstra dificuldades no seu controle e aponta a necessidade de estudos sobre sua distribuição e a relação com áreas e populações sob risco (Teixeira *et al*., 2019). No quadro 4 (Apêndice D) é possível observar os diversos estudos sobre diagnóstico de leishmaniose felina no Brasil (1940-2023).

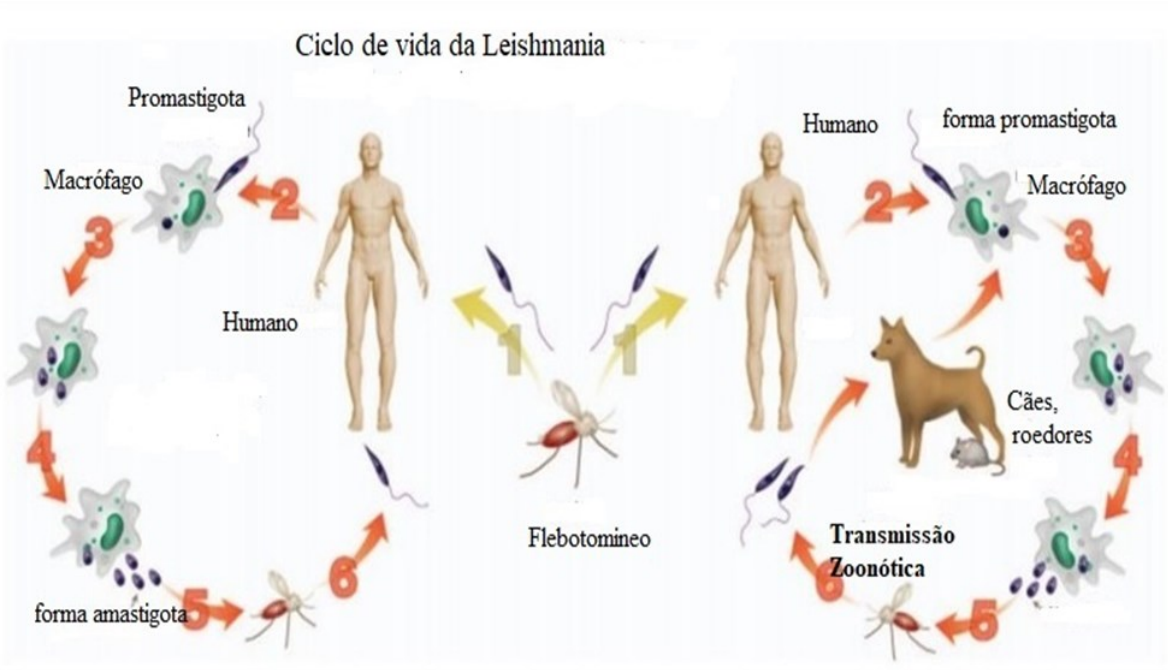
2.5 Mecanismos de transmissão da leishmaniose

Em relação à transmissão, o vetor pertencente ao gênero *Lutzomyia,* e a principal espécie transmissora no Brasil é *L. longipalpis* pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, contudo a espécie *L. cruzi*, já foi identificada como transmissora no Mato Grosso e, em seguida no Mato Grosso do Sul, além disso, foi relatada a competência vetorial do flebotomíneo da espécie *L. migonei.* Essa espécie possui ampla distribuição geográfica, incluindo áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas.

O ciclo biológico do parasita *Leishmania* (Figura 3) consiste na inoculação de promastigotas metacíclicas através do aparelho bucal do flebotomineo, as promastigotas são interiorizadas por macrófagos teciduais, posteriormente transformando-se em amastigotas, iniciando assim, o processo de replicação no interior do vacúolo parasitóforo. Quando o número de amastigotas se torna superior ao suportável pela célula, ocorre a lise da membrana e a liberação dos parasitos no meio intersticial, podendo assim, os parasitas serem fagocitados por um novo macrófago. Os macrófagos parasitados podem ser ingeridos pela fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo; no estômago do inseto, o macrófago se rompe liberando amastigotas.

Em seguida, ocorre a transformação dos amastigotas em promastigotas, que se reproduzem por divisão binária, as promastigotas migram para o intestino e colonizam as regiões do piloro e íleo, transformando-se em paramastigota. As paramastigotas posteriormente transformam-se em promastigotas, migrando para a faringe do inseto (promastigotas metacíclicas) onde irão passar para os hospedeiros na saliva durante o repasto sanguíneo (Oliveira, 2022). A hematofagia realizada pela fêmea é primordial para que ocorra o desenvolvimento ovariano e a maturação dos ovos. Comumente o processo de oviposição acontece após o primeiro repasto sanguíneo, contudo pode ocorrer um segundo repasto anterior a oviposição, aumentando as chances de transmissão dos parasitos aos animais vertebrados e enfatizando sua importância epidemiológica no contexto das leishmanioses (Desjeux, 2004; Brasil, 2017).

Figura 3 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* sp. durante o repasto sanguíneo



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.* (2014).

A forma promastigota dos parasitas *Leishmania* responsáveis por doenças humanas (LV, LC e LMC) são injetadas na pele quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta de sangue (1) e são então absorvidas por macrófagos hospedeiros (2). Os promastigotas se convertem na forma amastigota não flagelada dentro dos macrófagos (3) e depois se dividem por fissão binária (4). Os amastigotas são liberados pela ruptura dos macrófagos (5) e podem então ser captados por uma fêmea do flebotomíneo durante outro repasto sanguíneo. A forma amastigota, então se converte na forma promastigota no intestino médio do flebotomíneo e pode ser transmitida novamente para outro humano ou para outros animais (Figura 3).

A possibilidade de transmissão na ausência de flebotomíneos é real, visto que a infecção transplacentária foi documentada em cães, humanos e animais selvagens (Baneth *et al*., 2008; Solano-Gallego *et al*., 2009; Martín-Sánchez *et al*., 2020). Além disso, a transmissão venérea é uma via potencial de infecção (Silva *et al*., 2009). Outros modos de transmissão direta foram sugeridos, sendo que a transmissão vertical é considerada principalmente responsável pela alta incidência e prevalência em cães de caça nos EUA, em áreas sem vetores flebotomíneos (Baneth *et al*., 2008; Solano-Gallego *et al*., 2009; Toepp *et al*., 2017). O risco de transmissão por transfusão sanguínea é relevante tanto para humanos quanto para cães em regiões endêmicas

(Baneth *et al*., 2008; Solano-Gallego *et al*., 2009). Em áreas endêmicas, gatos saudáveis, assim como cães e humanos saudáveis, podem testar positivo por PCR em exames de sangue. Dessa forma, a *L. infantum* já foi identificada por meio de PCR no sangue de felinos, sugerindo uma possibilidade transmissão por meio da transfusão sanguínea, como ocorre nos cães e seres humanos (Pennisi; Persichetti, 2018).

Em cães já foi relatado possível transmissão através de ferimentos causados por mordedura de um animal infectado, sendo reportadas como responsáveis por casos autóctones em áreas não endêmicas. Todavia, essas informações ainda não foram descritas em gatos (Bezerra *et al*., 2019; Naucke; Amelung; Lorentz, 2016). Ademais, promastigotas de *L. infantum* foram encontradas em glândulas salivares do carrapato de espécie *Rhipicephalus sanguineus*, contudo, sua capacidade vetorial em transmitir *L. infantum* não foi confirmada (Viol *et al*., 2016). Não existem evidências que indiquem a participação de carrapatos e pulgas na transmissão natural da *Leishmania* (Baneth *et al*., 2008; Solano-Gallego *et al*., 2009).

Dessa forma, é provável que, outras espécies de flebotomíneos, ou outros ectoparasitas de cães, como os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e as pulgas *Ctenocephalides felis felis* possam estar envolvidas na transmissão da LVA. Um estudo realizado por Colombo *et al*., (2012) relataram que nos cães infectados por pulgas e carrapatos, em todos os seus estados evolutivos, havia material genético positivo para *Leishmania infantum chagasi*, tendo sido identificado nessas ectoparasitas positividades em torno de 53,1% nas pulgas, e 77,7% nas ninfas, até mesmo, após a ecdise de ninfa para o estádio adulto, sugerindo um potencial dos carrapatos em preservar os parasitas vivos.

Vários estudos evidenciaram que os flebotomíneos se alimentam do sangue de gatos (Gonzáles *et al*., 2017) e foram encontrados infectados por *L. infantum* após se alimentarem de gatos naturalmente infectados (Maroli *et al*., 2007; da Silva *et al*., 2010; Mendonça *et al*., 2020). Experimentos de xenodiagnóstico, nos quais flebotomíneos foram alimentados em um gato naturalmente infectado com *L. infantum* e depois examinados quanto à presença do agente infeccioso, foram bem-sucedidos (Batista *et al*., 2020). Além disso, em gatos expostos a flebotomíneos em áreas endêmicas, foram detectados anticorpos contra antígenos salivares de flebotomíneos,

e a resposta de anticorpos felinos à saliva de *Phlebotomus perniciosus* foi positivamente associada à infecção por *Leishmania* (Pereira *et al*., 2019).

Pesquisas na Itália e na Síria evidenciaram, através de tipagem de DNA, parasitas idênticos no sangue dos gatos e no intestino dos flebotomíneos, que se infectaram naturalmente ao realizar repasto sanguíneo, corroborando para transmissão do parasita. Sendo assim, a transmissibilidade foi comprovada dos parasitas de felinos a um vetor sugerindo que os gatos podem exercer o papel de reservatórios domésticos da doença, não sendo, portanto, apenas um hospedeiro acidental (Pirajá, *et al*., 2013). 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).

Mesmo expostos a picadas de flebotomíneos, a prevalência geral de infecção por *L. infantum* em gatos, é geralmente menor do que em cães que vivem nas mesmas áreas (Latta *et al*., 2019).

Com o objetivo de verificar a possibilidade de transmissão de *L. infantum* de um gato doméstico com sintomas clínicos para um cão doméstico saudável através do vetor invertebrado, uma pesquisa reafirmou a competência desta via de transmissão e demonstrou que o cão infectado desenvolveu os sinais clínicos de LV canina, com sintomas como: aumento dos nódulos linfáticos, alopecia, lesões nas orelhas e face e perda de peso. Dessa forma, esses estudos destacam a possibilidade de transmissão da doença de gatos para cães, e alertam para uma possível transmissão de gatos a humanos (Batista *et al*., 2020).

2.6 Sinais clínicos da leishmaniose felina

Com relação às características clínicas de infecção em gatos por *Leishmania* spp., a forma cutânea é a mais relatada, embora alguns estudos de prevalência sorológica indicam que os felinos podem ser infectados e apresentarem-se assintomáticos (Piajá *et al*., 2013).

Quando as lesões cutâneas estão presentes, a punção aspirativa com agulha fina dos nódulos da pele pode ser útil para determinar a inflamação granulomatosa, tipicamente produzida por *Leishmania* spp., e observada em lesões oculares de gatos. As lesões da orelha e do plano nasal são consideradas como diagnósticos diferenciais

de carcinoma de células escamosas. Sem lesões cutâneas, os gatos podem apresentar rinite granulomatosa. A infiltração histiocítica do tecido, um sinal típico da leishmaniose canina, não é um marcador específico na LF (Foroughi-Parvar *et al.*, 2021).

Na LV, a citologia é útil para detectar hipoplasia linfóide no baço, com presença de amastigotas, fígado infiltrado inflamatório composto principalmente por macrófagos na área portal e entre os hepatócitos. Resumindo, os sintomas clínicos da LF são semelhantes aos da LCan, mas apresentam características específicas, como lesões cutâneas ulcerativas e nodulares (Foroughi-Parvar *et al*., 2021). Também foi registrado um caso de LF com inflamação na glândula mamária (Pereira *et al*., 2019). Dado que muitos dos sintomas clínicos apresentados por gatos infectados são causados por comorbidades, é importante tentar distinguir as anormalidades clínico-patológicas resultantes da LF. De fato, essas coinfeções podem estar presentes em cerca de 10% dos gatos infectados por *L. infantum* (Lee; Bosward; Norris, 2010). Recentemente, Chatzis *et al*. (2020) publicaram um estudo com o objetivo de determinar os sinais clínicos da LF e avaliar se a doença está relacionada a alterações laboratoriais (Rougeron *et al*., 2011). Os sinais clínicos mais frequentes em gatos foram cutâneos, seguidos de sistêmicos, oculares, mucocutâneos e respiratório, contudo, muitos dos felinos apresentaram uma combinação de sinais clínicos. Assim como a associação estatisticamente significante entre sinais dermatológicos e FIV e entre sinais oculares e o estado castrado das fêmeas (Torres-Garcia *et al*., 2022).

Aos sintomas clínicos da LC em felinos inclui a formação de lesões nodulares e ulcerativas, lesões papulares, dermatite generalizada, alopecia e lesões endurecidas na região do focinho, orelhas, lábios e pálpebras. Embora não patognomônicas, lesões dermatológicas podem ser importantes para a triagem de animais infectados em áreas endêmicas (Vides *et al*., 2011). Enquanto, que na forma visceral pode haver linfadenopatia, secreção ocular mucopurulenta, ulcerações na cavidade oral, opacidade de córnea, alopecia e eritema cutâneo (Figura 4). A ocorrência de sinais inespecíficos, como febre, perda de peso, estomatite e enterite também foram descritas (Vides *et al*., 2011; Gramiccia *et al*., 2011).

Os gatos doentes podem apresentar lesões ulceradas com sangue na região do focinho, e nódulos com bordas nas orelhas. O exame físico e os exames hematológicos e bioquímicos podem encontrar-se dentro dos valores de referência,

inclusive nos animais, que se observa a forma amastigota nos testes, podendo ocorrer uma elevação das proteínas totais sanguíneas, devido aumento das gamaglobulinas (Garrido, 2012).

Além disso, alguns sinais inespecíficos como gengivoestomatite crônica, linfadenomegalia, lesões cutâneas, lesões oculares, mucosas hipocoradas, hepatomegalia, icterícia, caquexia, febre, vômitos, diarréia, descarga nasal crônica, esplenomegalia, dispnéia e aborto vem sendo descritos ao se diagnosticar gatos infectados por *Leishmania* spp. (Pennisi *et al*., 2015; Vides *et al*., 2011, Bezerra *et al*., 2029). Os sinais clínicos mais comuns verificados em gatos positivos foram: perda de peso, alopecia, lesões dérmicas, mucosas hipocoradas, lesão de orelha e lesão ocular (Figura 4). Raramente foram descritas lesões ao nível do pescoço, ombros, regiões dorsais, lombar, abdômen, tórax e cauda (Pennisi *et al*., 2004; Savani *et al*., 2004; Vides *et al*., 2011). A observação da onicogrifose deve ser destacada, uma vez que essa lesão é frequentemente observada em cães com LV, mas é sub-relatada nos felinos. Ademais, a LF com lesões associadas ao ouvido e plano nasal deve ser considerada como diagnóstico diferencial para carcinoma espino celular em gatos (Headley *et al*., 2019).

Um relato de caso realizado por Mestrinho *et al*. (2022) observaram como único sintoma clínico lesões orais em um gato doméstico infectado por *L. infantum*. A lesão primária era uma lesão nodular maxilar, dolorosa com sangramento espontânea associada à doença periodontal avançada, que não foi resolvida com extração dentária ou tratamento periodontal.

Ademais, Tabar *et al.* (2022), constataram diarréia crônica como o único sintoma clínico de um gato com 10 anos de idade e os exames laboratoriais identificaram hiperglobulinemia e anemia não regenerativa. Ao realizar endoscopia digestiva e biópsia, observaram reação inflamatória difusa granulomatosa e linfoplasmocitária generalizada em todos os segmentos do trato gastrointestinal avaliados, com numerosas espécies de formas amastigotas *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos. O parasita também foi detectado no baço e medula óssea e a sorologia (RIFI) foi positiva.

Outro relatado feito por Matralis *et al.* (2023), descreveu uma situação de LF acompanhada de paniculite, uma lesão cutânea documentada pela primeira vez nessa enfermidade felina. O gato apresentou inchaço facial e lesões oculares. Assim quando

um gato apresenta lesões cutâneas que se assemelham a abscessos e/ou edema conjuntival ou de terceira palpebra, sobretudo em regiões endêmicas de leishmaniose ou em gatos provenientes de áreas endêmicas, devem ser considerados para o diagnóstico diferencial de LF.

Nesse contexto, é importante frisar também, que exames oftálmicos devem ser realizados em felinos com suspeitas de leishmaniose, uma vez que formas amastigotas demonstram ter tropismo para o sistema ocular, sendo observados uveítes, conjuntivites, blefarites e queratites (Garrido, 2012). Madruga, Ribero, Ruiz *et al*. (2018) relataram o primeiro caso de leishmaniose felina com manifestação exclusivamente ocular da doença no Brasil, cuja diagnóstico foi confirmado por meio de análise de humor aquoso. Nesse estudo, uma gata de oito anos de idade, atendida inicialmente com uveíte bilateral, com aparência pseudotumoral em íris e ao exame histopatológico da conjuntiva superior do olho esquerdo foi observado amastigotas compatíveis com *Leishmania* spp.

Diante disso, a leishmaniose deve ser considerada como um diagnóstico diferencial nos gatos que apresentam uveíte com aparência pseudotumoral de íris. Assim, os felinos podem ser considerados suspeitos de leishmaniose quando habitem ou viajem para zonas endêmicas com apresentação clínica de linfonodos aumentados, dermatite nodular/ulcerativa/esfoliativa, uveíte, anemia, pancitopenia, hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia (Marcos *et al*., 2009; Gramiccia, 2011).

Figura 4 - Sintomas clínicos de Leishmaniose felina.

Fonte: Santos *et al*. (2021).
Legenda: (A) áreas de alopecia; (B) úlceras na cavidade oral (complexo gengivite-estomatite); (C) exame físico de gato positivo sem sinais clínicos, mas positivo em aspirado de medula óssea para exame citológico; (D) formas amastigotas em macrófago-citologia; (E) edema bilateral e hiperemia de conjuntiva; (F) Estomatite aftosa.

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LF é claramente desafiador, e todos esses dados podem explicar o alto número de gatos infectados assintomáticos, ressaltando sua importância como vetor de transmissão do parasita para os seres humanos (Foroughi-Parvar *et al*., 2021). A abordagem diagnóstica geral da leishmaniose em animais de companhia deve ser baseada no histórico de casos clínicos, achados laboratoriais específicos e resultados de testes diretos, indiretos e moleculares (Bezerra *et al*., 2019; Gramiccia, 2011). Os métodos diagnósticos da LCan também poderão ser usados para o diagnóstico da LF. Sendo assim, é possível a utilização de métodos clínicos, sorológicos, parasitológicos, moleculares, além da cultura do protozoário (Gramiccia, 2011; Pennisi *et al*., 2015).

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses é realizado principalmente pelos exames parasitológicos (identificação do parasita em esfregaço sanguíneo e/ou cultivo do parasita), imunológicos (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e

moleculares (PCR) (Brasil, 2017). Esses métodos são empregados principalmente para o diagnóstico de LF para fins clínicos e de pesquisa, embora poucas investigações tenham usado múltiplos testes em combinação (Latta *et al*., 2019). Esses são considerados importantes para alcançar um resultado definitivo. Vale ressaltar que os testes rápidos imunocromatográficos, também vêm sendo utilizados como método de triagem para LVcan Porém, ainda não há consenso sobre o método de escolha para o diagnóstico de LF (Latta *et al*., 2019).

Em gatos com LF avaliações clínico-patológicas abrangentes nem sempre foram realizadas, mas algumas anormalidades são frequentemente observadas. Entre essas anormalidades, destacam-se a anemia não regenerativa, hiperglobulinemia e elevações nas frações de alfa e gamaglobulina, juntamente com a ocorrência de proteinúria. Esses achados são consistentes com relatos em estudos anteriores (Pennissi *et al.*, 2015; Fernandez-Gallego *et al.*, 2020; Urbani *et al.*, 2020; Savioli *et al*., 2021). Ainda em relação aos achados laboratoriais foi relatada, a hiperproteinemia sendo a mais frequente, anemia, neutrofilia, trombocitopenia, proteinúria e azotemia (Torres-Garcia *et al.*, 2022). Em um estudo conduzido por Silva *et al.* (2023), constataram mudanças significativas nos dados hematológicos e bioquímicos em felinos com LF ocasionada por *L. infantum*, tais como redução na contagem de plaquetas e aumento na concentração de proteínas com diminuição de albumina. Isso indica que, em regiões onde a LV é endêmica, gatos que manifestem sintomas clínicos compatíveis com LF (como lesões cutâneas, perda de peso, linfonodos aumentados ou lesões oculares) juntamente com alterações hematológicas (plaquetopenia) e bioquímicas (hiperproteinemia e hipoalbuminemia), devem ser submetidos a um diagnóstico diferencial para LF causada por infecção por *L. infantum.*

Assim como na LCan, a hiperplasia linfóide é um padrão citológico comum observado em esfregaços de aspirados de gânglios linfáticos de gatos infectados, conforme documentado em estudos anteriores (Pennissi *et al.*, 2015). Além disso, em alguns casos de LF acompanhados até o óbito ou submetidos à eutanásia, foi observado o desenvolvimento de doença renal crônica, que se tornou a causa mais comum de morte, como relatado em estudos conduzidos por Pennisi *et al.* (2016) e Hartmann *et al*. (2020).

Com relação ao diagnóstico por imagem, foram realizados exames para avaliar as anormalidades anatômicas e realizar biópsias de lesões nodulares ou infiltrativas

em três gatos que apresentaram uma grave síndrome obstrutiva do trato respiratório superior devido à infecção por *L. infantum*. Dois estudos utilizaram a tomografia computadorizada da cabeça (Franchi *et al*., 2019; Altuzarra *et al*., 2020), e em dois casos diferentes, foi realizada a rinoscopia (Leal *et al*., 2018; Altuzarra *et al*., 2020). Em um dos casos mais graves, os danos osteolíticos afetaram até mesmo a placa cribriforme etmoidal e a massa nasal se estendeu para a cavidade craniana rostral, afetando os bulbos olfatórios (Altuzarra *et al*., 2020). É importante notar que as imagens radiológicas desses casos de gatos com síndrome obstrutiva do trato respiratório superior devido à *L. infantum* podem apresentar semelhanças com outras condições, como doenças neoplásicas e rinite fúngica, o que torna essencial uma avaliação cuidadosa para um diagnóstico preciso.

Quando surgem lesões cutâneas, a realização de punção aspirativa com agulha fina dos nódulos da pele pode ser útil para determinar a existência de inflamação granulomatosa, frequentemente causada por *Leishmania* spp. Essa inflamação granulomatosa também pode ser observada em lesões oculares de felinos. As lesões na orelha e na região nasal são consideradas diagnósticos diferenciais para carcinoma de células escamosas. Na ausência de lesões cutâneas, os gatos podem apresentar rinite granulomatosa. A infiltração histiocítica do tecido, que é um sinal característico da leishmaniose canina, não é um marcador específico na leishmaniose felina. No caso da LV, a citologia é útil para detectar hipoplasia linfóide no baço, bem como a presença de amastigotas. Além disso, é possível observar um infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos na região portal do fígado e entre os hepatócitos (Foroughi-Parvar *et al*., 2021).

De acordo com Torres-Garcia e colaboradores (2022) a citologia, para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* foi à opção diagnóstica preferida dos profissionais para o diagnóstico de LF, seguida pela histopatologia e sorologia. Não havendo, pois, associação estatisticamente significante entre os resultados da PCR e os do exame citológico e/ou histopatológico (amplamente utilizados como testes confirmatórios para LF e considerados padrões ouro). No entanto, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre citologia e/ou histopatologia e soropositividade.

Na avaliação estatística da confiabilidade do método diagnóstico, a citologia e/ou histopatologia foram consideradas como padrão ouro para a identificação direta

de parasitos de acordo com as recomendações dos especialistas para LF. A técnica de anticorpos fluorescentes indiretos (RIFI) foi utilizada na maioria dos casos, de modo que para possibilitar a análise estatística de resultados sorológicos quantitativos positivos, todos os dados foram transformados de acordo com a mesma escala de títulos com base nas recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal. Dessa forma, foram divididos em faixas de título de 1/40, ≤1/80,>1/80; ≤1/160,>1/160; ≤1/320,>1/320; ≤1/640 e >1/640. Para aqueles casos em que os dados sorológicos quantitativos não foram fornecidos e apenas um resultado positivo ou negativo de um teste como Western Blott (WB), os resultados foram agrupados como qualitativos (Torres-Garcia *et al*., 2022).

Com referência ao método diagnóstico direto, o mesmo, consiste na demonstração de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos em biópsias de tecidos infectados ou em esfregaços aspirados de gânglios linfáticos, baço ou fígado, de pele ou medula óssea. Sendo os linfonodos poplíteos o melhor órgão de eleição para a colheita de amostras, quando comparado com a punção da medula óssea, baço e fígado. A sensibilidade desse método depende de fatores como densidade parasitária, tipo de material coletado e tempo em que a análise microscópica foi realizada. A sensibilidade também pode diferir dependendo do órgão em análise. No entanto, um resultado positivo confirma a infecção (Santos *et al*., 2017). Por vezes, os estudos citológicos podem revelar pouco ou nenhum parasita em animais com sinais clínicos da doença.

A descrição dos padrões histopatológicos associados à LF está disponível principalmente a partir de lesões biopsiadas da pele, lesões mucosas e olhos. No caso das lesões cutâneas em gatos, elas geralmente exibem um padrão de dermatite granulomatosa difusa, com a presença de parasitas *Leishmania* no interior de macrófagos. Outro padrão observado envolve uma perifoliculite granulomatosa e uma reação tecidual do tipo liquenoide ou dermatite de interface, com uma carga parasitária geralmente menor (Navarro *et al*., 2010; Puleio *et al*., 2011). Além disso, em outras regiões do corpo, como nódulos mucosos, olhos, baço, fígado e rins, também foram observadas inflamações granulomatosas com uma presença significativa de amastigotas (forma intracelular do parasita). Essas constatações são provenientes de estudos anteriores que contribuíram para o entendimento dos

padrões histopatológicos associados à LF (Navarro *et al*., 2010; Puleio *et al*., 2011; Verneuil, 2013; Migliazzo *et al*., 2014).

As técnicas de imunohistoquímica podem ser usadas para a confirmação do exame histopatológico (Gramiccia, 2011; Coelho *et al*, 2011; Santos *et al*., 2017; Teives, 2015). Em um estudo de revisão bibliográfica, Torres-Garcia *et al*., (2022) observaram que o exame de citologia para a detecção das formas amastigotas de *Leishmania* foi a opção diagnóstica preferida dos profissionais para o diagnóstico de LF seguido pela histopatologia, sorologia e PCR. Não houve associação estatisticamente significante entre os resultados da PCR e os do exame citológico e/ou histopatológico. No entanto, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre citologia e/ou histopatologia e soropositividade.

Uma pesquisa realizada em 2019 por Headley *et al.*, investigou a causa de lesões cutâneas progressivas crônicas em dois gatos do Centro-Oeste do Brasil, usando análises citológicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas. Clinicamente, ambos os gatos apresentaram lesões cutâneas ulcerativas no plano nasal e no ouvido, resultando em um diagnóstico experimental de carcinoma de células escamosas. Além disso, ambos os gatos apresentavam graus variados de onicogrifose. No entanto, a citologia revelou reações inflamatórias crônicas associadas a amastigotas intralesionais. A histopatologia confirmou dermatite ulcerativa crônica associada a organismos parasitários intralesionais e intracitoplasmáticos compatíveis com amastigotas de *Leishmania* spp. dentro de histiócitos. O ensaio imuno-histoquímico demonstrou que as estruturas parasitárias intralesionais identificadas por citologia e histopatologia eram imunorreativas a antígenos de *Leishmania* spp., confirmando a participação desse agente infeccioso no desenvolvimento das lesões cutâneas desses animais (Headley *et al*., 2019).

Dessa forma, embora a detecção do parasita seja muito mais confiável ao encontrar amastigotas de *Leishmania* no baço, fígado e tecidos da medula óssea, o tipo de antígeno em testes sorológicos desempenhou um papel preciso na identificação de casos de LF (Foroughi-Parvar *et al*., 2021). Para confirmar o diagnóstico, um teste sorológico quantitativo ou Western blot deve ser realizado em soros de gatos com risco de exposição à infecção por *Leishmania* e sinais clínicos ou anormalidades clínico-patológicas compatíveis com leishmaniose. No entanto, em caso de títulos de anticorpos negativos ou pouco positivos, uma técnica parasitológica

deve ser usada para identificar a infecção (citologia, histologia, PCR), antes de descartar o diagnóstico. Testes no local de atendimento validados para detectar anticorpos anti-*L. infantum* em gatos não estão atualmente disponíveis. A triagem de gatos clinicamente saudáveis por meio de sorologia específica para *Leishmania* sp. e técnicas de PCR (sangue, gânglios linfáticos ou swabs conjuntivais) é recomendada nas seguintes situações especiais em áreas endêmicas: doadores de sangue, gatos que requerem terapias imunossupressoras e antes de realojar gatos para áreas não endêmicas (Oliveira *et al.*, 2015; Gramiccia, 2011).

A análise do interferon gama (IFN-γ) presente no sangue dos felinos pode proporcionar uma estimativa mais precisa da exposição do gato à doença quando combinada com testes sorológicos e moleculares (Chatzis *et al*., 2014, Martínez-Orellana *et al*., 2017). Estudos recentes realizados por Savioli *et al*. (2021) e Urbani *et al*. (2020) demonstraram que níveis elevados de amiloide A, gama globulinas e alfa 2 globulinas podem ser indicadores consistentes de doença em felinos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para identificar marcadores definitivos da doença.

A maioria dos estudos epidemiológicos foi realizada com enfoque no diagnóstico da LV, ao passo que apenas alguns abordaram a LT ou LMC. Para essa última forma, os métodos mais precisos de diagnóstico são o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste indireto de anticorpos fluorescentes, em conjunto com o WB, os quais apresentam uma especificidade de 97% a 100% (Trevisan *et al*., 2015). Persichetti *et al*. (2017) compararam as técnicas de ELISA, RIFI e WB, e concluíram que o ELISA é mais apropriado para o diagnóstico da leishmaniose clínica, enquanto o RIFI e o WB são métodos mais sensíveis e, portanto, devem ser utilizados para o diagnóstico das formas subclínicas (Persichetti *et al*., 2017).

2.7.1 Diagnóstico indireto

2.7.1.1 Métodos Sorológicos

Dentre as técnicas de diagnóstico sorológico, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), são as mais utilizadas, sendo esta última a mais sensível (Vides *et al*., 2011; Sobrinho *et al.*, 2012; Silveira-Neto *et al*., 2015). Porém, tem-se observado uma baixa concordância entre

os resultados desses testes (Vides *et al*., 2011; Sobrinho *et al*., 2012. Para comprovação final no diagnóstico da ocorrência ou não de anticorpos anti *Leishmania* sp. no homem, o teste padrão ouro mundialmente indicado é a RIFI. Enquanto, que o ELISA (*Enzyme Linked Immunossorbent Assay*) é utilizado principalmente para detecção de anticorpos, quando se deseja realizar um levantamento soroepidemiológico prático, menos oneroso e rápido. É sabido que a RIFI apresenta maior grau de especificidade, enquanto o ELISA apresenta maior grau de sensibilidade (Tavora *et al.*, 2007). O ELISA é o método mais utilizado no sorodiagnóstico da LVC. Sendo especialmente usado em análises laboratoriais ou aplicações em campo para a triagem de muitas amostras em curto período, sendo de execução simples e facilmente adaptável a vários antígenos como proteínas totais brutas, proteínas purificadas, peptídeos sintéticos definidos e proteínas recombinantes (Maia *et al.,* 2008). A sensibilidade e a especificidade dependem do antígeno usado. Normalmente é realizado com o antígeno solúvel bruto. A sensibilidade varia de 80 a 100% (Sundar, 2002).

Segundo Asfaram e colaboradores (2019), vários estudos epidemiológicos demonstraram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em soros felinos por meio de diferentes técnicas como RIFI, ELISA ou WB. Contudo, recomenda-se a PCR, preferencialmente sobre outros testes de diagnóstico, especialmente quando as amostras de sangue e outras amostras clínicas tiverem uma baixa carga parasitária. No entanto, pouco se sabe sobre o seu desempenho diagnóstico em gatos com leishmaniose.

Dessa forma, o método laboratorial de diagnóstico sorológico de LF mais comum relatado nas pesquisas foi a RIFI (38,5%) e o ELISA, todavia em áreas endêmicas para *Trypanosoma* spp. e ou *Leishmania* spp., devem ser tomadas precauções devido ao risco de reações cruzadas com *L. Infantum* durante a interpretação dos testes sorológicos. A diversidade genética das cepas do *T. cruzi* é um ponto relevante a ser considerado, uma vez que o parasita foi classificado em sete linhagens principais ou Unidades de Tipagem Discretas (UTD). Estudos recentes conduzidos no sul dos Estados Unidos ressaltam uma ampla variedade de UTD do parasita circulando entre vetores e diversos hospedeiros, incluindo seres humanos. Notavelmente, cães de abrigo foram identificados como portadores de DTUs dos parasitas TcI, TcII, TcIV e TcV. Como já mencionado, essa diversidade de parasitas

pode ter implicações significativas tanto no que se refere à realização de testes diagnósticos, quanto ao desenvolvimento clínico da infecção (Dumonteil *et al.*, 2021).

De acordo com Torres-Garcia e colaboradores em 2022 a sorologia pode ser útil como teste de diagnóstico de primeira linha para LF, e que um título positivo de 1:40 pode ser um ponto de corte adequado para o diagnóstico de leishmaniose em gatos doentes e com suspeita de leishmaniose. Assim, é necessário atenção antes de confirmar leishmaniose felina com o teste de RIFI, uma vez que alguns gatos podem ser sintomáticos para leishmaniose, mas são considerados negativos pelo RIFI, quando isso acontecer, esses animais deverão ser submetidos a outros testes sorológicos ou ferramentas diagnósticas complementares como WB e PCR (Asfaram *et al*., 2019).

O método sorológico mais utilizado nos estudos foi o RIFI, seguido do ELISA, e do teste de aglutinação direta, sendo apenas um trabalho realizado com esta última técnica. O ponto de corte de 1:40 é usualmente adotado para a RIFI em trabalhos realizados no país (Bezerra *et al*., 2019). Em um estudo realizado por Sousa (2017) afirmou que o ponto de corte estabelecido para a RIFI geralmente é 1:40, mas alguns animais nesse estudo apresentaram titulações de até 1:280, o que pode representar a infecção ativa. Apesar disso, vale ressaltar que até o momento não há um consenso em relação a esse valor para LV em felinos (Bezerra *et al*., 2019).

Em uma pesquisa realizada por Leonel *et al*. (2020) foi investigada a prevalência de *Leishmania* spp. em gatos, por meio de um estudo epidemiológico transversal, usando métodos sorológicos e moleculares. Esses gatos eram oriundos de abrigos de proteção animal no município de Ilha Solteira no estado de São Paulo. Nesse estudo, observou-se que os testes sorológicos obtiveram 29,79% dos gatos soropositivos para *Leishmania* spp. de acordo com a Imunofluorescência Indireta e 31,91% com o ELISA. Nessa pesquisa o ELISA foi capaz de detectar mais gatos como soropositivos para *Leishmania* spp*.,* destacando-se que pode ser mais sensível que a Imunofluorescência indireta.

O ELISA é também empregado no diagnóstico da LV; no entanto, os resultados podem divergir quando comparados com outras técnicas, o que sugere que ele deve ser complementado por outras técnicas parasitológicas e/ou moleculares. Os métodos de diagnóstico imunológico recomendados englobam a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) com ponto de corte de 1:80, ELISA, ensaio de imunotransferência em

WB, no qual deve ser identificada a presença de uma banda de 18 kDa, e o teste de aglutinação direta (TAD) com ponto de corte de 1/800 (Abramo *et al*., 2021).

O immunoblotting, também conhecido como WB, é um ensaio imunoenzimático semelhante ao ELISA, mas com uma fase sólida diferente. A análise de WB permite identificar antígenos de *Leishmania* com sensibilidade e especificidade superiores ao ELISA e ao RIFI. Nesse método, a superfície da membrana é utilizada como suporte, em vez de uma placa de poliestireno. O teste é valioso para a caracterização de frações antigênicas imunodominantes e a identificação da reatividade específica dos anticorpos detectados em testes de triagem que utilizam múltiplas frações antigênicas, como testes confirmatórios ou suplementares (Passos *et al*.,2012). Para realizar o immunoblotting, é necessário obter uma membrana contendo as frações da mistura antigênica. As proteínas são separadas de acordo com o tamanho por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Após a separação, as frações são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde permanecem imobilizadas. Essa membrana é então utilizada como suporte para a detecção da interação antígeno-anticorpo (Passos *et al*., 2012).

Com base nos resultados de um estudo conduzido por Rivas *et al*. (2018) observa-se que o WB possibilita a detecção das fases iniciais da infecção em gatos que aparentam estar saudáveis, mesmo quando os níveis de anticorpos são negativos, como indicado pelos resultados de ELISA ou PCR. Além disso, é importante ressaltar que o WB parece ser a técnica sorológica mais adequada para a análise de gatos tanto doentes quanto aparentemente saudáveis, conforme já relatado em estudos anteriores com gatos europeus.

Em um estudo que comparou as técnicas de RIFI, ELISA e WB no diagnóstico da LTA, foi constatado que o WB apresentou uma sensibilidade de 100% e demonstrou ser útil na identificação de portadores assintomáticos da doença. Além disso, esse teste também se mostrou eficaz no estabelecimento de diagnósticos diferenciais entre a LC e outras doenças, como Doença de Chagas, Paracoccidioidomicose e Toxoplasmose, que podem gerar reações cruzadas. Além de detectar baixos níveis de anticorpos, o immunoblotting é capaz de identificar animais que são portadores assintomáticos da leishmaniose visceral americana e pode ser utilizado como um exame de controle para confirmar a presença da doença por meio do ELISA indireto (Passos *et al*., 2012).

A identificação precisa de *Leishmania* spp. é crucial para o diagnóstico, tratamento e manejo da doença. No entanto, nem sempre é uma tarefa fácil, pois requer o uso de técnicas moleculares avançadas, como fusão de alta resolução ou análise de marcadores específicos, para obter resultados mais precisos (Foroughi-Parvar *et al*., 2021).

2.7.2 Métodos Moleculares

A técnica molecular, como a PCR, permite a identificação do DNA do parasita e pode ser realizada a partir de amostras de vários tecidos infectados, como sangue total, aspirado de órgãos hematopoiéticos, como linfonodos, medula óssea, baço e fígado, e células conjuntivais. Para reduzir os resultados falso-negativos é aconselhado fazer a PCR de múltiplos tecidos do animal suspeito (Chatzis *et al*., 2014).

Em 2020, Leonel e colaboradores realizaram um estudo, no qual observou através do diagnóstico de LF por PCR que todas as amostras do estudo foram positivas para a *β-actina* gene endógena, confirmando a boa qualidade no processo de extração de DNA a partir das amostras de sangue e swab conjuntival. No entanto, nenhum gato foi positivo para PCR, evidenciando assim os resultados negativos na PCR em gatos soropositivos. Dessa forma, resultados sorológicos e moleculares obtidos no mesmo momento podem ser discrepantes, devido às diferentes performances (sensibilidade e especificidade) entre elas. A sensibilidade de cada técnica pode variar ao longo da evolução da doença e entre indivíduos. Portanto, uma combinação de testes sorológicos e moleculares pode ser necessária para diagnóstico mais preciso (Silveira-Neto *et al*., 2015). Vários levantamentos epidemiológicos através de técnicas moleculares para detecção de *Leishmania* spp. em gatos foram realizados com amostras de sangue (Pennisi *et al*., 2015).

Nos cães, sabe-se que a PCR oriunda de amostras de sangue não é a melhor opção para o diagnóstico de LCan (Leonel *et al*., 2020). Esse fato poderá ser verdadeiro também para os gatos, mas ainda não está claro, uma vez que não há consenso sobre o melhor órgão e tecido para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em felinos por métodos moleculares (Silveira-Neto *et al*., 2015; Asfaram *et al*., 2019). De fato, há dados limitados sobre diagnóstico molecular na população felina com

tecidos (linfonodo, medula óssea, pele) ou amostragem não invasiva (swab conjuntival ou zaragatoas orais) (Leonel *et al*., 2020). Em um estudo realizado por Rocha *et al*., (2019) a PCR seguida do sequenciamento e amplificação mostraram três amostras positivas para o gene da quitinase e seis positivas para o gene ITS-1 (Rocha *et al*., 2019).

Contudo, é importante ressaltar que parasitemias intermitentes são uma ocorrência bastante provável em gatos, conforme já relatado em estudos com cães. Portanto, a PCR do sangue pode não apresentar uma sensibilidade elevada nesse contexto. A carga parasitária identificada no sangue dos gatos investigados demonstrou uma considerável variação, com uma correlação limitada em relação aos níveis de anticorpos. Diante desses resultados, as descobertas sugerem que a detecção da LC em felinos na América do Sul pode requerer a utilização de mais de uma técnica para garantir resultados precisos (Rivas *et al*.,2018).

2.7.3 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico não é considerado como um método de diagnóstico de rotina, pois exige apoio laboratorial para a infecção dos flebotomíneos. No entanto, essa técnica pode ser empregada para abordar certas questões epidemiológicas, especialmente aquelas relacionadas à condição clínica do animal associado ao nível de infectividade, mesmo após tratamento (Marodin, 2011).

A transmissão do parasito de um gato infectado para o flebotomíneo já foi confirmada por xenodiagnóstico (Campriger *et al*., 2019). Um dos primeiros relatos de possível transmissibilidade *de L. infantum* de um gato doméstico para flebotomíneos através de xenodiagnóstico, ocorreu na Itália (Marolli *et al*., 2007), e no Brasil (Silva *et al*., 2010), assim o gato doméstico é considerado um reservatório em potencial de LV em sítios endêmicos.

Dessa forma, Mendonça *et al*. (2020) realizaram xenodiagnóstico em 12 gatos infectados *por L. (L.) infantum*, dos quais 8 animais foram capazes de transmitir o parasita ao vetor. Os gatos que transmitiram manifestaram sinais clínicos como: aumento de linfonodos, alopecia e lesões de pele, sendo, pois, os sinais mais frequentes nos gatos infectados. Nessa mesma linha, Dantas-Silva (2019), estudou por xenodiagnóstico 5 felinos domésticos infectados por *L. infantum* com

sintomatologia característica de LF, contudo, não visualizou as formas flageladas nas fêmeas examinadas em nenhuma das duas réplicas do protocolo de xenodiagnóstico. Contudo, percebeu que 100% das fêmeas, que se alimentaram de cada gato, ficaram ingurgitadas. Concernente aos estudos que investigam os hábitos alimentares dos flebotomíneos através de métodos sorológicos, no Brasil, não foi provado repasto sanguíneo de fêmeas *de L. longipalpis* em gatos no perídomicílio (Dias; Lorosa; Rebelo, 2003). Através do uso de técnicas moleculares, as fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos comumente relatadas são: galinhas, cães, ratos domésticos e os humanos (Carvalho *et al*., 2017).

Dessa forma, foram obtidos resultados usando *L. longipalpis* para xenodiagnóstico de *L. infantum* e vários estudos em gatos nas diferentes partes do mundo revelando a presença de *L. infantum* através do isolamento, detecção de ácidos nucleicos e testes sorológicos (Rocha *et al*., 2019). Por conseguinte, na Espanha, foi encontrado DNA de gato dentro do intestino de fêmeas de *Phlebotomus perniciosus* pela amplificação do citocromo B do felino (González *et al*., 2015). Em gatos estes estudos ainda são incipientes (Ribeiro *et al*., 2008; Borja *et al.*, 2016; Mendonça *et al*., 2017). Em uma pesquisa realizada por Mendonça *et al*. (2020) notaram que os gatos infecciosos aos flebotomíneos manifestaram sinais clínicos característicos da doença e eram positivos pela citologia de medula óssea. De fato, *Phlebotomus perniciosus e Lutzomyia longipalpis*, vetores comprovados de *L. infantum*, foram encontrados infectados após alimentar-se respectivamente de um único gato doente com leishmaniose (Pennisi; Persichetti, 2018).

2.8 Aspectos imunológicos da leishmaniose felina

Em todas as espécies hospedeiras, os macrófagos desempenham uma função crucial no controle da infecção por *Leishmania*. Citocinas como IFN-γ, IL-2 e TNF-α, que são liberadas por células T ativadas, estimulam os macrófagos a destruírem os amastigotas intracelulares de *Leishmania*. A presença de macrófagos infectados por *Leishmania* geralmente desencadeia uma reação inflamatória granulomatosa (Baneth *et al*., 2008). Em cães e gatos, a hiperplasia linfóide é o padrão citológico mais comumente observado (Solano-Gallego *et al*., 2011; Pennisi *et al*., 2015). Uma resposta imunológica excessiva de anticorpos está associada a doenças mais graves

e pode resultar na deposição de complexos imunes nos rins, causando glomerulonefrite e subsequente desenvolvimento de doença renal crônica (Baneth *et al*., 2008; Solano-Gallego *et al*., 2009).

Do ponto de vista imunológico a resposta imune espécie-específica pode gerar uma proteção natural dos gatos contra a infecção por *Leishmania* spp., tornando-os pouco sintomáticos na ausência de outra doença ou em um estado de imunossupressão, por evidenciar baixos títulos de anticorpos e sinais estereotipados, não característicos. Dessa forma, os baixos títulos de anticorpos contra *Leishmania* spp. observados nos gatos têm sido comumente relacionados à capacidade destes animais em gerar anticorpos específicos contra um agente patogênico presente no seu meio, sem manifestar a enfermidade (Attipa *et al*., 2017; Piraja *et al*., 2013). Por outro lado, doenças imunossupressoras como FIV (Vírus da imunodeficiência felina), FeLV, Vírus da Peritonite infecciosa felina, doenças autoimunes (pênfigos) e tumores (carcinoma espinocelular) podem funcionar a favor do parasita proporcionando a sua multiplicação (Garrido, 2012).

A disponibilidade de dados provenientes de infecções experimentais em gatos com *L. infantum* é significativamente limitada, com apenas dois estudos relevantes disponíveis. Além disso, esses estudos acompanharam os gatos infectados por um período relativamente curto, de apenas 16 semanas (Akhtardanesh *et al*., 2018) ou até 24 semanas (Kirkpatrick *et al*., 1984). Em Kirkpatrick *et al*. (1984), a soroconversão em gatos foi observada a partir da segunda semana após a infecção, enquanto, surpreendentemente, gatos infectados intraperitonealmente por Akhtardanesh *et al*. (2018) não apresentaram resultados positivos para anticorpos mesmo na semana 16. Não foram observados sinais clínicos ou laboratoriais significativos em nenhum desses dois estudos, com exceção da redução no hematócrito e da hiperproteinemia relatados por Akhtardanesh *et al.* (2018).

Ambos os estudos investigaram a presença de parasitas por meio de diferentes métodos, incluindo cultura de parasitas (Kirkpatrick et al., 1984) e PCR (Akhtardanesh *et al*., 2018). Kirkpatrick *et al*. (1984), usaram duas cepas distintas para suas infecções e conseguiram cultivar parasitas nas semanas um e dois, mas somente com uma das cepas. Eles também encontraram amastigotas em avaliações citológicas de baço, fígado, medula óssea e esfregaços de sangue, além de infecção em avaliações *post-mortem* de gatos infectados. Por outro lado, Akhtardanesh *et al*. (2018) não

identificaram amastigotas na histopatologia de linfonodos, medula óssea, baço ou fígado, mas observaram histiocitose sinusal moderada em dois gatos (Akhtardanesh *et al*., 2018). Com base nesses resultados, é possível sugerir que os gatos podem ser mais resistentes à infecção experimental por *L. infantum* em comparação com os cães. No entanto, não é possível excluir completamente a possibilidade de desenvolvimento de infecção crônica em gatos, dada a limitação do período de acompanhamento desses estudos.

Gatos que apresentam doença clínica associada a *L. infantum* exibem elevada parasitemia sanguínea, além de níveis de anticorpos variando de baixos a muito elevados, frequentemente acompanhados de hiperglobulinemia. Assim como observado em cães, gatos saudáveis que testam positivo na PCR para *Leishmania* podem apresentar resultados negativos nos testes de anticorpos anti-*Leishmania* (Pennisi *et al*., 2015).

Recentemente, foi demonstrado que, de maneira similar a outros hospedeiros, gatos expostos a áreas endêmicas para a doença desenvolvem respostas imunitárias adaptativas tanto humorais quanto mediadas por células em decorrência da infecção por *L. infantum.* Notavelmente, o interferon-gama (IFN-γ) específico foi detectado em 21% desses gatos, e todos eles apresentaram resultados negativos na PCR de *Leishmania* em amostras de sangue com EDTA, enquanto apresentavam resultados negativos ou limites nos testes de anticorpos (Priolo *et al*., 2019). No entanto, ainda não foi investigada a relação entre o padrão de resposta imune adaptativa e a gravidade da leishmaniose felina. Estudos de infecção com *L. braziliensis* indicaram que o desenvolvimento de lesões cutâneas geralmente precede a detecção de anticorpos, com a soroconversão ocorrendo durante a fase de cicatrização das lesões (Simões-Mattos *et al.*, 2005).

Nos gatos, acredita-se que ocorra ativação dos macrófagos para a destruição das formas amastigotas intracelulares. Embora títulos altos de anticorpos não resultem em imunidade contra a doença, gatos com alta titulação de anticorpos anti *Leishmania* apresentaram baixa positividade para a presença de DNA detectado através de PCR, aumentando a hipótese de que a resposta imune dos gatos é diferente da observada em cães, justificando o porquê dos gatos infectados podem não apresentar sinais clínicos (Teives, 2015).

O mecanismo da função imune felina contra a *Leishmania* ainda não está totalmente elucidado e muito do que se sabe é oriundo de estudos em humanos e cães. Quando comparado aos cães, os gatos são conhecidos por possuírem certo grau de resistência à *Leishmania*, resultando em uma menor prevalência ou desenvolvimento e manifestação de sinais clínicos característicos de leishmaniose nestes animais (Solano-Gallego *et al*., 2007; Akhtardanesh *et al*., 2018).

O desenvolvimento da doença é influenciado pelo perfil genético do hospedeiro, o que explica as diferenças na resposta imunológica dos cães e gatos (Nascimento *et al*., 2022). Nesse contexto, após a inoculação das formas promastigotas durante a hematofagia no hospedeiro vertebrado, há uma redução na participação dos macrófagos, que são responsáveis pela indução de citosinas pró inflamatórias como gama interferon (IFN-y) e interleucina 2 (IL-2), e o direcionamento da imunidade celular via T helper 2 (Th2), resultando em tolerância à infecção (Tomiotto-Pellisier *et al*., 2018). Acredita-se que nos cães, a resposta imune Th2 predominante é um dos fatores que determinam a suscetibilidade a patógenos (Solano-Gallego *et al*., 2016).

Segundo Torres-Garcia *et al*., (2022) nenhum estudo prospectivo controlado foi publicado sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da LF. Algumas investigações sugeriram que os gatos podem ter melhor resposta imune contra *L. infantum* porque a resposta Th2 desempenha um papel protetor, ou porque existem outros fatores em gatos soropositivos que podem controlar o desenvolvimento de leishmaniose patente, como a produção de níveis mais elevados de interferon gama, que desempenha um papel direto na regulação do desenvolvimento de células Th1.

Dessa forma, tanto os felinos clinicamente afetados quanto os aparentemente saudáveis podem estimular a imunidade mediada por células, embora os gatos clinicamente afetados apresentem maior produção de citocinas pró-inflamatórias (Priolo *et al*., 2019). Quanto aos anticorpos em felinos foi demonstrado que esses animais podem ser infectados, sendo encontradas as formas promastigotas no intestino médio do vetor, demonstrando capacidade do mesmo ser infectado por *L. infantum* durante a hematofagia em gatos (Marcondes *et al*., 2018; Berenguer *et al*., 2020; Silva *et al*., 2020). Esses relatos não apenas destacam a possibilidade de transmissão da doença de gatos para cães, mas também chamam a atenção para a possível transmissão de gatos para humanos. Baixos títulos de anticorpos em gatos

com diagnóstico parasitológico positivo indicam que os gatos podem não desenvolver uma resposta imune humoral intensa. O desenvolvimento da doença é influenciado pelo perfil genético do hospedeiro, o que explica as diferenças (Sobrinho *et al*., 2012).

Nesse contexto, algumas pesquisas relataram certa resistência natural à infecção por *Leishmania* em gatos, na ausência de outras doenças. De acordo com Latta *et al.*, (2019) as diferenças na função imune dos felinos, como a resposta imune mediada por Th1 mais eficaz, permite por muitas vezes a resolução espontânea das lesões, podendo desempenhar um importante papel para a redução dos sinais clínicos em gatos infectados, resultando assim em formas subclínicas, devido a isso, são raros os relatos de doença sintomática em felinos. Conforme Priollo *et al*., (2022), os gatos vadios são expostos à infecção por *L. infantum* em áreas endêmicas, de forma semelhante aos cães, sendo capazes de montar uma resposta imune anti-*Leishmania* humoral e mediada por células específicas como cães e podem contribuir para a endemicidade da infecção.

Apesar de existirem alguns estudos investigando a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas, não está bem definido se as baixas prevalências da infecção e da doença em gatos provenientes de áreas endêmicas são devidas as falhas na detecção de anticorpos ou porque os gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose (Pirajá *et al*., 2013). Contudo, os saberes sobre os aspectos imunológicos e fisiopatológicos ainda é limitado, tornando o diagnóstico um grande desafio (Silveira-Neto *et al*., 2015).

2.9 Tratamento e controle da leishmaniose felina

Cerca de metade dos gatos infectados por *Leishmania* spp. pode se recuperar espontaneamente, porém, os estudos sobre tratamentos específicos são limitados, e a real eficácia das terapias ainda é desconhecida (Martín-Sánchez *et al*., 2007). O tratamento é descrito em poucos casos, havendo relatos clínicos, nos quais apresentaram boa resolução e outros devido ao insucesso, optaram pela eutanásia do animal (Pirajá *et al*., 2013).

Embora um tratamento eficaz para gatos sintomáticos ainda não tenha sido estabelecido, a administração oral de alopurinol e aplicação de glucantima subcutânea têm sido frequentemente usadas como esquemas de quimioterapia em gatos afetados

por leishmaniose (Asfaram *et al*., 2019). Dessa forma, um estudo de revisão de literatura realizado por Torres-Garcia e colaboradores em 2022, observaram uma boa resposta clínica e sobrevivência prolongada em muitos gatos que receberam alopurinol como monoterapia a 10 mg/kg PO BID por pelo menos 6 meses.

A administração de alopurinol parece melhorar os sinais clínicos, mas ainda não está claro se pode causar recidivas como ocorrem em cães (Ahuir-Baraja *et al*., 2021). É recomendado o tratamento com alopurinol em doses de 10 mg/kg a cada 12 horas ou 20 mg/kg a cada 24 horas, por no mínimo 6 meses (Abramo *et al*., 2021). Outros tratamentos combinam o uso de alopurinol com antimoniato de meglumina, no entanto, alguns autores indicam que apenas o antimoniato de meglumina apresenta uma boa resposta clínica em gatos (Soares *et al*., 2016; Pennisi *et al*., 2013). Contudo, observou-se que o uso de antimoniais, como o antimoniato de meglumina, tem efeitos menores devido ao aumento da resistência de *Leishmania* spp. aos medicamentos, embora o mecanismo de resistência ainda não esteja completamente esclarecido (Tasbihi *et al*.,2020). Além disso, testes com flavonóides, como a fisetina, também foram conduzidos e parecem apresentar resultados promissores ao impedir o crescimento de promastigotas em cultura (Adinehbeigi *et al*., 2017).

Segundo Carneiro e colaboradores (2020) em um relato de caso, foi sugerido um tratamento com 10 mg/kg de azitromicina a cada 24h via oral por 28 dias consecutivos e 15 mg/kg alopurinol a cada 12h via oral por 60 dias. Além disso, o uso contínuo de colar repelente também foi recomendado (flumetrina; imidacloprida). O tratamento clínico de gatos com LF, ainda é baseado empiricamente e fora de rótulo, usando os medicamentos mais comuns prescritos para cães. A expectativa de vida de gatos com LF clínica geralmente é boa, a não ser que ocorram condições ou complicações simultâneas e o prognóstico não seja significativamente influenciado pela terapia ou coinfecção por doenças retrovirais (Pennisi; Persichetti, 2018).

É relevante destacar que alguns gatos convivem com a doença durante um longo período, o que geralmente resulta em uma expectativa de vida favorável para gatos com LF, a menos que ocorram condições concomitantes ou complicações, tais como doença renal crônica ou neoplasias, conforme mencionado por diversos autores (Pennisi *et al*., 2016; Pereira *et al*., 2019; Fernández-Gallego *et al*., 2020). Dois estudos, em particular, relataram uma média de sobrevivência de cinco e 17 meses em gatos tratados com diferentes protocolos (Pennisi *et al*., 2016; Fernández-Gallego

et al., 2020). A partir de uma avaliação retrospectiva que abrangeu 14 casos, verificou-se que os gatos sobreviveram por um período que variou de 1 a 72 meses após o diagnóstico, sendo que o tempo de sobrevivência não foi significativamente afetado pela terapia adotada ou pela coinfecção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) (Pennisi *et al*., 2016).

Os diagnósticos que resultaram em parasitológico positivo para LF apresentaram associação estatisticamente significante com o livre acesso às ruas, coabitação com cães acometidos anteriormente por LV e ausência de limpeza do quintal e coleta de lixo (Rocha *et al*., 2019). Dessa forma não há nenhuma substância específica para o tratamento de felinos infectados com *Leishmania* spp., tampouco procedimentos que auxiliem no controle e profilaxia direcionados a esses animais (Noé *et al*., 2015; Noé; Babo-Terra, 2016). Contudo, vale ressaltar a importância das medidas de prevenção contra a infecção, tendo em vista que qualquer animal saudável que viva ou visite áreas endêmicas necessita de proteção (Gramiccia, 2011).

Assim é aconselhado incluir a aplicação de métodos de diagnóstico sensíveis, o uso de coleiras inseticidas e a pulverização com princípios eficazes. Sendo assim, os agentes mais utilizados são: deltametrina, lambda cialotrina, alfa cipermetrina, cipermetrina, ciflutrina, beta-ciflutrina (Gramiccia, 2011).

Há também os colares de liberação lenta com duração de vários meses, sendo uma opção prática para a proteção dos animais contra os vetores de *Leishmania* spp. Alguns autores recomendam o uso de piretróides para repelir os flebotomíneos, todavia esses agentes não são indicados para a espécie felina devido a sua toxicidade, mas a coleira impregnada com flumetrina e imidacloprida é considerada uma opção confiável (Noé *et al*., 2015; Brasil, 2006). Portanto, a proteção das populações felinas é provavelmente necessária para uma estratégia visando o controle regional da infecção por *L. infantum* (Pennisi; Persichetti, 2018).

3 OBJETIVOS

3. 1 Objetivo geral

- Realizar uma investigação exploratória com o intuito de identificar a existência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos domésticos (*Felis catus*) na região de Natal/RN.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar um ensaio sorológico ELISA *in-house* com o objetivo de determinar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em amostras de soros de gatos domésticos;

- Realizar exame clínico de uma amostragem de gatos provenientes da cidade de Natal e da sua área metropolitana, com o propósito de avaliar a presença de sintomas relacionados à leishmaniose felina;

- Realizar uma avaliação abrangente dos potenciais fatores de risco e epidemiológicos vinculados à infecção por *Leishmania* spp. em gatos domésticos que foram capturados na cidade de Natal, no estado do Rio Grande do Norte;

4 MATERIAL E MÉTODOS

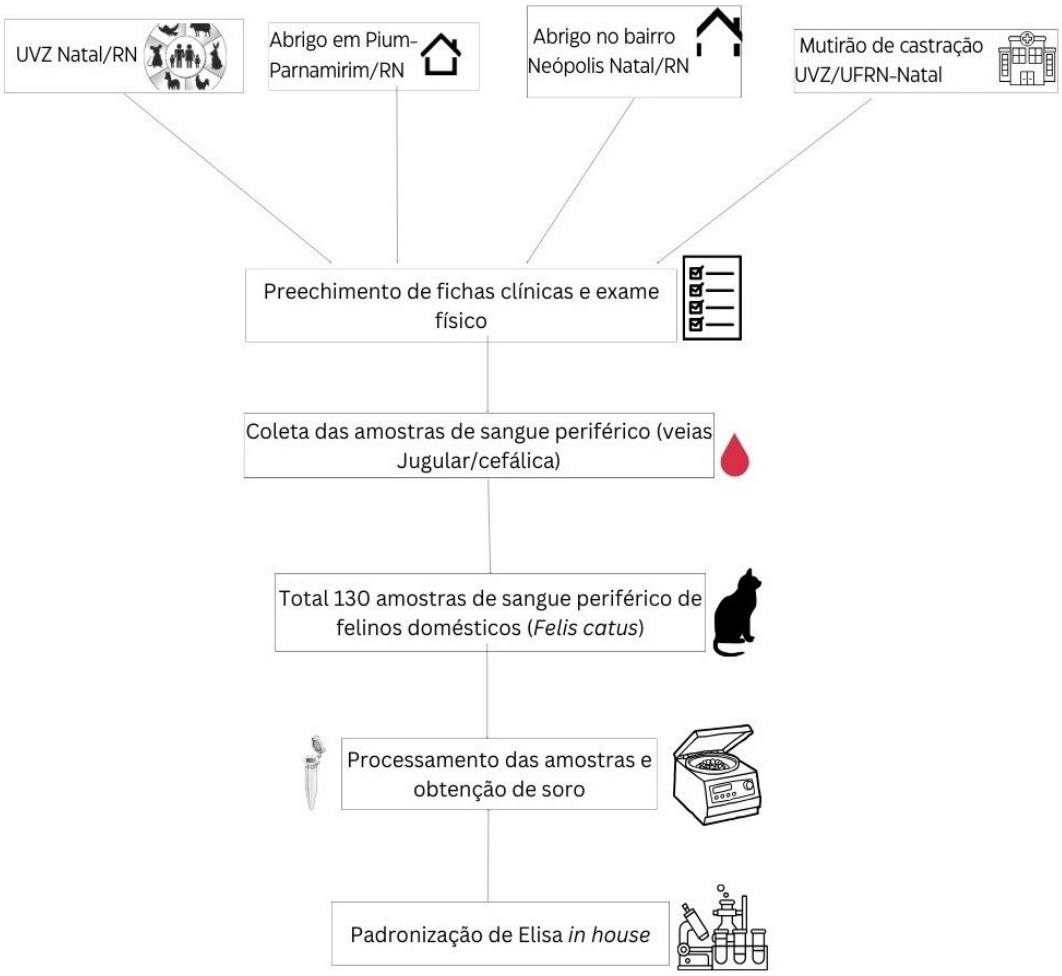
3.1 Área de estudo e aspectos éticos

A fase de coleta da população amostral foi realizada no período de setembro a dezembro de 2022 no município de Natal e Parnamirim, no estado do Rio Grande do Norte. A inclusão no estudo baseou-se nos gatos participantes do projeto de extensão Animais e Comunidade da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), coordenado pelo prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes em parceria com a UVZ/Natal. Os critérios de inclusão para os gatos nesse estudo foram: ter pelo menos 6 meses de idade e contar com autorização (Termo de Livre consentimento – TLC), mediante assinatura do tutor, quando os gatos possuíam responsáveis (APÊNDICE A). Os critérios de exclusão foram: peso corporal inferior a 2 kg e/ou comportamento irascível durante o manuseio. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRN, protocolo 030/22 (ANEXO A).

3.2 A obtenção dos soros dos gatos envolvidos no estudo

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 130 gatos (número estimado por conveniência, sendo 51 fêmeas e 79 machos), dentre domiciliados, abrigados, contudo, a maioria eram animais errantes, independente de raça e sexo. As amostras de sangue periférico, obtidas das veias jugular ou cefálica, foram coletadas e armazenadas em tubos sem EDTA para permitir a coagulação e posterior obtenção do soro. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 RPM por 10 minutos utilizando uma centrífuga Compact, modelo EBA 20. Após essa etapa, os soros foram fracionados e armazenados em tubos de eppendorf, sendo mantidos a -20°C até o momento de sua utilização. Observa-se o fluxograma na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da obtenção de amostras de sangue dos felinos domésticos na área de Natal e região Metropolitana (Parnamirim).



Fonte: Autoria própria (2023).

3.3 Determinação de anticorpos IgG total anti *Leishmania* em amostras de soros de gatos domésticos

3.3.1 Cultivo dos parasitas e obtenção do extrato protéico total de *Leishmania* infantum

A linhagem de *L. infantum* foi obtida por meio de aspiração citológica com agulha fina em um linfonodo de um cão e foram mantidos por passagens sucessivas em camundongos BALB/c. As formas promastigotas de *L. infantum* foram mantidas em meio de cultura Schneider's Drosophila (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Donato, 2020).

As formas promastigotas da espécie *L. infantum* criopreservadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas à temperatura ambiente e, em seguida, os parasitas foram centrifugados a 1800×g por 10 minutos, visando separar os parasitas do criopreservante (DMSO) utilizado na conservação da viabilidade do parasita. Resumidamente, os parasitas foram cultivados em meio RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute), adicionando-se 10% de soro fetal bovino (FBS) como suplemento.

Nesse estudo, o cultivo teve início com a adição de 1 mL da cultura pré-estabelecida e 5 mL do meio em uma garrafa de 25 cm² na estufa de Biochemical Oxygen Demand (BOD) a uma temperatura de 28ºC ± 2. A manutenção do cultivo celular foi realizada a cada 2-3 dias, incluindo a alteração do pH do meio quando necessário, detectada pela mudança da cor do meio de rosa para amarela. Os líquidos sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram submetidos a três lavagens com tampão fosfato salino (PBS) por meio de centrifugação a 3000 ×g a 4ºC por 10 minutos cada. Após as lavagens, os sedimentos foram ressuspendidos em PBS e em seguida passaram por um processo de lise mecânica que consistiu em seis ciclos de congelamento (-20ºC) e descongelamento por 5 minutos cada. O descongelamento foi realizado em um agitador vortex à temperatura ambiente. Foi adicionado um inibidor de protease (complete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack - Roche) com a finalidade de proteger as proteínas da degradação por proteases.

Os extratos foram então submetidos à quantificação proteica e as amostras foram armazenadas a -20ºC até o momento de utilização (Donato, 2020). A quantificação das proteínas nos extratos preparados foi realizada por meio do Método de Bradford, utilizando placas da marca Brand plates® - pureGrade™. O método de Bradford (Lowry *et al*., 1951) é baseado na interação entre o corante "*Coomassie brilliant blue*" BG-250 e macromoléculas de proteínas que possuem aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. As densidades ópticas foram medidas utilizando um leitor de microplacas (BioTeK Epoch, Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek) com um comprimento de onda de 570 nm (Donato, 2020). A equação da reta foi determinada e utilizada para estimar a quantificação proteica do extrato de *L. infantum*, no qual se obteve uma concentração de 0,42 mg/ml.

3.3.2 Otimização do ensaio imunoenzimático (ELISA) para a determinação de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* em gatos domésticos

Durante a primeira etapa deste estudo, foi desenvolvido um ELISA *in house*, para determinar a presença de anticorpos IgG total em amostras de soros de gatos domésticos com suspeita clínica de leishmaniose. A metodologia utilizada para determinar os anticorpos *anti-L. infantum* foi baseada na otimização de um ensaio de ELISA indireto, anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa para determinar a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em camundongos (Querido, 2013).

Resumidamente, foram utilizadas microplacas de 96 poços (Nunc-ImmunoMicroWell, EUA) nas quais, o extrato protéico total de promastigotas de *L. infantum* foi adsorvido (50ng/poço) em tampão bicarbonato 0,1M, pH 8,5 (*overnight* à 4°C). Em seguida, as microplacas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 20 a 0,05% v/v) e bloqueadas com leite em pó desnatado a 1% (m/v) em PBS por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas cinco vezes e as amostras de soros dos animais, em diferentes diluições (1/100, 1/200, 1/400, 1/800) em tampão anticorpo (PBS; Tween; leite) foram adicionadas às placas e depois incubadas por uma hora à temperatura ambiente. A seguir realizou-se cinco novas lavagens e o anticorpo anti-IgG total de gato conjugado com a enzima peroxidase (anti-cat IgG – Jacksonimmuno, EUA) foi adicionado às placas. As placas foram incubadas por mais uma hora, seguidas por lavagens adicionais. Por fim, as placas foram secas e o substrato tetrametilbenzidina (Sigma Aldrich) foi adicionado, e a reação final foi determinada pela absorbância a 490nm usando um espectrofotômetro (Epoch, BioTek Instruments-Winooski-VT, EUA).

3.4 Análise estatística

Construiu-se um banco de dados contendo a identificação dos animais, sintomas clínicos, além da sororeatividade para anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp. determinada pelo ELISA *in house*. O software utilizado foi o Prism 8.0 para Windows, desenvolvido pela GraphPad Software, Inc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das amostras biológicas e população amostral

Uma população amostral de 130 felinos domésticos foi submetida a uma avaliação clínica e exame físico para verificar possíveis sinais clínicos de LF (APÊNDICE B). Os gatos domésticos utilizados no estudo foram provenientes de diversos setores da região metropolitana de Natal. As primeiras 11 amostras de sangue periférico foram obtidas na Unidade de Vigilância e Zoonoses de Natal (UVZ), sendo esses animais originários dos seguintes bairros de Natal: Lagoa Azul, Felipe Camarão, Nossa Senhora da Apresentação e Bairro Nordeste. Essas regiões são conhecidas por serem endêmicas para LV humana e LVCan (Barbosa, 2013; Fernandes, 2022).

Outra amostragem de gatos domésticos foi obtida de um abrigo de animais localizado em Pium (distrito litorâneo) do município de Parnamirim, Rio Grande do Norte, situado a 14 km ao Sul-Oeste de Natal. Nesse abrigo, havia uma população de aproximadamente 137 felinos (*Felis catus*), além de setenta e quatro cães (*Canis lupus familiaris* L., 1758), dois cavalos (*Equus caballus*) e seis asno-domésticos (*Equus asinus*) (Figura 6). O ambiente apresentava uma vegetação exuberante (área rural), com terrenos baldios próximos, que acumulavam resíduos e matéria orgânica diversa, criando um ambiente propício para a alimentação sanguínea dos flebotomíneos, conforme relatado por Carvalho *et al*., 2017; Carneiro *et al*., 2020; Pirajá *et al*., 2013. Do abrigo em Pium, foram coletadas 37 amostras de sangue de gatos, utilizando os critérios de inclusão: gatos com peso corporal superior a 2 kg e/ou comportamento permissível durante o manuseio.

Além disso, outra parte amostral utilizada neste estudo foi proveniente do bairro Neópolis, em Natal-RN, de um abrigo exclusivamente dedicado a gatos e localizado próximo a terrenos baldios. Nesse abrigo, foram coletadas sete amostras, uma vez que os animais eram ferais, ou seja, tinham pouco ou nenhum contato com seres humanos. O restante da população amostral, composta por 74 animais, foi obtida por meio do mutirão de castração realizado pelo projeto de extensão Animais e Comunidade da UFRN, em parceria com o UVZ Natal. Essas amostras do mutirão incluíram os felinos errantes provenientes do abrigo mencionado no bairro Neópolis,

bem como gatos que habitavam o campus central da UFRN e outros provenientes de diversos bairros de Natal. Portanto, a amostra populacional deste estudo foi composta por 10 gatos provenientes da UVZ Natal, 37 gatos originários do abrigo em Pium, 7 gatos do abrigo no bairro Neópolis e 76 gatos provenientes do mutirão de castração realizado pela UVZ em parceria com o projeto Animais e Comunidade da UFRN (ver figura 5).

Figura 6 - Abrigo de animais em Pium (distrito litoral), Parnamirim-RN.

Fonte: Arquivo pessoal (2022).

4.2 Determinação do quadro clínico da população felina estudada

Durante a avaliação clínica, foram preenchidas fichas para cada gato (população total de 130) e observados os sintomas clínicos apresentados, com foco especial nas lesões de pele, que são características para o diagnóstico de LF. Referente a idade, os gatos participantes desse estudo eram adultos (maiores de 6 meses), uma vez que a idade foi frequentemente considerada um fator de risco para a positividade para *L. infantum* (Latta *et al*.,2020).

Referente aos achados clínicos, do total de 130 gatos domésticos avaliados neste estudo, 96 foram assintomáticos (73,85%).

Nesse estudo as manifestações clínicas mais presentes foram dermatológicas, dentre elas dermatite diversas, com presença de alopecia, crostas e seborréia, leões cutâneos e mucocutâneas. As manifestações clínicas frequentes da doença, conforme já relatado, englobam principalmente lesões cutâneas e mucocutâneas, podendo ocorrer com ou sem sinais de acometimento visceral (Pennisi *et al*., 2015; Dalmau *et al*., 2008; Fernandez-Gallego *et al*., 2020).

Além disso, devido ao convívio em aglomerações de gatos, alguns felinos participantes desse estudo apresentavam sintomas clínicos respiratórios, levantando suspeitas de rinotraqueíte, clamidiose e outros com sintomas clínicos sugestivos de FIV/FELV, porém devido a algumas limitações não foi possível realizar a testagem desses animais. No Quadro 1, é possível verificar as principais manifestações clínicas dos felinos domésticos que demonstraram potencial reatividade sorológica (n = 48) no ensaio de ELISA *in house* para anticorpos IgG totais anti-*Leishmania* spp. Dessa forma, constatou-se que 29,17% (14/48) desses animais apresentaram sintomas clínicos. Os gatos que apresentaram sororeatividade para anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. no teste de ELISA manifestaram os mesmos sintomas clínicos já descritos para a LF, os quais incluíam diferentes lesões cutâneas e mucocutâneas, como ulcerações e crostas (Pennisi *et al*., 2015).

Em particular, o animal P80 (Figura 7), que foi sorologicamente reativo para IgG total anti-*Leishmania* sp. no teste de ELISA *in house* e foi atendido durante o mutirão de castração, apresentou lesões crostosas e úlcera na região da boca e plano nasal. Os sinais clínicos da LF são inespecíficos e semelhantes aos observados em outras doenças como a criptococose e a esporotricose, comumente encontradas em gatos (Souza *et al*., 2005). Conforme a literatura, a cabeça, especialmente o pavilhão auricular e o focinho, são as áreas mais afetadas, possivelmente devido à capacidade dos flebotomíneos de picar áreas com menos pelos (Simões-Mattos *et al*., 2004; Silveira-Neto *et al*., 2015).

Além disso, também foi coletado um swab nasal desse animal para o diagnóstico citopatológico de esporotricose. O exame revelou a presença abundante de estruturas leveduriformes, o que indica um diagnóstico presuntivo de esporotricose. No Brasil, em algumas regiões, a Leishmaniose tegumentar americana deve ser

distinguida da esporotricose, que se manifesta como uma zoonose que afeta principalmente gatos, cães e seres humanos (Schubacha *et al*., 2004).

Assim, os gatos que desenvolvem leishmaniose, frequentemente são suspeitos de ter a imunidade prejudicada devido a comorbidades. Uma vez que muitos dos sinais clínicos observados em gatos infectados podem ser atribuídos a comorbidades, torna-se essencial buscar diferenciar as anormalidades clínico-patológicas que são resultantes da LF. De fato, é importante destacar que essas coinfecções podem estar presentes em aproximadamente 10% dos gatos infectados por *L*. *infantum* (Latrofa *et al*., 2020). Essa correlação foi mencionada por Torres-Garcia *et al*. (2022), que observaram o estado de comorbidade em uma população total de 53 gatos, sendo que 35 (66,0%) apresentavam comorbidades. Dentre os 35 gatos avaliados com comorbidades, 22 (62,9%) tinham apenas uma comorbidade, enquanto 13 (37,1%) apresentavam duas ou mais.

Figura 7 - Animal P80 sorologicamente reativo para anticorpos IgG anti *L. infantum* no Elisa *in house*.

Fonte: Arquivo pessoal (2022).

É importante ressaltar que a presença de animais assintomáticos com sorologia IgG positiva pode ser explicada pela maior resistência natural inerente aos felinos contra o protozoário (Akhtardanesh *et al*., 2018; Pennisi *et al*., 2013). No que diz

respeito aos gatos assintomáticos, é importante destacar que as infecções subclínicas por *L. infantum* são mais prevalentes do que as infecções clínicas em populações de gatos em áreas endêmicas. Devido à limitação de sensibilidade dos métodos sorológicos para detectar infecções subclínicas, é recomendável a combinação de pelo menos dois resultados positivos, obtidos por meio de técnicas moleculares e sorológicas, a fim de obter uma estimativa mais precisa da infecção por *Leishmania*. (Alcover *et al*., 2021).

Quadro 1 - Manifestações clínicas dos gatos domésticos potencialmente sorologiamente reativos (n = 48) no ELISA *in house* para anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp.

Animal	Sexo	Sintomas clínicos
P9	M	Dermatite: alopecia, crostas e seborréia
P10	F	Demiatite: alopecia
P11	M	Inflamação do olho esquerdo, secreção e espirros
P13	F	Assintomático
P23	M	Dermatite, alopecia, lesão ocular
P24	F	Dermatite e presença de ectoparasitas
P25	M	Dermatite e presença de ectoparasitas
P32	M	Assintomático
P35	F	Assintomático
P38	F	Dermatite, lesão na base da orelha esquerda
P40	M	Assintomático
P41	F	Assintomático
P43	F	Assintomático
P44	F	Assintomático
P45	M	Assintomático
P46	M	Dermatite, alopecia nas patas
P47	F	Dermatite, alopecia
P48	M	Assintomático
P49	F	Assintomático
P50	F	Assintomático
P53	M	Dermatite, ferida na regiao do rabo
P54	M	Assintomático
P55	F	Assintomático
P56	F	Assintomático
P57	M	Assintomático
P61	M	Assintomático
P62	F	Assintomático
P64	M	Assintomático
P66	M	Assintomático
P68	M	Assintomático
P76	F	Assintomático
P77	F	Dermatite, crostas e alopecia

P78	M	Assintomático
P79	M	Assintomático
P80	F	Dermatite, crostas, seborréia, alopecia, úlceras.
P82	M	Dermatite, lesão nasal, crostas, seborréia
P83	M	Assintomático
P91	M	Assintomático
P92	F	Assintomático
P99	F	Assintomático
P114	F	Assintomático
P116	F	Assintomático
P118	F	Dermatite, crostas, seborreia, lesão ocular
P119	M	Assintomático
P125	F	Assintomático
P127	F	Assintomático
P128	M	Assintomático
P130	F	Dermatite, crostas, seborreia, alopecia

Fonte: Dados da pesquisa. **Legenda:** F: fêmea; M: macho.

Ademais, pode ocorrer resultados falsos-positivos devido à reação cruzada com *Toxoplasma* spp., *Trypanosoma* spp. e *Ehrlichia spp*. (Chatzis *et al*., 2014; Noé *et al*., 2015). Sabe-se pouco acerca da a infecção por *T. cruzi* em gatos. Relatos indicam uma soroprevalência de infecção de cerca de 30% em populações de gatos domésticos no México e na Argentina. Nos Estados Unidos, um estudo no sul do Texas identificou 11,4% de gatos soropositivos, porém apenas 1,8% apresentaram resultados positivos no teste de PCR para *T. cruzi*. Análises das refeições de sangue dos triatomíneos sugerem que no Texas e Louisiana, entre 2% e 6% das refeições de sangue são realizadas em gatos (Dumonteil *et al*., 2021).

A análise dos sintomas clínicos, também permitiu observar, conforme apresentado no Quadro 2, as manifestações clínicas dos gatos domésticos potencialmente sorologicamente não reativos (n = 11) para *Leishmania spp*. no teste ELISA *in house*. Nessa população, apenas 9,09% dos animais apresentaram sinais clínicos. O animal P7 foi o único a manifestar sintomas, incluindo: alopecia, lesão ocular, úlceras, lesões cutâneas na cabeça, membro anterior esquerdo e cauda.

Por fim, no Quadro 3, são apresentadas as manifestações clínicas dos gatos domésticos potencialmente inconclusivos sorologicamente (n = 72) no teste ELISA *in house* para anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. Dentre esses animais, 26,39% (19/72) manifestaram sintomas clínicos. Especificamente, o animal P30, proveniente do abrigo de Parnamirim, apresentou uma lesão no plano nasal (Figura 8), com

suspeita clínica de esporotricose. Embora o isolamento de fungos do complexo Sporothrix schenckii em cultura micológica seja considerado o padrão-ouro no diagnóstico, a citopatologia por imprint das lesões é frequentemente utilizada na prática veterinária (Macêdo-Sales *et al*., 2018). Nesse caso, foi realizado um swab e o material foi colocado em lâminas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com azul de algodão e observadas em microscópio óptico na objetiva de 100x para verificar a presença de esporos fúngicos (Figura 9).

Quadro 2 - Manifestações clínicas dos gatos domésticos potencialmente sorologicamente não reativos (n = 11) no ELISA *in house* para anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp.

Animal	Sexo	Sintomas
P7	M	Dermatite, alopecia, lesões oculares, úlceras, lesões cutâneas na cabeça, pata e rabo.
P12	F	Assintomático
P18	F	Assintomático
P37	M	Assintomático
P105	M	Assintomático
P109	M	Assintomático
PI 13	F	Assintomático
P122	M	Assintomático
P124	F	Assintomático
P126	M	Assintomático
P129	F	Assintomático

Fonte: Dados da pesquisa. **Legenda:** F: fêmea; M: macho.

Portanto, esse animal foi considerado inconclusivo, porém positivo para esporotricose e apresentou sintomas clínicos comuns da LF. Isso ressalta a necessidade de utilizar outros métodos diagnósticos além do ELISA para confirmar a LF, como a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* por citologia e/ou histopatologia, ou a detecção de DNA de *Leishmania* por PCR (Pennisi, Persichetti, 2018; Pennisi *et al*., 2015; Brianti *et al*., 2017).

Dado que métodos sorológicos podem não ser suficientemente sensíveis para detectar infecções subclínicas, é recomendada a combinação de pelo menos dois resultados positivos, obtidos por meio de técnicas moleculares e sorológicas, a fim de obter uma estimativa mais precisas da infecção por *Leishmania* (Alcover *et al*., 2021).

Quadro 3 - Manifestações clínicas dos gatos domésticos sorologicamente inconclusivos (n =72) no ELISA in house para anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp.

Animal	Sexo	Sintomas
P1	M	Dermatite, úlceras, seborréia, alopecia, lesões cutâneas na cabeça.
P2	M	Dermatite, úlceras, seborréia, alopecia, lesões cutâneas nas patas.
P3	M	Dermatite, úlceras, seborréia, alopecia, lesões cutâneas na cabeça e tórax.
P4	M	Assintomático
P5	M	Dermatite, úlceras, seborréia, alopecia, lesões cutâneas na cabeça, tórax e patas
P6	M	Dermatite, úlceras, seborréia, alopecia, lesões cutâneas nas patas e cabeça.
P8	M	Dermatite, úlceras, seborréia, alopecia, lesões cutâneas na cabeça.
P10	F	Assintomático
P14	F	Assintomático
P15	F	Assintomático
P16	M	Assintomático
P17	M	Assintomático
P19	M	Assintomático
P20	M	Assintomático
P21	F	Assintomático
P22	F	Assintomático
P26	M	Dermatite: crostas e seborreia dorso
P27	F	Dermatite: lesões crostosa, seborreia, alopecia na escapula direita
P28	M	Assintomático
P29	M	Dermatite: lesão ocular e secreção ocular
P30	F	Lesão no focinho (úlceras, crostas)
P31	F	Dermatite: úlceras, seborréia e alopecia
P33	F	Assintomático
P34	F	Assintomático
P36	F	Assintomático
P39	F	Assintomático
P42	M	Assintomático
P51	F	Dermatite: lesões crostosa, úlceras na região do rabo
P52	F	Assintomático
P58	F	Dermatite: alopecia na região da cabeça
P59	F	Assintomático
P60	M	Assintomático
P63	F	Dermatite: crostas, seborreia, alopecia
P65	M	Assintomático
P67	F	Assintomático
P69	M	Assintomático
P70	M	Assintomático
P71	M	Assintomático

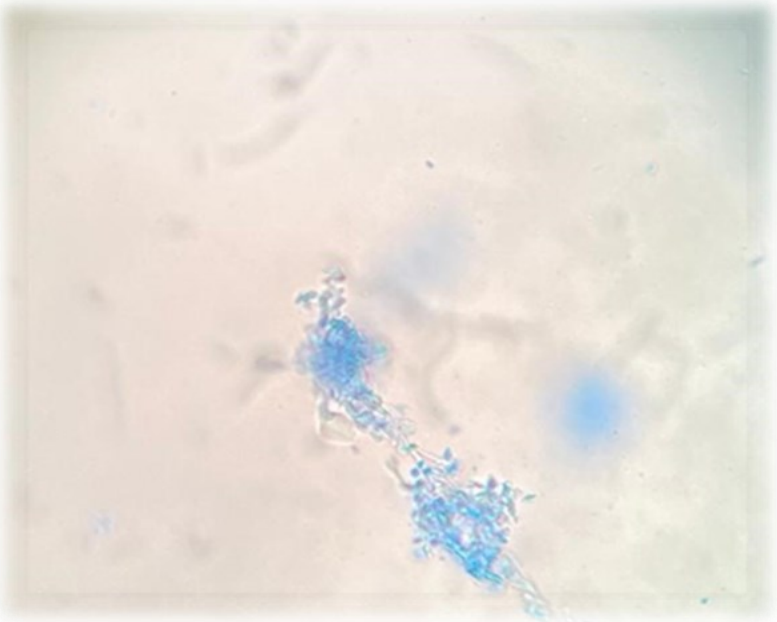
P72	M	Assintomático
P73	F	Assintomático
P74	M	Dermatite: crostas, alopecia e úlceras
P75	M	Assintomático
P81	F	Dermatite: crostas, alopecia e úlceras
P84	F	Assintomático
P85	M	Dermatite: crostas, alopecia e úlceras no plano nasal.
P86	M	Assintomático
P87	M	Assintomático
P88	F	Assintomático
P89	M	Assintomático
P90	F	Assintomático
P93	M	Assintomático
P94	F	Assintomático
P95	M	Assintomático
P96	F	Assintomático
P97	F	Assintomático
P98	M	Assintomático
P100	F	Assintomático
P101	M	Assintomático
P102	M	Assintomático
P103	M	Assintomático
P104	F	Assintomático
P106	F	Assintomático
P107	M	Assintomático
P108	F	Assintomático
P110	F	Assintomático
P111	F	Assintomático
P112	F	Assintomático
P115	M	Assintomático
P117	M	Assintomático
P120	M	Assintomático
P121	M	Assintomático
P123	M	Assintomático

Fonte: Dados da pesquisa. **Legenda:** F: fêmea; M: macho.

Figura 8 - Animal P30 sorologicamente inconclusivo para anticorpos anti-*L. infantum* no ELISA *in house*.

Fonte: Arquivo pessoal (2022). Animal P30, apresentou diagnóstico presuntivo para *Sporothrix schenckii* causador da esporotricose, pela bioquímica Msc. Gabriela Medeiros Araujo.

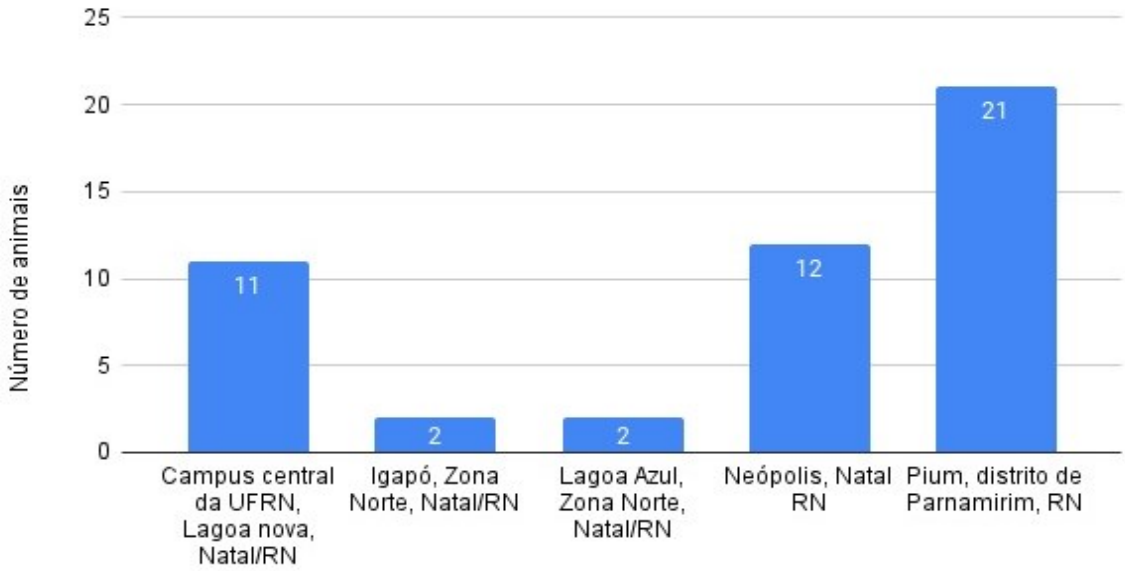
Figura 9 - Visualização de uma amostra de imprint nasal do felino P30 em microscópio óptico com objetiva de 100x, na qual foi identificada estruturas com características leveduriformes coradas em azul de algodão.



Fonte: Arquivo pessoal (2022). Lâmina do felino P30, positivo para *Sporothrix schenckii* pela Msc. Bioquímica Gabriela Medeiros Araujo.

No que diz respeito às regiões, foram identificados nesse estudo através do ELISA *in house* anticorpos IgG reativos anti *Leishmania infantum* em felinos nas localidades e município indicados, conforme a Figura 10 e o Quadro 5 (Apêndice C).

Figura 10 - Distribuição por região dos gatos que apresentaram anticorpos IgG reativos anti-*Leishmania infantum* no ELISA *in house*



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Esses resultados confirmam a possível presença da circulação de *Leishmania sp*. nessas regiões (Natal e Parnamirim). Uma vez que, os gatos estão produzindo anticorpos IgG anti *Leishmania* sp., é provável que haja circulação de *Leishmania* em cães e humanos nessas áreas também. Vários estudos bem estabelecidos têm comprovado que, em áreas endêmicas para a LCan e LH, felinos também podem ser infectados por *Leishmania* spp. (Vides *et al*., 2011; Sherry *et al*., 2011; Chatzis *et al*., 2014; Pennisi *et al*., 2015; Spada *et al*., 2016).

Conforme Hernandez *et al*. (2023), em uma análise retrospectiva, observou-se que os riscos de LV humana exibem variações geográficas substanciais no estado do Rio Grande do Norte (RN), indicando uma probabilidade significativa de aumento do risco de LV em Natal. Além disso, o estudo também investigou a associação entre níveis socioeconômicos mais baixos e um maior risco de LV em nível municipal (Hernandez *et al*., 20023). Colônias de gatos vadios poderiam desempenhar um papel na manutenção do ciclo de vida da *Leishmania* em um ambiente urbano, uma vez que os gatos são naturalmente expostos a vetores ativos da doença (Alcover *et al*.,2021).

Dessa forma, os gatos podem atuar como hospedeiros reservatórios primários e/ou secundários na transmissão da *Leishmania spp*. a humanos e a cães por meio de flebotomíneos, especialmente em áreas endêmicas (Asfaram *et al*., 2019). Essas descobertas ressaltam a importância de implementar intervenções específicas em saúde pública a nível municipal e justificam pesquisas futuras para a identificação dos fatores epidemiológicos nessas áreas de risco.

5.3 Presença de anticorpos IgG total anti-*Leishmania spp*.

O teste ELISA é uma ferramenta diagnóstica amplamente utilizada em estudos parasitológicos para detectar anticorpos ou antígenos específicos relacionados a um determinado parasita. Além de ser muito empregado para identificar e mensurar anticorpos em amostras de soro ou plasma, sendo bastante útil em estudos de soroepidemiologia devido à capacidade de processar uma grande quantidade de amostras de maneira relativamente rápida. Portanto, a especificidade do exame é obtida pela qualidade da substância adsorvida à placa, enquanto a sensibilidade é determinada pela concentração das proteínas presentes na substância (Rodrigues *et al*., 2014).

Durante o ensaio, leituras de absorbância são geradas e, para distinguir entre resultados positivos e negativos, é necessário estabelecer um valor de corte. A definição do valor de corte ideal em ensaios ELISA tem sido uma preocupação. Em geral, e principalmente ao realizar ELISA *in house*, os valores de corte são estimados utilizando soros negativos conhecidos de forma independente (às vezes, em conjunto com os soros positivos). Esses soros são incluídos nas placas de titulação junto com as amostras desconhecidas. O tipo de antígeno utilizado é extremamente relevante para a especificidade e sensibilidade de um exame sorológico empregado em análises laboratoriais (Lardeux *et al*., 2016). O componente ideal deve apresentar um desempenho satisfatório, o qual consiste na diferenciação de amostras positivas, sendo de fácil produção e advindo de métodos práticos e sem procedimentos laboriosos e complexos (Berrizbeitia *et al*., 2012).

Na primeira fase dos experimentos, foram examinadas 130 amostras de soro de gatos domésticos para avaliar sua reatividade sorológica em relação a um extrato proteico total de *Leishmania spp*., denominado aqui de ELISA *in house*, utilizando

extratos de promastigotas de *L. infantum* como antígenos. Este estudo, de natureza exploratória, teve como objetivo identificar anticorpos IgG anti-*Leishmania spp*. No entanto, não foi possível utilizar amostras de soros de gatos previamente diagnosticados como positivos ou negativos. Portanto, neste estudo, buscou-se identificar as amostras sorológicas com maior potencial de reatividade e aquelas com potencial de não reatividade à presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania spp*.

Na tabela 1 (APÊNDICE C), são apresentados os resultados da reatividade sorológica determinados por ELISA *in house*, onde são mostradas as reações em quatro diluições diferentes dos soros dos felinos participantes deste estudo. As diluições utilizadas foram 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 (v/v) para todos os soros testados. A reatividade sorológica também foi determinada em um sistema chamado de branco (sem antígeno na placa) e outro sistema chamado de HRP (com antígeno, mas sem soros). As densidades ópticas obtidas do branco e HRP de cada placa de ELISA foram comparadas e uma média aritmética foi calculada para esses dois sistemas. Essa média obtida foi usada como o denominador comum para determinar a absorbância relativa de cada amostra na diluição de 1:100 (v/v). Os dados de reatividade sorológica apresentados no gráfico da Figura 11 mostram as densidades ópticas de cada amostra de soro, total de 130 amostras, em diferentes diluições. É observada uma heterogeneidade na reatividade sorológica, sugerindo que algumas amostras apresentam uma reatividade maior, outros menores e outras uma reatividade intermediária.

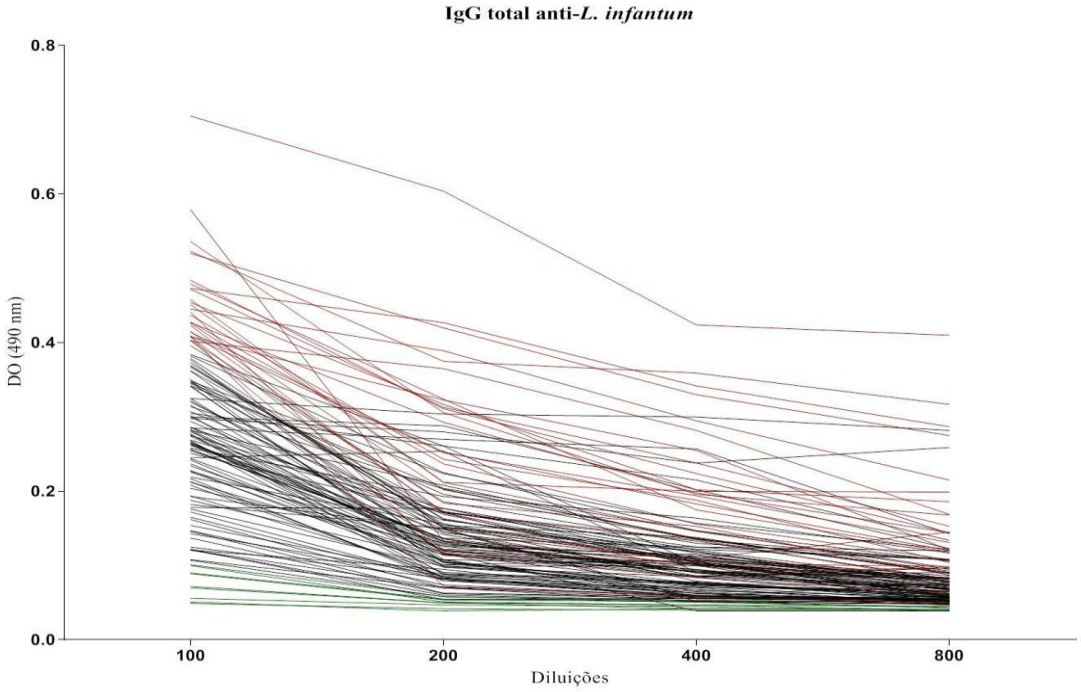
Dessa forma, estabelecendo um ponto de partida para o estudo, todos os soros que, na diluição de 1:100 (v/v), apresentaram densidades ópticas iguais ou menores que 0,1 foram considerados nesse estudo como soros potencialmente menos reativos (negativos). Da mesma forma, os soros mais reativos, com densidade óptica igual ou superior a 0,4, foram considerados como soros potencialmente positivos. Com base na densidade óptica em 1:100, obtivemos 6,92% de soros potencialmente menos reativos e 22,30% de soros potencialmente mais reativos.

Na tabela 2 (APÊNDICE C), são apresentados os resultados do ELISA *in hous*e nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400 e 1:500. Ao examinar a Figura 12, que apresenta o gráfico da distribuição da reatividade sorológica para anticorpos IgG total anti-*Leishmania spp.* nas amostras de soro de 130 gatos analisadas no estudo, observamos que ela representa a densidade óptica da diluição de 1:100 dividida pela

média do branco e HRP. Isso nos fornece um valor relativo chamado Densidade Óptica Relativa (DO relativa).

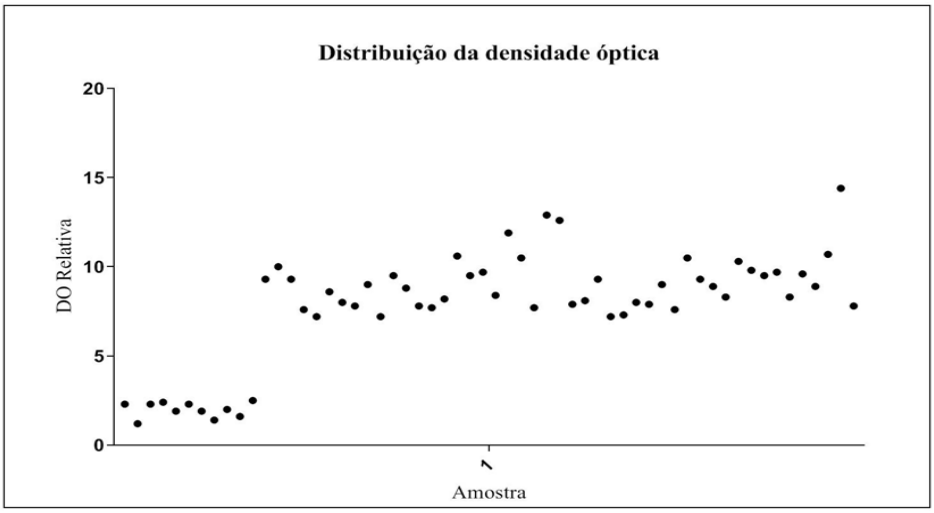
Neste estudo, foi adotado também, outro critério de ponto de corte, no qual todos os resultados sorológicos iguais ou menores que 2,5 foram considerados potencialmente não reativos, enquanto os resultados iguais ou maiores que 7,2 foram considerados potencialmente mais reativos para IgG anti- *Leishmania infantum*. Resultados intermediários foram considerados inconclusivos. Com base nesse critério, foram identificados 11 soros potencialmente não reativos (8,46% negativos), 47 soros potencialmente mais reativos (36,15%) e 72 soros com resultados indeterminados e ou inconclusivos (55,39%).

Figura 11 - Gráfico da distribuição da reatividade sorológica para anticorpos IgG total anti-*Leishmania* spp. da população amostral de soros dos 130 animais analisados no estudo



Fonte: Dados da pesquisa.
Legenda: O eixo X representa as DOs e o eixo Y representa as diluições.

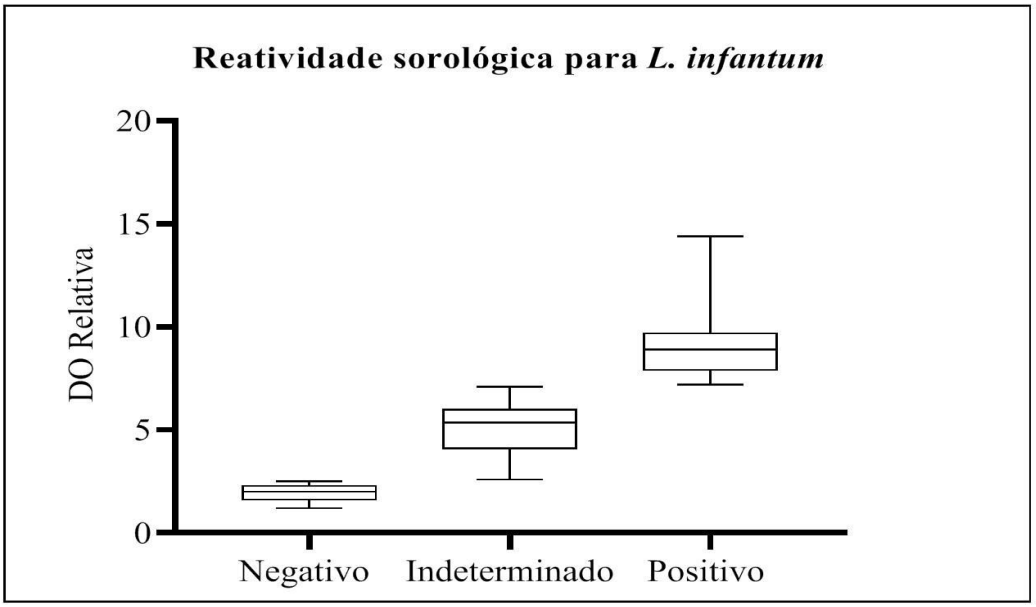
Figura 12 - Gráfico da distribuição da densidade óptica relativa para anticorpos IgG total anti-*Leishmania* spp. da população amostral de soros de 130 gatos analisados no estudo



Fonte: Dados da pesquisa.
Legenda: Soros diluídos a 1/100 (v/v). DO (Densidade óptica) relativa: DO (Densidade óptica) de cada soro dividido pela DO obtida dos controles HRP e Branco.Sendo o eixo Y as Dos relativas e o eixo X as amostras sorológicas.

Diante do exposto, a Figura 13 representada pelo Boxplot ou diagrama de caixas, que é uma ferramenta gráfica amplamente utilizada para visualizar a variação de dados observados em uma variável numérica. É especialmente útil quando lidamos com distribuições não normais e dados quantitativos não paramétricos. O Boxplot é composto por uma caixa que representa intervalo interquartil (IQR), onde o limite inferior da caixa representa o primeiro quartil (Q1) e o limite superior representa o terceiro quartil (Q3). A mediana (valor central) é indicada por uma linha dentro da caixa. Além disso, é possível visualizar os limites inferiores e superiores dos dados, chamados de "whiskers", e possíveis valores discrepantes (outliers). Essa representação gráfica nos permite ter uma compreensão rápida e visual da distribuição e variação dos dados em uma variável específica.

Figura 13 - Gráfico da distribuição da reatividade sorológica para anticorpos IgG total anti-*Leishmania* spp. em três diferentes populações de reatividade



Fonte: Dados da pesquisa.
Legenda: eixo y, representa as Dos relativa e o eixo X as amostras sorológicas.

O *Boxplot* é uma representação gráfica que nos permite observar a distribuição dos dados e identificar padrões de assimetria. Quando a cauda do Boxplot está projetada para a esquerda, indica uma assimetria negativa, sugerindo uma concentração de valores menores, ou seja, mais amostras negativas. Quando a cauda está projetada para a direita, indica uma assimetria positiva, indicando uma concentração de valores maiores, ou seja, mais amostras positivas. Ao analisar a D.O relativa das amostras negativas, observamos que nenhum valor ultrapassa o limite máximo de 2,5, e os valores mais baixos estão acima do limite mínimo de 1,1. O Q1 está em 1,5, a mediana (segundo quartil) em 1,9 e o Q3 em 2,3. O IQR é de 0,8, indicando a dispersão dos valores Para as amostras positivas, nenhum valor ultrapassa o limite máximo de 14,4, e os valores mais baixos estão acima do limite mínimo de 7,2. O Q1 está em 8,5, a mediana (segundo quartil) em 9,6 e o Q3 em 10,3. O IQR é de 1,8, indicando a dispersão dos valores. No grupo das amostras inconclusivas, o limite máximo é de 7,4, o limite mínimo é de 2,3, o Q1 está em 4,4, a mediana (segundo quartil) em 5,7 e o Q3 em 7,0. O IQR é de 2,6, também indicando a dispersão dos valores nesse grupo.

Ao comparar as medianas dos grupos positivos e negativos no gráfico de caixa, podemos identificar diferenças significativas entre esses grupos. Se as linhas das

medianas não estão contidas dentro das caixas correspondentes a cada grupo, isso sugere uma diferença entre as medianas dos grupos. A mediana representa o valor central dos dados, onde metade dos valores estão acima e metade estão abaixo. Quando as linhas das medianas estão fora das caixas, indica uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos. Se as linhas das medianas não tocam as caixas de ambos os grupos (positivo e negativo), isso reforça a ideia de que há uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos dois grupos. Essa diferença sugere que os grupos têm características distintas em relação à variável analisada (D.O. relativa). Essa informação é importante para identificar diferenças entre os grupos em termos de reatividade sorológica.

A largura da caixa no gráfico de caixa está relacionada à dispersão dos dados. Uma caixa maior indica maior dispersão, enquanto uma caixa menor indica menor dispersão. No contexto do seu gráfico, o grupo negativo apresenta a menor dispersão dos dados, sugerindo que os valores da D.O. relativa estão mais próximos uns dos outros e há menos variabilidade dentro desse grupo. Por outro lado, o grupo dos inconclusivos mostra a maior dispersão dos dados, indicando que os valores da D.O. relativa estão mais espalhados e há uma maior variabilidade dentro desse grupo. Essa informação sobre a dispersão dos dados é útil para compreender a variabilidade e a heterogeneidade das amostras em relação à reatividade sorológica. Ela pode indicar diferentes níveis de resposta ou comportamento das amostras em relação à presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. No entanto, é importante ressaltar que, além da visualização no gráfico de caixa, análises estatísticas são necessárias para avaliar e confirmar a significância das diferenças de dispersão entre os grupos.

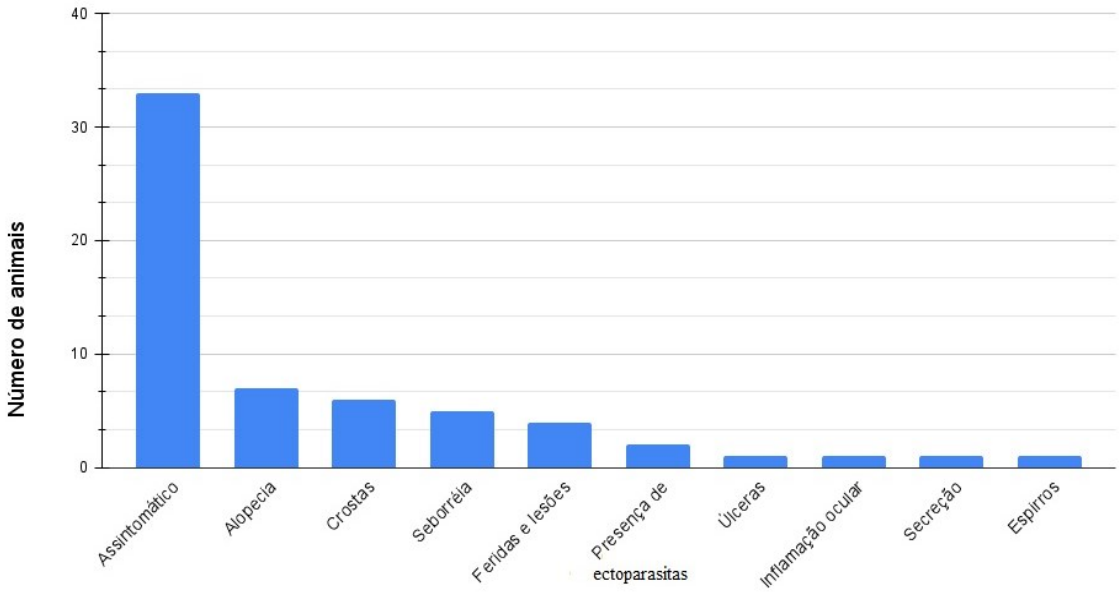
5.4 Relações entre dados sorológicos e clinicos da população estudada

No que diz respeito aos sintomas clínicos, na figura 14 é possível observar os sintomas clínicos mais frequentes nos gatos que demonstraram uma reatividade maior em relação aos anticorpos IgG *anti L. infantum*, obtidos por meio de um ensaio ELISA *in house*. A análise destes grupos visa compreender a relação entre a reatividade dos anticorpos e a manifestação de sintomas em gatos em relação a *L. infantum*.

O gráfico abaixo (Figura 14) ilustra a distribuição dos gatos com maior reatividade sorológica de anticorpos IgG anti-*L. infantum*, conforme detectado no

ensaio ELISA *in house*. Esses gatos foram categorizados com base na presença ou ausência de sintomas clínicos. As duas categorias incluem “assintomáticos” e “sintomáticos”, e a descrição dos achados clínicos está detalhada para cada grupo. Os resultados dos testes sorológicos ELISA revelaram que as infecções subclínicas (assintomático) por *L. infantum* são mais prevalentes do que as infecções clínicas em populações de gatos em áreas endêmicas, corroborando os achados do estudo conduzido por Alcover *et al*. em (2021).

Figura 14 - Distribuição dos gatos com maior reatividade sorológica de anticorpos IgG anti-*L. infantum* no ensaio ELISA *in house*, com base no quadro clínico. Os gatos estão divididos em duas categorias: assintomáticos e sintomáticos com a descrição dos achados clínicos



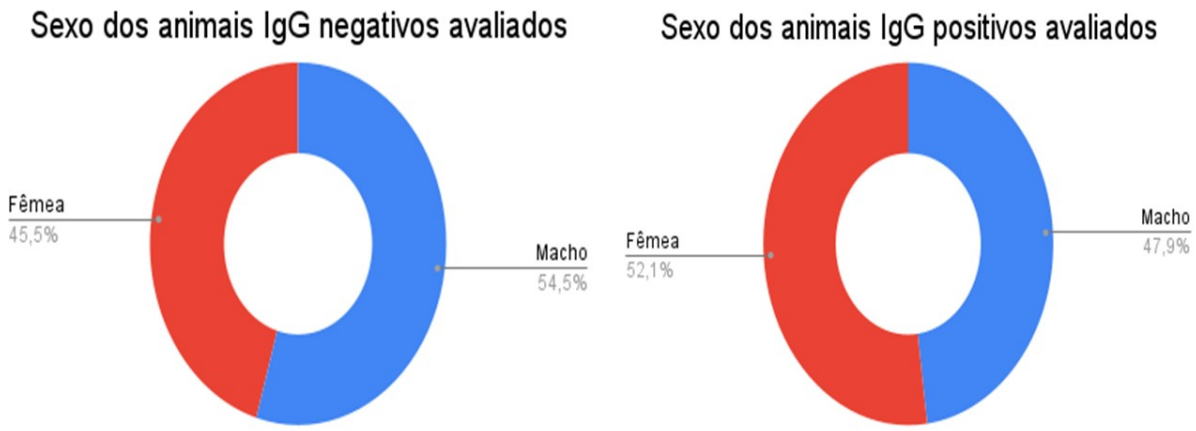
Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Em referência á faixa etária, os gatos adultos apresentavam o maior risco de positividade para *L. infantum* em comparação com outras faixas etárias (Latta *et al*., 2020). Em particular, gatos com mais de 12, 24 ou 36 meses são encontrados infectados com mais frequência (Priolo *et al*., 2022).

Em relação ao sexo, estudos demonstram maior susceptibilidade nos machos em comparação com fêmeas, em gatos de rua em comparação com gatos de interior e em gatos de áreas rurais e suburbanas em comparação com os das áreas urbanas. Nesse estudo, a prevalência de IgG reativo frente a *L. infantum* (total de 48 animais) foi um pouco maior nas fêmeas, 52,1% (25 fêmeas), enquanto nos machos foi de 47,9% (23 machos) (Figura 15). Esse resultado difere de alguns estudos nos quais,

os machos foram a categoria sexual mais frequentemente encontrada positiva em relação à presença de *L. infantum* (Priolo *et al*., 2022). No entanto, outros estudos não detectaram diferenças significativas em relação ao sexo dos gatos e a infecção por *L. infantum* (Bezerra *et al*., 2019).

Figura 15 - Gráfico da Proporção de gatos sorologicamente menos reativos e mais reativos frente a IgG anti-*L. infantum* de acordo com o sexo



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Além disso, observou-se que, na população onde foram obtidas as amostras biológicas dos gatos domésticos neste estudo, 83 de 130 (63,84%) corresponderam a gatos em situação de rua, errantes ou ferais. Essa descoberta está em conformidade com a pesquisa realizada por Vita *et al*. (2005), que relataram que 85% dos gatos sororreagentes para *Leishmania* sp. eram errantes ou tinham acesso ao exterior das residências. Enquanto, Cardoso *et al*. (2010), utilizando o ensaio ELISA, constataram uma diferença estatisticamente significativa entre gatos de áreas urbanas (0%) e rurais (10,5%) de um município na região norte de Portugal. Na área urbana, foi encontrado um percentual de 29,71% pelo mesmo método (Chatzis *et al*., 2014).

No que diz respeito ao modo de vida e ao local de residência dos gatos desta pesquisa que apresentaram uma maior reatividade sorológica aos anticorpos IgG contra *L. infantum*, constatou-se que apenas 37 felinos eram domiciliados. Destes, 9 gatos viviam em residências e tinham acesso à rua, enquanto os outros 28 gatos eram provenientes do abrigo de animais em Pium, onde não tinham acesso à rua, mas compartilhavam o espaço com um total de mais de 120 gatos no mesmo ambiente. Os demais animais, num total de 10, que apresentaram uma maior reatividade aos anticorpos anti *L. infantum*, eram animais errantes provenientes do mutirão de

castração e habitavam os arredores do campus central da UFRN. Dessa forma, outros estudos encontraram uma positividade significativamente maior para *L. infantum* em gatos de residências com vários gatos em comparação com residências com um único gato (Mosallanejad *et al*., 2013) em áreas rurais em comparação com áreas urbanas (Cardoso *et al*., 2010) e de colônias em comparação com gatis (Morgati *et al*., 2019).

Dos felinos IgG mais reativos frente a *L. infantum* detectados pelo ELISA *in house* (total de 48 gatos), 31,3% (14) eram sintomáticos, enquanto 68,8% (34) eram assintomáticos. No caso da *Leishmania*, os gatos podem ficar infectados por vários anos sem apresentar sinais clínicos (Alcover *et al*.,2021). De acordo com a literatura a maioria dos gatos infectados por *Leishmania* apresentam-se assintomáticos e a enfermidade clínica, quando surge tem sido frequentemente relacionada a problemas imunológicos decorrentes de infecções retrovirais simultâneas, como o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e FeLV, além de imunossupressão induzida por intervenções médicas, neoplasias ou diabetes *mellitus* tipo 2 (Pereira *et al*., 2019).

A relação entre a apresentação clínica da doença e a resposta imune ainda não foi completamente esclarecida em pacientes felinos. No entanto, é importante notar que diferenças específicas nas respostas imunes inatas e adaptativas dos felinos em comparação com os cães podem contribuir para a menor prevalência de infecção por *L. infantum* e de leishmaniose clínica em gatos. Recentemente, foi observado que gatos provenientes de áreas endêmicas são capazes de desencadear uma resposta imune adaptativa mediada por células (Priolo *et al*., 2019). Outros autores sugeriram que a resposta imune humoral desempenha um papel protetor na LF, ressaltando as possíveis diferenças nas respostas imunes entre essas duas espécies (Alves *et al*., 2016, Martín-Sánchez *et al*., 2007).

Em alguns cães, a presença simultânea de diferentes apresentações clínicas pode ser atribuída a fatores adicionais, como a vulnerabilidade da pele a traumas mecânicos e/ou comprometimento vascular. Isso também pode ser aplicável a alguns gatos (Fernandez-Gallego *et al*., 2020).

No que diz respeito ao papel dos gatos na cadeia epidemiológica da leishmaniose, ainda não há evidências suficientes para determiná-lo (Pennisi; Persichetti, 2018). A capacidade dos gatos de aparentemente controlar a infecção e de manifestar a doença com menor frequência também sugere um possível papel como fonte persistente de indivíduos infectados. Adicionalmente, em algumas áreas

endêmicas, a população de gatos de estimação e gatos de rua pode ser ainda mais numerosa do que a população de cães (Pennisi *et al.,* 2005). Os felinos possam atuar como reservatórios secundários, principalmente em situações em que não há um reservatório primário presente e em condições naturais, os gatos por si só não seria a principal fonte de infecção para os flebótomos (Pennisi *et al*., 2015).

Com base no exposto, a incidência de anticorpos em gatos, em comparação com cães, tem sido menor (Sollano-Galego *et al*., 2007; Bresciani *et al*., 2010; Sobrinho *et al*., 2012; Cardia *et al*., 2013; Bezerra *et al*., 2019). Essa menor incidência talvez seja atribuída a uma resposta imunológica celular mais efetiva que os felinos apresentam contra o protozoário, possivelmente devido à sua resistência natural (Sollano-Galego *et al*., 2007; Bezerra *et al*., 2019). Por outro lado, a utilização da sorologia tem sido sugerida como menos útil para o diagnóstico da LF do que em cães, na prática clínica. No entanto, ela pode desempenhar um papel mais relevante como um teste adicional para auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento de gatos doentes com a doença (Pennisi *et al*., 2018; Soares *et al*., 2016).

Diversas técnicas de detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, como a Imunofluorescência Indireta, ELISA, aglutinação direta e WB, têm sido amplamente utilizadas em diversos estudos. No entanto, em relação à LF, há informações limitadas em comparação com a LCan (Garcia-Torres *et al*., 2022). Os métodos de diagnóstico sorológico, são preferidos devido aos seus baixos custos, boa sensibilidade e à facilidade de obtenção de amostras de sangue (Silveira-Neto *et al*., 2015). Um dos testes sorológicos utilizados nas investigações da LF é o ELISA (Pennisi *et al*., 2015), que foi o método adotado neste estudo. O ensaio ELISA parece apresentar uma sensibilidade maior em relação ao RIFI, por exemplo, conforme evidenciado por estudos anteriores (Coelho *et al*., 2012; Silveira-Neto *et al*., 2011).

Neste trabalho, foi observada a prevalência de anticorpos IgG circulantes contra *Leishmania* spp., determinada por meio do teste ELISA. Da população total de 130 gatos domésticos provenientes da grande Natal, foi constatado que 36,15% das amostras sorológicas apresentavam potencial reatividade para anticorpos IgG anti-*L. infantum*. Fazendo uma analogia com o estudo de Bezerra *et al.* (2019), uma soropositividade de 15,38% foi encontrada em gatos avaliados na cidade de Mossoró/RN, também endêmica para a leishmaniose humana e canina. No nordeste brasileiro, foram realizados trabalhos com o objetivo de investigar a LF, embora com

uma quantidade limitada de estudos disponíveis. A soroprevalência encontrada nesse estudo foi maior do que a observada em Recife e Teresina, onde observaram 3,9 e 4% de gatos sororreagentes, respectivamente, utilizando a técnica de ELISA (Silva *et al*., 2014; Mendonça *et al*., 2017).

Neste estudo, o ensaio ELISA *in house* demonstrou eficácia na detecção da presença de anticorpos IgG totais anti-*Leishmania infantum* em soros dos felinos domésticos oriundos de regiões endêmica para LVI.

No entanto, a escassez de estudos voltados para a padronização das técnicas diagnósticas, bem como a falta de compreensão adequada da imunologia e fisiopatologia da LF, torna desafiador a identificação precisa dos animais infectados (Spada *et al*., 2013; Silveira-Neto *et al*., 2015). Além disso, é importante ressaltar que aproximadamente metade dos gatos infectados se recupera de forma espontânea, o que aumenta o perigo dessa espécie atuar como um reservatório do parasita. O fato de não podermos utilizar os mesmos repelentes utilizados em cães e o aumento da resistência dos parasitas aos medicamentos tornam essencial a condução de mais estudos para ampliar o conhecimento sobre os aspectos clínicos e preventivos, visando a redução ou erradicação desta zoonose em gatos (Ahuir-Baraja *et al*., 2021).

As principais limitações deste estudo estão relacionadas a variações e carências na coleta de informações clínicas. Essas limitações foram agravadas pelo fato de que a obtenção das amostras sorológicas ocorreu principalmente durante os eventos de mutirão de castração, nos quais havia uma necessidade premente de esterilizar o maior número possível de gatos ferais ou errantes com rapidez e eficiência. Isso complicou a obtenção de informações clínicas mais detalhadas devido à priorização das cirurgias. A pesquisa apresentou outra restrição, uma vez que se tratou de um estudo exploratório. Nesse contexto, não foi viável obter amostras de sangue de gatos previamente diagnosticados como positivos e negativos para a sororreatividade à leishmaniose felina.

6 CONCLUSÃO

A LF é uma enfermidade que tem sido cada vez mais notificada em diversas regiões do globo. Os gatos domésticos encontram-se vulneráveis e suscetíveis a infecções por diferentes cepas de *Leishmania*, dependendo da região geográfica, desempenhando, desse modo, um papel relevante na epidemiologia da doença como potenciais reservatórios.

Portanto, as conclusões principais deste estudo incluem a otimização de um ensaio ELISA *in house* e a detecção da presença de anticorpos IgG anti-*L. infantum* em soros de gatos errantes e de abrigos nas cidades de Natal e Parnamirim, no Rio Grande do Norte. A existência de gatos errantes em áreas urbanas desempenha um papel significativo na epidemiologia da infecção felina, uma vez que a maioria dos gatos avaliados foi considerada saudável e sem sintomas visíveis. As manifestações cutâneas representam o sintoma clínico principal ou mais comum na LF. Este estudo investigou o impacto epidemiológico dos gatos na disseminação da leishmaniose em Natal, analisando a correlação clínica e laboratorial em 26,38% dos gatos que apresentaram anticorpos IgG *anti L. infantum* e sintomas clínicos associados à LF.

Diante dos resultados obtidos, torna-se imprescindível realizar estudos complementares para uma compreensão mais aprofundada sobre se os felinos podem, de fato, atuar como reservatórios sustentáveis e disseminadores da leishmaniose zoonótica. Este estudo reforça a importância da realização de uma vigilância ativa da LF em ambientes urbanos, alinhando-se às diretrizes preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil. O propósito dessa vigilância é prevenir ou minimizar as questões associadas a essa enfermidade em áreas urbanas. Por fim, nossa pesquisa sugere que seja necessária uma maior investigação nas populações de gatos, sobretudo em nações endêmicas, como é o caso do Brasil.

REFERÊNCIAS

ABRAMO, F. *et al*. Skin Lesions in Feline Leishmaniosis: A Systematic Review. **Pathogens**, v.10, n. 472, 2021.

ADINEHBEIGI, K. *et al*. In Vitro Anti*Leishmania*l Activity of Fisetin Flavonoid via Inhibition of Glutathione Biosynthesis and Arginase Activity in *Leishmania* Infantum. **Pathog. Glob. Health**., v.111, p.176–185, 2017.

AGUIAR, D. C. F. *et al.* First molecular detection of *Leishmania* (*Leishmania*) infantum chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) from an urban area in eastern Amazon. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, n. 8 v. 29, p. e20220048, 2023.

AHUIR-BARAJA, A. E. *et al.* Feline Leishmaniosis: An Emerging Public Health Problem. **Vet. Sci**. v. 8, n. 173, p. 2-11, 2021.

AKHTARDANESH, B. *et al*. *Leishmania* infection in cats positive for immunodeficiency virus and feline leukemia virus in an endemic region of Iran. **Veterinary Parasitology.** v. 20, n. 8, p. 100387, 2020.

AlCOVER, M. M. *et al*. A cross-sectional study of *Leishmania* infantum infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. **Parasites Vectors**, v. 14, n. 178, p. 2-14, 2021.

ALCOVER, M. M. *et al.* First epidemiological survey of *Leishmania infantum* in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*) in a canine leishmaniosis endemic area using serology and PCR. **Parasites Vectors**, v. 15, n. 372, p. 1-16, 2022.

ALMEIDA, M. S. ***Leishmania* (Viannia) braziliensis, cepa MCAN/BR/1998/R619: variabilidade no perfil biológico e expressão gênica de proteases.** Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

ALTUZARRA, R. *et al.* Computed tomographic features of destructive granulomatous rhinitis with intracranial extension secondary to *Leishmania*sis in a cat. **Vet. Radiol. Ultrasound**., v. 61, n. 6, p. 64-68, 2020.

ALVAR, J. *et al*. *Leishmania*sis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**. n.5 v.7 p. e35671, 2012.

ALVES, M. L. *et al*. Use of the intradermal leishmanin test (Montenegro skin test) for feline visceral leishmaniosis: detection of cellular immunity. **Experimental Parasitology**, n. 8, v. 239, p. 108294, 2022.

ALVES, S. C. S.; CANCELA, D. S.; RAMALHO, S. S. O que sabemos sobre a leishmaniose felina? **J Feline Med. Surg**., v. 18, n. p. 435–442, 2016.

ANTUNES, T. R. *et al*. Detecção de *Leishmania* infantum em esfregaço de sangue periférico e linfonodo de um felino doméstico. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1–5, 2016.

ASFARAM. S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral *Leishmania*sis? A systematic review with meta-analysis. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**., v. 25. p.1–10, 2019.

ASGARI, Q. *et al*. Alarming: high prevalence of *Leishmania* infantum infection in cats from southern Iran based on molecular and serological methods. **Ann Parasitol**., v. 66, p. 143–156, 2020.

ATTIPA, C. *et al*. Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vectorborne, pathogens in cats from Cyprus. **Parasites & Vectors**, Estados Unidos da América, v. 10. n. 130, p. 1–14, 2017.

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.

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis – New concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**., v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BANETH, G. *et al*. *Leishmania* tropica and *Leishmania* infantum infection in dogs and cats in central Israel. **Parasit Vectors**.v.15, n.1 p. 327–345, 2022.

BARBOSA, I. R. Epidemiologia da leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 1, p. 17–21, 2013.

BARBOSA, I. R. Leishmaniose visceral humana no município de Natal-RN: análise clínico epidemiológica e espacial. **Revista Ciência Plural**, v. 2, p. 89–101, 2016.

BATISTA, J. F. *et al*. Transmission of *Leishmania* infantum from cats to dogs. **Rev Bras Parasitol Vet**. v. 24, n. 4, p. 1-11, 2020.

BATISTA, J. F. *et al*. Clinical, hematological, biochemical, and histopathological evaluations in domestic cats (*Felis catus*) infected by *Leishmania infantum*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 32, n. 3, p:e004723, 2023.

BENASSI, J. C, BENVENGA, G.U, FERREIRA, H.L, *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.

BERENGUER, L. K. A. R. *et al*. *Leishmania* infantum Infection in a Domestic Cat: a real Treator an Occasional Finding? **Acta Parasitol**., v. 66, n. 2, p.673–676, 2020.

BERRIZBEITIA, M. *et al*. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of T. cruzi (ESEA Antigens) for the diagnosis of chagas disease. **Journal of Tropical Medicine**, e875909, 2012.

BEZERRA, J. A. B. *et al*. Investigação sorológica e molecular da infecção por *Leishmania* spp. em gatos domésticos provenientes de uma área endêmica para leishmaniose canina e humana no nordeste brasileiro. **Braz. J. Vet. Parasitol**. v. 28, n. 4, p. 790-796, 2019.

BONFANTE-GARRIDO, R. *et al*. Cutaneous *Leishmania*sis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania* venezuelensis and L. braziliensis variants. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 141-148, 1992.

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. **Vet Parasitol.** v. 229 p.110–117, 2016.

BOURDEAU P, ROWTON E, PETERSEN C. Impact of different *Leishmania* reservoirs on sand fly transmission: perspectives from xenodiagnosis and other one health observations. **Veterinary Parasitology**. v. 287, n. 8 p. 109237, 2020.

BRAGA A R C, LANGONI H, LUCHEIS S. B. Evaluation of canine and feline *Leishmania*sis 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. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5. ed. Brasília, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar.** Brasília: Ministério da Saúde. 189p. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília: Ministério da Saúde, 120p. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais.** Brasília: Ministério da Saúde. 154p. 2019.

BRASIL, R. P. *et al*. Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema: potential area of visceral *Leishmania*sis transmission in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 120–121. 2012.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, 2003.

BRIANTI, E. *et al.* Prevenção da leishmaniose felina com coleira de matriz polimérica de imidaclopride 10% fumetrina 4,5%. **Vetores parasitas**, v. 10, p. 334, 2017.

BRUNO, F. *et al*. Retrospective Analysis of *Leishmania*sis in Sicily (Italy) from 2013 to 2021: One-Health Impact and Future Control Strategies. **Microorganisms**, v. 10 p. 1704. 2022.

CALDART, E. T. *et al*. Diagnóstico sorológico de *Leishmania* spp. em felinos e reação cruzada/coinfecção com Toxoplasma gondii e *Trypanosoma* spp. **Rev. Ciênc. Vet. Saúde Pública**, v. 3, p. 166-169, 2016.

CAMPRIGHER, V. M. *et al*. Ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos em área endêmica do estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v. 71, n. 2, p. 439-446, 2019.

CAN, H. *et al*. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania* tropica and *Leishmania* infantum in stray cats of İzmir, Turkey. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 109-14, 2016.

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

CARDOSO, L. *et al.* New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: the role of vertebrate hosts other than dogs. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 327-345, 2021.

CARNEIRO, L. A. *et al*. First report on feline *Leishmania*sis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis in Amazonian Brazil. Veterinary Parasitology: **Regional Studies and Reports**. v. 19, p. 100360. 2020.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. *et al*. Autochthonous visceral *Leishmania*sis 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. **J Med Entomol**., v. 54, n. 4, p. 1049–54, 2017.

CHATZIS, M. K. *et al*. Cytological and Molecular Detection of *Leishmania* Infantum in Different Tissues of Clinically Normal and Sick Cats. **Vet. Parasitol**. v. 202, p. 217–225, 2014.

COELHO, W. M. D. *et al*. Seroepidemiology of Toxoplasma gondii, Neospora caninum, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. **Parasitol Res**., v. 4, n. 109, p. 1009-13, 2011.

COELHO, W. M. *et al*. Occurrence of *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**., v.19, n. 4, p. 256-258, 2010.

COLOMBO, F. A. **Detecção de RNA de *Leishmania* (*Leishmania) infantum chagasi* em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e**

padronização de uma PCR em tempo real para o diagnóstico e diferenciação de espécies de *Leishmania* [Tese de doutorado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 101p. 2012.

COSTA-DURÃO, J. F. *et al*. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (Felis catus domesticus) detectado em Portugal (Conselho de Sesimbra). Nota preliminar. **Rev Port Cienc Vet**., v. 89, n. 511, p. 140–4, 1994.

COSTA, T. A. C. *et al*. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 47, p. 213–217, 2010.

COURTENAY, O. *et al*. Insecticide-impregnated dog collars reduce infantile clinical visceral *Leishmania*isis under operational conditions in NW Iran: a community-wide cluster randomised trial. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 3, p. 1–19, 2019.

DAHROUG, M, A. *et al*. The first case report of *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi in Panthera leo in Brazil. **Asian Pac J Trop Biomed**., v. 1, n. 3, p. 249–250, 2011.

DALMAU, A. *et al*. Leishmaniosis felina a propósito de un caso clínico. ¿Nos olvidamos de que existe? **Clin. Vet. Peq. Anim.** v. 28, p.233–237, 2008.

DANTAS-SILVA, M. **Investigação de fatores ecológicos relacionados ao potencial de transmissão de *Leishmania* infantum por dois quimiotipos do complexo Lutzomyia longipalpis.** (Dissertação) Mestrado em Ciências – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

DAVAL, N. *et al*. First report of autochthonous non-vectorial canine *Leishmania*sis 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.

DE ARRUDA, R. M. F. *et al*. Space-time analysis of the incidence of human visceral *Leishmania*sis (VL) and prevalence of canine VL in a municipality of southeastern Brazil: Identification of priority areas for surveillance and control. **Acta Tropica**, v. 8 n. 197, p. 105052, 2019.

DESJEUX, P. *Leishmania*sis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases. **Elsevier BV**., v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAKOU, A.; PAPADOPOULOS, E.; LAZARIDES, K. Specifc anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. **J. Feline Med. Surg**., v. 11, p. 728–730, 2009.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saude Publica**. v. 19, n. 5, p. 1373–1380, 2003.

DOMINICIS, C. N. D. *et al*. Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma Doença Polimorfa. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, São Paulo, v. 76, n. 2 p. 177–180, 2018.

DONATO, S, T. **Identificação e caracterização imunoquímica de antigénios de tripanosomatídeos envolvidos na reatividade serológica entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp**. 2023. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Protugal, 2023.

DUMONTEIL, E. *et al*. Shelter cats host infections with multiple Trypanosoma cruzi discrete typing units in southern Louisiana. **Vet Res**., v. 52, n. 1 p. 2–8, 2021.

FERNANDES, A. R. F. *et a*l. Soropositividade e fatores de risco para leptospirose, toxoplasmose e neosporose na população canina do Estado da Paraíba. **Pesqui. Vet. Bras**., v. 5, n. 38, p. 957–966, 2018.

FERNANDES, F. V. **Análise espacial de fatores sanitários e socioeconômicos sobre a incidência da leishmaniose visceral humana no Município de Natal-RN.** 2022. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2022.

FERNANDEZ-GALLEGO, A. *et al*. Feline leishmaniosis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal Of Feline Medicine And Surgery**. v. 22, n. 10, p. 993–1007, 2020.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 2, p. 141–145, 2009.

FOROUGHI-PARVAR, F. *et al*. FML-ELISA a novel diagnostic method for detection of feline *Leishmania*sis in two endemic areas of Iran. **J Parasit Dis.** n. 1 v. 45, p. 279–284, 2020.

FRANCHI, R.; BERTAZZOLO, W.; ANTONIAZZI, E. **Neoformazione rinofaringea: un caso atipico di leishmaniosi felina.** Atti Congresso SCIVAC – Quali novità nella diagnosi e nella terapia della leishmaniosi. Ferrara (Italia), 5-7 aprile 2019, p. 89–90, 2019.

GARCIA-TORRES, M. *et al*. Review and statistical analysis of clinical management of feline leishmaniosis caused by *Leishmania* infantum. **Parasites Vectors**, n. 15, v. 253, p. 2–13, 2022.

GARRIDO, J. M. C. B. G. **Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania* infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu.** 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, PT., 2012.

GAVGANI, A. S. M. *et al*. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral *Leishmania*sis in Iranian children: a matchedcluster randomised trial. **The Lancet**, v. 360, n. 9330, p. 374–379, 2002.

GAZZONIS, A. L. *et al*. Detection of *Leishmania* spp. in Chronic Dermatitis: Retrospective Study in Exposed Horse Populations. **Pathogens**, v. 11, n. 634, 2022.

GIANNAKOPOULOS, A. *et al*. Molecular investigation and geographical distribution of *Leishmania* spp. infection in stray and owned cats (*Felis catus*) in Thessaly, central Greece. **J Hellenic. Vet. Med. Soc**., v. 68, n. 1, p. 27, 2017.

GODOI, N. F. C. *et al*. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* Infantum em felinos domésticos frequentadores de clínicas e hospitais veterinários da cidade de Cascavel, Paraná, Brasil. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 19, n. 1, p. 11–16, 2016.

GONZÁLES, E. *et al.* Phlebotomine sand fly survey in the focus of *Leishmania*sis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania* infantum infection rates and blood meal preferences. **Parasit Vectors**. v. 10, n. 1, p. 327–345, 2017.

GONZÁLEZ, E. *et al*. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. **Acta Trop**., v. 152, p. 96–102, 2015.

GRADONI, L A Brief Introduction to *Leishmania*sis Epidemiology. The *Leishmania*ses: Old Neglected Tropical Diseases. Springer International Publishing, p. 1–13, 2018.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 23–30. 2011.

GUSHI, L. T. **Estrutura populacional de Lutzomya longipalpis através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial**. Dissertação. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.

HARTMAN, K.; PENNISI, M. G.; DORSCH, R. Infectious agents in feline chronic kidney disease. What is the evidence? **Advances in Small Animal Care**, v. 1, p. 189–206, 2020.

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.

HEADLEY, S. A. *et al*. Immunohistochemical characterization of cutaneous *Leishmania*sis in cats from Central-west Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 8, n. 17, p. 1–4, 2019.

HERNANDEZ, H. G. *et al*. Modelagem espaço-temporal hierárquica da leishmaniose visceral humana no Rio Grande do Norte, Brasil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 17, n. 4, e0011206, 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Cidades e estados. Brasília: IBGE, 2016. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/cidades-eestados.html. Acesso em: 8 out. 2021.

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

KLEINERMAN, G. *et al*. Detection of *Leishmania* major and *Leishmania* infantum in cats during an outbreak of cutaneous leishmaniosis in Southern Israel. **Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases**, v. 98, p.10206, 2023.

KNUPP, B. S. L. *et al*. Soroprevalência da leishmaniose felina no Paraná utilizando antígenos de diferentes espécies de *Leishmania* spp. **Brazilian Journal Of Development**. v. 7, n. 3, p. 29021–29029, 2021.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent *Leishmania*sis. **Clin. Transl. Immunology**, v. 3, n. 3, p.1–6, 2014.

LACERDA, L. C. *et al*. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1–7, 2017.

LARDEUX, F.; TORRICO, G.; ALIAGA, C. Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of Trypanosoma cruzi infection in Bolivian dogs in the absence of controls. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** FapUNIFESP (SciELO). v. 111, n. 8, p. 501–504, 2016.

LATROFA, M. S. *et al*. A Molecular Survey of Vector-Borne Pathogens and Haemoplasmas in Owned Cats across Italy. **Parasit. Vectors**, v. 13, n. 116, 2020.

LATTA, R. *et al*. A nationwide survey of *Leishmania* infantum infection in cats and associated risk factors in Italy**. Plos Negl. Trop. Dis**., v. 13, n. 7, p. 1–11, 2019.

LATTA, R. *et al*. Validation of a new immunofuorescence antibody test for the detection of *Leishmania* infantum infection in cats. **Parasitol. R**. v. 119, n. 4, p. 1381–1386, 2020.

LEE, M.; BOSWARD, K. L.; NORRIS, J. M. Immunohistological evaluation of feline herpesvirus-1 infection in feline eosinophilic dermatoses or stomatitis. **Journal Of Feline Medicine And Surgery**, v. 12, n. 2, p. 72–79, 2010.

LEONEL, J. A. F. *et al. Leishmania*sis in cat shelters: a serological, molecular and entomological study. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 5, n. 8, p. 327–345, 2020.

LIMA, C. M. *et al*. Serological and Molecular Survey of *Leishmania infantum* in a Population of Iberian Lynxes (*Lynx pardinus*). **Microorganisms**, v. 10, n. 24–47, p. 1–16, 2022.

LONGONI, S. S. *et al*. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 469–476, 2012.

LOWRY, O. H. *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**., v. 193, p. 265–275, 1951.

MACÊDO-SALES, P. A. *et al*. Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 9, n. 2, p. 13–19, 2018.

MADRUGA, G. *et al*. Ocular manifestations of *Leishmania*sis in a cat: first case report from Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v. 70, n. 5, p. 1514–1520, 2018.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine *Leishmania*sis and immune response to infection. **Vet. Parasitol**., v. 158, n. 4, p. 274–287, 2008.

MAIA, C. *et al*. Feline *Leishmania* infection in a canine *Leishmania*sis endemic region, Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3–4, p. 336–340, 2010.

MAIA, C. *et al*. Prevalence of Diroflaria immitis antigen and antibodies to *Leishmania* infantum in cats from southern Portugal. **Parasitol Int.** v. 64, p. 154–156, 2015.

MARCONDES, M. *et al*. Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral *Leishmania*sis. **Parasites & Vectors**., v. 11, n. 1, p. 131, 2018.

MARODIN, N. B. **Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana Distrito Federal.** 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MAROLI, M. *et al*. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania* infantum. **Vet. Parasitol**., v. 145, p. 357–360. 2007.

MARTÍNEZ-ORELLANA, P. *et al*. The Inflammatory Cytokine Effect of Pam3CSK4 TLR2 Agonist Alone or in Combination with *Leishmania* Infantum Antigen on Ex-Vivo Whole Blood from Sick and Resistant Dogs. **Parasit. Vectors.**, v. 10, n. 123, p. 2–7, 2017.

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. 2007.

MATRALIS, D. *et al*. A Case of Feline Leishmaniosis with Panniculitis. **Case Reports In Veterinary Medicine**, v. 2023, n. 8, p. 1–4, 2023.

MENDONÇA, I. L. *et al*. Infection of Lutzomyia longipalpis in cats infected with *Leishmania* infantum. **Vet Parasitol**., v. 280, p. 109058, 2020.

MENDONÇA I L. *et al*. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral *Leishmania*sis that transmit *Leishmania* infantum to the vector Lutzomyia Longipalpis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., v. 50, n. 4, p. 483–488, 2017.

MESTRINHO, L. A.; TRAVANCINHA, J.; SOBRAL, C. A case report of leishmaniosis with primary oral manifestation in a cat. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, n. 8, p. 01–05, 2022.

METZDORF, I. P. *et al*. Molecular characterization of *Leishmania* infantum in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral *Leishmania*sis. **Acta Trop.**, v. 166, p.121–125. 2017.

MIGLIAZZO, A. *et al*. Feline leishmaniosis: a case with a high parasitic burden. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 1, p. 69–70, 2014.

MIRÓ, G. et al. Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. **Trends Parasitol.** v. 33, n.9, p.718–730, 2017.

MIRÓ, G. *et al*. Current status of L. infantum infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? **Parasit Vectors** 7:112. 2014.

MONDOLFI, A. P. *et al*. Autochthonous cutaneous *Leishmania*sis in urban domestic animals (*Felis catus* / *Canis lupus familiaris*) from central-western Venezuela. **Acta Tropica**, v. 191, p. 252–260, 2019.

MONTOYA, A. *et al*. Implications of zoonotic and vector-borne parasites to free-roaming cats in central Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 251, n. 8, p. 125–130, 2018.

MORGANTI, G. *et al*. Emerging feline vector-borne pathogens in Italy. **Parasit Vector**., v. 12, n. 193, p. 2–9, 2019.

MOSALLANEJAD, B. *et al*. Antibody detection against *Leishmania* infantum in sera of companion cats in Ahvaz, south west of Iran. **Archives of Razi Institute**, v. 68, n. 2, p. 165–171, 2013.

NASCIMENTO, L. F. *et al*. Epidemiological and diagnostic aspects of feline *Leishmania*sis with emphasis on Brazil: a narrative review. **Parasitology research**, v. 121, n. 1, p. 21–34, 2022.

NASEREDDIN, A.; SALANT, H.; ABDEEN, Z. Feline *Leishmania*sis 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 leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. **Parasites & Vectors Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–4, 2016.

NAVARRO, J. A. *et al.* Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. **J Comp Pathol.**, v. 143, n. 4, p. 297-302, 2010.

NETO, L. 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.

NOÉ, P.; BABO-TERRA, V. J. Leishmaniose felina - revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 21, n. 122, p. 56–68, 2016.

NOÉ, P. *et al*. Detection of *Leishmania* chagasi in cats (*Felis catus*) from visceral *Leishmania*sis endemic area in Brazil. **Ciência Animal**, v. 4, n. 25, p. 03–14, 2015.

OLIVEIRA A N. **Avaliação da resposta imune humoral em animais imunizados com antígenos totais de *Leishmania amazonensis* associados a diferentes adjuvantes vacinais.** 2022. 74 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN. 2022.

OLIVEIRA, T. M. F. 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.

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

PAGLIANO, P.; ESPOSITO, S. Visceral leishmaniosis in immunocompromised host: an update and literature review. **Journal of Chemotherapy, ahead of publication**. v. 29, n. 5, p. 261–266, 2017.

PARGASS, I. *et al*. First reported case of *Leishmania*sis in a cat in Trinidad and Tobago. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 42, n. 8, p. 100896, 2023.

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.

PASSOS, V. M. *et al*. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (Viannia) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 19–20, 1996.

PENNISI, M. G. *et al*. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 302, p. 1–18, 2015.

PENNISI, M. G. *et al*. Feline leishmaniosis: clinical signs and course in 14 followed up cases. **In: Proceedings LXX Convegno SISVet.** Palermo, Italy: (13th-16th July 2016), p. 166–167, 2016.

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

PENNISI, M. G, VENZA M, REALE S, *et al*. Case report of *Leishmania*sis in four cats. Ve**terinary Research Communications, Springer Netherlands.** v. 28, n. 1, p. 363–366, 2004.

PEREIRA, A. F. E. *et al*. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Parana state of southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v. 17, p.1024–1030, 2008.

PEREIRA, A. *et al*. An Unusual Case of Feline Leishmaniosis with Involvement of the Mammary Glands. Top. **Companion. Anim. Med**., v. 472, n. 37, p. 1–17, 2019.

PERSICHETTI, M. F. *et al*. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. **Parasites Vectors**., v. 10, n. 1, p. 327–345. 2017.

PEZENTE, L. G.; BENEDETTI, M. S. G. Perfil epidemiológico da leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Roraima, Amazônia, Brasil, entre 2007 e 2016. **Brazilian Journal of Health Review**, Roraima, v. 2, n. 3, p. 1734–1742, 2019.

PIAJÁ, G. V. *et al*. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Vet. e Zoote.**, v. 20, p. 203–216, 2013.

PRIOLO, V. *et al*. *Leishmania* infantum-specific IFNγ production in stimulated blood from cats in areas where canine leishmaniosis is endemic. **Parasit Vectors.**, v. 26, n. 133, p. 1–9, 2019.

PRIOLO, V. *et al*. *Leishmania infantum* Specific Humoral and Cellular Immune Responses in Cats and Dogs: a comparative cross-sectional study. **Veterinary Sciences**., v. 9, n. 9, p. 482, 2022.

PULEIO, R. *et al.* Aspetti istopatologici, immunoistochimici e molecolari in quattro casi di leishmaniosi felina**. Proceedings of the 8th National Congress of the Italian Society of Veterinary Pathologists (AIPVet)**; Jun 15-17; Padova, Italia, p 87, 2011.

QUERIDO, J. F. B. *et al*. Molecular Techniques for Dicistrovirus Detection without RNA Extraction or Purification. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 3–6, 2013.

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

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. **Antimicrob Agents Chemother**., v. 52 n. 7 p. 2564–2572, 2008.

RIVAS, A. K. *et al.* Clinical and diagnostic aspects of feline cutaneous leishmaniosis in Venezuela. **Parasit Vectors.**, v 11, p. 141, 2018.

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, p. 80-85, 2019.

RODRIGUES, A. S. *et al*. Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**., v. 66, n. 2, p. 417–424, 2014.

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.

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

SANTOS, H. D. *et al*. High frequency of visceral *Leishmania*sis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p. 327–345, 2017.

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

SAVIOLI, G. *et al*. Serum amyloid A levels and alpha 2 and gamma globulins on serum protein electrophoresis in cats exposed to and infected with *Leishmania* infantum. **Parasit Vectors**., v. 14, n. 1, p. 2–7, 2021.

SCHUBACH, T. M. P. *et al*. American cutaneous *Leishmania*sis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania* (viannia) braziliensis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**., v. 98, n. 3, p. 165–167, 2004.

SERGENT, E.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bull Soc Pathol Exot**., v. 5, p. 93–8, 1912.

SERRANO, A. C. M. *et al*. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. **Clin Vet**., v. 76, p. 36–40, 2008.

SHERRY, K. *et al*. A serological and molecular study of *Leishmania* infantum infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**., v. 11, n. 3, p. 239–245, 2011.

SILVA, A. V. *et al.* The first record of American visceral *Leishmania*sis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Trop**., v. 105, n. 1, p. 92–4, 2008.

SILVA, D. T. *et al*. Feline leishmaniosis: hematological and biochemical analysis. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 2, p. 1–13, 2023.

SILVA, R. A. E. *et al*. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral *Leishmania*sis in Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidade: Phlebotominae) populations. **Mem Inst Oswaldo cruz**, v. 113, n. 5, p. 1–9, 2018.

SILVA, R. B. S. *et al*. Natural Infection by *Leishmania* infantum in domestic cats (*Felis catus*) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. **Braz J Vet Parasitol.**, v**.** 29, n. 4, 2020.

SILVA, R. C. N. *et al*. Detection of antibodies against *Leishmania* infantum in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 108–109, 2014.

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

SILVEIRA-NETO, L. *et al*. Clinical and epidemiological aspects of feline *Leishmania*sis in Brazil. **Semin Cienc Agrar**., v. 36, p. 1467-1480, 2015.

SIMÕES-MATTOS, L. *et al*. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania* braziliensis. **Vet Parasitol**., v. 127, n. 3, p. 199–208, 2005.

SOARES, C.S.A.; DUARTE, S.C.; SOUSA, S.R. What do we know about feline leishmaniosis? **J Feline Med Surg**., v. 18, n. 6, p. 435–442, 2016.

SOBRINHO, L. S. V. *et al*. Coinfection of *Leishmania* chagasi with Toxoplasma gondii, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral *Leishmania*sis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n.1–2, p. 302–306, 2012.

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

SOUSA, S. B. A. P. **Diagnóstico de Leishmaniose em Felis Catus Domesticus de área urbana e endêmica da região Norte do Brasil.** 2017. 83 f. Tese (doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2017.

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

SOUZA, A. I. *et al.* Domestic feline cutaneous *Leishmania*sis in the municipality of Ribas do Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: A case report. **J Venom. Anim. Toxins. Trop. Dis.** v. 15, n. 2, p. 359–65, 2009.

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. 2010, p. 1–6, 2013.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral *Leishmania*sis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**., v. 9, n. 5, p. 951–958. 2002.

TABAR, M. D. *et al*. Leishmaniosis in a cat with chronic diarrhea as the only clinical manifestation. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**. v. 36, n. 2, p. 753–757, 2022.

TASBIHI, M. *et al*. Comparative Mitochondrial Proteomics of *Leishmania* Tropica Clinical Isolates Resistant and Sensitive to Meglumine Antimoniate. **Parasitol. Res**., v. 119, p. 1857–1871, 2020.

TÁVORA, M. P. F. *et al*. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 4, p. 482–483, 2007.

TEIVES, M. J. N. V. C. **Detecção da infeção por Babesia spp., Hepatozoon spp., *Leishmania* spp., Ehrlichia spp. e Dirofilaria immitis em gatos (Felis catus domesticus) por técnicas parasitológicas diretas e serológicas no concelho de Alcochete.** Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2015.

TEIXEIRA, K. K. *et al*. Padrões espaciais da ocorrência de Leishmaniose visceral humana na cidade de Natal-RN: a influência das áreas de risco social. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, p. 121–133. 2019.

TOEPP, A. J. *et al. Leishmania* incidence and prevalence in U.S. hunting dogs maintained via vertical transmission. **Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports**. v. 10, p.75–81, 2017.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. *et al*. Macrophage Polarization in *Leishmania*sis: Broadening Horizons. **Front Immunol**., v. 9, n. 8, p. 1–12, 2018.

TORRES-GUERRERO, E. *et al*. *Leishmania*sis: a review**. F1000 Research**. v. 6, p. 1–15, 2017.

TOUHAMI, N. A. K. *et al*. Animal *Leishmania*sis in Algeria: A systematic review and meta-analysis, Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Diseases**. v. 93, p. 1–7, 2023.

TRAINOR, K. E. *et al.* Eight Cases of Feline Cutaneous *Leishmania*sis in Texas. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 6, p. 1076–1081, 2010.

URBANI, L. *et al*. Serological, molecular and clinico- pathological findings associated with *Leishmania* infantum infection in cats in Northern Italy. **J Feline Med Surg**, v. 22, p. 935–943, 2020.
VERNEUIL, M. Ocular leishmaniasis in a cat: case report. **J Fr. Ophtalmol.**, v. 36, n. 4, p.e67-72, 2013.

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, p. 22–28, 2011.

VILLANUEV-SAZ, S. *et al*. Serum protein electrophoretogram profile detected in apparently healthy cats infected with *Leishmania* infantum – Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 5, n. 8, p. 327–345, 2022.

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.

VIOTI, G. *et al*. Xenodiagnosis in four domestic cats naturally infected by *Leishmania* infantum. **Transbound Emerg Dis**., v. 69, n. 4, p. 2182–2190, 2021.

VITA, S. *et al*. Feline *Leishmania*sis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Vet. Res. Commun**., v. 29, p. 319–321, 2005.

WHO, 2017. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Le point sur la situation mondiale de la leishmaniose, 2006-2015: un tournant dans la surveillance de la maladie. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 92, n. 38, p. 557–565, 2017

WHO, 2020. Global *Leishmania*sis surveillance, 2017–2018, and frst report on 5 additional indicators. Geneva: World Health Organiza- tion. Weekly Epidemiological Record 25:265–280. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525. Acesso em 09 Jan 2022.

ZINGALES, B. *et al.* Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the Trypanosoma cruzi Genome Project. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, n. 6, p. 811–814, 1997.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) _____para participar do **ESTUDO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. EM GATOS (*FELIS CATUS*) DE ÁREAS ENDÊMICAS NA CIDADE DE NATAL RN**, sob a responsabilidade do pesquisador principal Marcelo de Sousa Silva, o qual pretende investigar a ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* spp., em felinos domésticos provenientes de áreas endêmicas em Natal no estado do Rio Grande do Norte, para a leishmaniose visceral canina e humana. Sua participação é voluntária e se dará por meio da permissão do uso de amostras de sangue colhidas de seu animal de estimação, e em alguns casos punção de linfonodos hipertrofiados, medula óssea e swabs conjuntivais coletados do seu gato, sob acompanhamento da mestranda e médica veterinária Rosana Karla Aires de Macêdo (CRMV/RN 00893). Se você aceitar participar, estará contribuindo para o maior conhecimento sobre essa zoonose em gatos domésticos e colaborando para a melhoria da saúde pública da região, uma vez que os dados alcançados poderão servir de condutas para órgãos competentes iniciar ações de combate à Leishmaniose. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e a do seu animal não serão divulgadas, sendo resguardado sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço R. Gen. Gustavo Cordeiro de Faria, 601 - Ribeira, Natal - RN, 59012-570, tel. (84) 3342-9824 ou poderá entrar em contato com a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRN, na Universidade Federal do Rio Grande do norte.

Consentimento Pós–Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ser retribuído financeiramente e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador.

_____ Data: ___/ ____/ _____

Assinatura do participante

_____

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B – MODELO DE FICHA PARA EXAME CLÍNICO EM GATO

Nome do animal:	Proprietário:	Data:
Peso:	Alimentação:	Tel para contato:
Acesso a rua: □Sim □Não	Raça:	Idade:
Sexo: □M □ F Vacinas: Vermifugação:	Castrado: □Sim □Não	Contato com cães □Sim □Não
EXAME FISICO		
Hidratação: □normal □leve □moderada □grave		
TºC___FR:___mrpm FC:___bpm/min MR/2min__TPC__seg		
Mucosas: □pálida □rosa pálida □rósea □congesta □hiperêmica □ictérica □cianótica		
Domicilio próximo a fontes de água? □Sim □Não Estado de Sáude □Saudável □Doente Escore Corporal: □1 □2 □3 □4 □5		

APÊNDICE C

Quadro 4 – Estudos sobre diagnóstico de leishmaniose felina no brasil (1940-2022).

Autores	Ano	Estado	N amostral	Espécie de Leishmania	Diagnóstico	Sorologia	PCR	Parasitológico
Mello (1940)	1940	PA	1	*Leishmania spp.*	Parasitológico			100%
Sherlock (1996)	1996	BA	53	*Leishmania spp*	RIFI; Parasitológico	0%		1,88%
Passos et al. (1996)	1996	MG	1	*Leishmania (Viannia) spp*	PCR; Parasitológico		100%	100%
Simões-Mattosa et al. (2001)	2001	CE	84	*L. infantum*	ELISA	10,70%		
Schubach et al. (2004)	2004	RJ	2	*L.braziliensis*	Parasitológico			100%
Savani et al. (2004)	2004	SP	1	*L. infantum*	RIFI; PCR; Parasitológico	100%	100%	100%
Souza et al. (2005)	2005	MS	1	*L.amazonensis*	Parasitológico			100%
Silva et al. (2008)	2008	RJ	8	*L.infantum*	RIFI; PCR	25%	25%	
Souza et al. (2009)	2009	MS	1	*L.amazonensis*	RIFI; Parasitológico	100%		100%
Figueiredo et al. (2009)	2009	RJ	43	*Leishmania spp.*	ELISA; RIFI	2,50%		
Bresciani et al. (2010)	2010	SP	283	*Leishmania spp.*	RIFI; Parasitológico	0%		0,70%
Coelho et al. (2010)	2010	SP	1	*L. infantum*	ELISA; RIFI; PCR; Parasitológico	0%-100%	100%	100%
Costa et al. (2010)	2010	SP	200	*Leishmania spp.*	ELISA; Parasitológico	11,50%		4%
Coelho et al. (2011a)	2011	SP	52	*L. infantum*	PCR; Parasitológico		3,84 %	5,76%
Coelho et al. (2011b)	2011	SP	70	*Leishmania spp.*	ELISA; RIFI	4,20%		
Silveira-Neto et al. (2011)	2011	SP	113	*Leishmania spp.*	ELISA	23%		
Vides et al. (2011)	2011	SP	55	*L. infantum*	ELISA; RIFI; PCR; Parasitológico	10,9%-25,4%	5,45 %	18,20%
Sobrinho et al. (2012)	2012	SP	302	*L. infantum*	ELISA; RIFI; PCR; Parasitológico	4,64%-12,91%	1,65 %	9,93%
Morais et al. (2013)	2013	PE	5	*L. infantum*	PCR		100%	
Cardia et al. (2013)	2013	SP	386	*Leishmania spp.*	RIFI	0%		

Continua

Braga, Langoni e Lucheis (2014)	2014	MS	100	*Leishmania spp.*	RIFI; PCR; Parasitológico	30%		
Braga et al. (2014)	2014	MS	50	*Leishmania spp.*	RIFI	4%		
Sousa et al. (2014)	2014	MS	151	*L. infantum*	RIFI	6,6%		
Silva et al. (2014)	2014	PE	143	*L. infantum*	ELISA	3,9%		
Costa et al. (2014)	2014	RN	52	*L. infantum*	RIFI; Parasitológico	3,8%		
Oliveira G et al. (2015)	2015	PA	443	*Leishmania spp.*	DAT; RIFI	4,06% - 5,64%		
Oliveira T. et al. (2015)	2015	SP	52	*Leishmania spp.*	PCR	13,50%		
Figueiredo et al. (2016)	2016	RJ	34	*L. braziliensis*	RIFI; ELISA; Parasitológico	14,7% - 20,6%		8,82%
Metzord et al. (2017)	2017	MS	100	*L. infantum*	PCR; Parasitológico	6%		4%
Poffo et al. (2017)	2017	MT	88	*Leishmania sp*	PCR		0%	
Mendonça et al. (2017)	2017	PI	83	*L. infantum*	ELISA; PCR; Parasitológico	4%	4%	4%
Alves-Martin et al. (2017)	2017	SP	55	*Leishmania spp.*	ELISA; RIFI; PCR; Parasitológico	21,6% - 72,5%	9,10 %	16,40%
Benassi et al. (2017)	2017	SP	108	*Leishmania spp.*	PCR		1,85 %	
Coura et al. (2018)	2018	MG	100	*Leishmania spp.*	RIFI; PCR; Parasitológico	54%		
Matos et al. (2018)	2018	PR	679	*Leishmania spp*	ELISA; RIFI	15,8% - 43,4%		
Marcondes et al. (2018)	2018	SP	90	*Leishmania spp*	PCR; Parasitológico		55,50 %	55,50 %
Madruga e cols. (2018)	2018	MT	1	*L. infantum*	PCR; Parasitológico		100%	100%
Rocha et al. (2019)	2019	MA	105	*L. infantum*	RIFI; PCR	30,48%	8,60 %	
Headley et al. (2019)	2019	MT	2	*Leishmania spp*	Parasitológico			100%
Bezerra et al. (2019)	2019	RN	91	*Leishmania spp*	RIFI; PCR	15,38%		
Pedrassani et al. (2019)	2019	SC	30	*Leishmania spp*	RIFI; PCR; Parasitológico	6,60%		
Silva (2019)	2019	SP	166	*L. infantum*	ELISA; RIFI; PCR; Parasitológico	15,06% - 53,61%	3,61 %	2,41%
Tolentino et	2019	MG	12	*Leishmania*	ELISA	33%		

Continua

Tolentino *et al*. (2019)	2019	MG	12	*Leishmania* spp	ELISA	33%		
Berenguer *et al*. (2020)	2020			*L. infantum*	PCR; Parasitológico		0,7%	0,7%
Carneiro *et al*. (2020)	2020	PA	1	*L.amazonensis*	PCR; Parasitológico		100%	100%
Costa-Val *et al*. (2020)	2020	MG	64	*L. infantum L. braziliensis*	ELISA; PCR	29,8%		
Leonel *et al*. (2020)	2020	SP	94	*Leishmania* spp	ELISA; RIFI; PCR	29,8% - 32,0%	12,5%	
Silva e al.(2020)	2020	PB	2	*L. infantum*	ELISA;PCR; Parasitológico	100%	100%	100%
Santos *et al*. (2021)	2021	BA	90	*L. infantum*	(TR DPPR Biomanguinhos, Fiocruz,BR) Citologia, PCR.	5,6%	7,8%	1%
Silvia *et al*. (2022)	2022	MS	50	*L. infantum*	RIFI	27%		
Pradella *et al*. (2022)	2022	RS	89	*Leishmania* spp	PCR		0%	
Alves et al. (2022)	2022	SP	100	*L.donovani*	ELISA; IFAT (Imunofluorescência de Anticorpos), PCR	IFAT:74% ELISA: 34%	5%	2%
Silvia et al. (2023)	2023	SP	166	*Leishmania* spp	ELISA, IFAT, PCR, Parasitológico	ELISA:15% IFAT: 53,6%	3,6%	1,8%

Tabela 1 – Resultados do ELISA *in house* nas diluições 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.

Amostra	100	200	400	800	Branco	HRP	Média B-HRP	DO/Media
P1	0,122	0,054	0,056	0,057	0,046	0,049	0,044	2,8
P2	0,143	0,086	0,071	0,066	0,04	0,042	0,044	3,3
P3	0,182	0,15	0,055	0,059	0,042	0,042	0,044	4,1
P4	0,237	0,1	0,072	0,053			0,044	5,4
P5	0,204	0,126	0,115	0,068			0,044	4,6
P6	0,176	0,099	0,1	0,051			0,044	4
P7	0,1	0,051	0,047	0,045			0,044	2,3
P8	0,121	0,06	0,053	0,056			0,044	2,8
P9	0,408	0,072	0,058	0,05			0,044	9,3
P10	0,314	0,203	0,136	0,093			0,044	7,1
P11	0,441	0,115	0,084	0,063			0,044	10
P12	0,051	0,039	0,042	0,041			0,044	1,2
P13	0,409	0,252	0,194	0,131			0,044	9,3
P14	0,264	0,08	0,06	0,054			0,044	6
P15	0,217	0,08	0,058	0,053			0,044	4,9
P16	0,162	0,07	0,052	0,052			0,044	3,7
P17	0,283	0,116	0,092	0,084			0,044	6,4
P18	0,101	0,058	0,053	0,06			0,044	2,3
P19	0,227	0,13	0,094	0,061			0,044	5,2
P20	0,258	0,193	0,164	0,117			0,044	5,9
P21	0,137	0,062	0,056	0,052			0,044	3,1
P22	0,226	0,107	0,062	0,054			0,044	5,1
P23	0,403	0,121	0,103	0,099	0,061	0,057	0,053	7,6
P24	0,379	0,152	0,122	0,108	0,056	0,045	0,053	7,2
P25	0,458	0,212	0,146	0,097	0,056	0,043	0,053	8,6
P26	0,373	0,154	0,138	0,089			0,053	7
P27	0,154	0,088	0,065	0,048			0,053	2,9
P28	0,282	0,088	0,075	0,057			0,053	5,3
P29	0,302	0,105	0,075	0,074			0,053	5,7
P30	0,362	0,117	0,085	0,069			0,053	6,8

P31	0,342	0,105	0,073	0,062			0,053	6,5
P32	0,423	0,171	0,091	0,097			0,053	8
P33	0,269	0,172	0,125	0,108			0,053	5,1
P34	0,213	0,084	0,057	0,055			0,053	4
P35	0,415	0,172	0,135	0,079			0,053	7,8
P36	0,341	0,108	0,102	0,078			0,053	6,4
P37	0,108	0,07	0,056	0,054	0,049	0,043	0,045	2,4
P38	0,403	0,184	0,153	0,087	0,044	0,046	0,045	9
P39	0,125	0,083	0,059	0,054	0,05	0,038	0,045	2,8
P40	0,325	0,119	0,095	0,063			0,045	7,2
P41	0,427	0,293	0,198	0,144			0,045	9,5
P42	0,316	0,104	0,066	0,058			0,045	7
P43	0,396	0,186	0,13	0,108			0,045	8,8
P44	0,35	0,171	0,133	0,082			0,045	7,8
P45	0,345	0,151	0,119	0,074			0,045	7,7
P46	0,369	0,163	0,106	0,058			0,045	8,2
P47	0,479	0,324	0,175	0,118			0,045	10,6
P48	0,428	0,237	0,156	0,108			0,045	9,5
P49	0,437	0,243	0,188	0,104			0,045	9,7
P50	0,377	0,115	0,104	0,06			0,045	8,4
P51	0,265	0,136	0,084	0,057			0,045	5,9
P52	0,32	0,152	0,109	0,082			0,045	7,1
P53	0,536	0,306	0,196	0,168			0,045	11,9
P54	0,473	0,427	0,342	0,287			0,045	10,5
P55	0,348	0,098	0,085	0,097			0,045	7,7
P56	0,579	0,133	0,11	0,145			0,045	12,9
P57	0,705	0,604	0,424	0,41	0,061	0,056	0,056	12,6
P58	0,244	0,121	0,086	0,073	0,044	0,056	0,056	4,4
P59	0,286	0,13	0,091	0,068	0,051	0,069	0,056	5,1
P60	0,325	0,304	0,3	0,282			0,056	5,8
P61	0,445	0,389	0,295	0,215			0,056	7,9
P62	0,454	0,317	0,202	0,186			0,056	8,1

P63	0,369	0,156	0,104	0,078			0,056	6,6
P64	0,523	0,375	0,359	0,317			0,056	9,3
P65	0,305	0,261	0,102	0,082			0,056	5,4
P66	0,402	0,365	0,282	0,169			0,056	7,2
P67	0,245	0,254	0,091	0,082			0,056	4,4
P68	0,408	0,323	0,255	0,121			0,056	7,3
P69	0,263	0,146	0,086	0,091			0,056	4,7
P70	0,286	0,161	0,119	0,067			0,056	5,1
P71	0,193	0,149	0,052	0,049			0,056	3,4
P72	0,3	0,288	0,202	0,123			0,056	5,4
P73	0,285	0,27	0,257	0,143			0,056	5,1
P74	0,255	0,137	0,125	0,12			0,056	4,6
P75	0,188	0,108	0,058	0,077			0,056	3,4
P76	0,367	0,162	0,111	0,083	0,045	0,041	0,046	8
P77	0,362	0,173	0,117	0,077	0,042	0,043	0,046	7,9
P78	0,414	0,253	0,183	0,12	0,062	0,044	0,046	9
P79	0,348	0,224	0,157	0,122			0,046	7,6
P80	0,484	0,311	0,224	0,144			0,046	10,5
P81	0,277	0,082	0,063	0,052			0,046	6
P82	0,426	0,202	0,137	0,09			0,046	9,3
P83	0,408	0,15	0,105	0,072			0,046	8,9
P84	0,242	0,101	0,107	0,075			0,046	5,3
P85	0,251	0,171	0,104	0,059			0,046	5,5
P86	0,298	0,28	0,238	0,259			0,046	6,5
P87	0,282	0,208	0,135	0,107			0,046	6,1
P88	0,234	0,117	0,039	0,039			0,046	5,1
P89	0,146	0,063	0,058	0,054			0,046	3,2
P90	0,265	0,114	0,092	0,058			0,046	5,8
P91	0,382	0,225	0,147	0,106			0,046	8,3
P92	0,472	0,313	0,238	0,153			0,046	10,3
P93	0,165	0,08	0,07	0,049			0,046	3,6
P94	0,268	0,089	0,078	0,053			0,046	5,8

P95	0,255	0,136	0,101	0,074	0,039	0,045	0,046	5,5
P96	0,274	0,12	0,1	0,067	0,044	0,046	0,046	6
P97	0,178	0,177	0,108	0,08	0,05	0,052	0,046	3,9
P98	0,172	0,082	0,068	0,05			0,046	3,7
P99	0,451	0,212	0,275	0,215			0,046	9,8
P100	0,219	0,156	0,079	0,056			0,046	4,8
P101	0,265	0,128	0,113	0,079			0,046	5,8
P102	0,276	0,122	0,111	0,086			0,046	6
P103	0,307	0,169	0,101	0,069			0,046	6,7
P104	0,294	0,149	0,108	0,083			0,046	6,4
P105	0,089	0,054	0,052	0,044			0,046	1,9
P106	0,262	0,133	0,102	0,071			0,046	5,7
P107	0,267	0,104	0,074	0,065			0,046	5,8
P108	0,194	0,091	0,077	0,06			0,046	4,2
P109	0,107	0,058	0,051	0,048			0,046	2,3
P110	0,275	0,177	0,121	0,079			0,046	6
P111	0,121	0,095	0,06	0,047			0,046	2,6
P112	0,212	0,115	0,076	0,058	0,036	0,037	0,036	5,9
P113	0,07	0,05	0,042	0,041	0,036	0,038	0,036	1,9
P114	0,342	0,204	0,147	0,095	0,036	0,038	0,036	9,5
P115	0,147	0,074	0,058	0,056			0,036	4,1
P116	0,348	0,144	0,106	0,063			0,036	9,7
P117	0,121	0,071	0,059	0,047			0,036	3,4
P118	0,3	0,142	0,09	0,06			0,036	8,3
P119	0,346	0,196	0,136	0,091			0,036	9,6
P120	0,228	0,098	0,076	0,06			0,036	6,3
P121	0,257	0,126	0,092	0,065			0,036	7,1
P122	0,049	0,042	0,04	0,041			0,036	1,4
P123	0,208	0,085	0,063	0,051			0,036	5,8
P124	0,072	0,05	0,047	0,04			0,036	2
P125	0,322	0,132	0,091	0,068			0,036	8,9
P126	0,056	0,047	0,045	0,039			0,036	1,6

P127	0,384	0,261	0,215	0,134		0,036	10,7
P128	0,52	0,42	0,33	0,275		0,036	14,4
P129	0,09	0,055	0,051	0,043		0,036	2,5
P130	0,28	0,132	0,094	0,07		0,036	7,8

Tabela 2 – Inclusão de amostras (na cor amarela) após estabelecimento do novo ponto de corte oriundo das DOs relativas.

NEGATIVO		POSITIVO		INCONCLUSIVO	
P12	1,15	P11	10,02273	P2	3,25
P122	1,36	P35	7,830189	P10	7,136364
P126	1,55	P40	7,2	P15	4,931818
P105	1,934783	P24	7,2	P5	4,636364
P113	1,944444	P32	7,981132	P8	2,75
P124	2	P38	8,955556	P14	6
P7	2,272727	p9	9,272727	P1	2,772727
P18	2,295455	P13	9,295455	P3	4,136364
P109	2,295455	P25	8,641509	P6	4
P37	2,3	P23	7,603774	P4	5,888889
P109	2,4	P41	9,488889	P16	3,681818
P.37	2,5	P66	7,178571	PSI	5,888889
		P68	7,285714	P52	7,111111
		P79	7,6	P63	6,589286
		P45	7,7	P20	5,86.3636
		P55	7,7	P31	6,45283
		P44	7,8	P19	5,159091
		P130	7,8	P87	6,130435
		P77	7,9	P59	5,107143
		P61	7,946429	P36	6,43.3962
		P76	8,0	P58	4,357143
		P62	8,107143	P39	2,777778
		P46	8,2	P21	3,11.3636
		P91	8,3	P70	5,107143
		P118	8,3	P75	3,357143
		P50	8,4	P28	5,320755
		P43	8,8	P17	6,431818
		P83	8,869565	P69	4,696429
		P125	8,9	P84	5,26087
		P78	9	P60	5,803571
		P82	9,26087	P67	4,375
		P64	9,339286	P42	7,022.222
		P114	9,5	P73	5,089286
		P48	9,511111	P26	7,037736
		P119	9,6	P81	6,021739
		P116	9,7	P74	4,553.571
		P49	9,711111	P27	.2,90566
		P99	9,804348	P72	5,357143
		P92	10,26087	P71	3,446429
		P54	10,51111	P30	6,830189

	P80	10,52174	P65	5,446429
	P47	10,64444	P22	5,136364
	P127	10,7	P85	5,456522
	P53	11,91111	P29	5,698113
	P57	12,58929	P34	4,018868
	P56	12,86667	P33	5,075472
	P128	14,44444	P86	6,478261
			P111	2,630435
			P89	3,173913
			P117	3,361111
			P93	3,586957
			P98	3,73913
			P97	3,869565
			P115	4,083333
			P108	4,217391
			P100	4,76087
			P88	5,086957
			P95	5,543478
			P106	5,695652
			P90	5,76087
			P101	5,76087
			P123	5,777778
			P107	5,804348
			P94	5,826087
			P112	5,888889
			P96	5,956522
			P110	5,978261
			P102	6
			P120	6,333333
			P104	6,391304
			P103	6,673913
			P121	7,138889

Quadro 5 – Distribuição por regiões dos gatos sorologicamente reativos frente a *L. infantum* por ELISA *in house*.

Amostra sorológica dos gatos	**Bairro/Município**
P9	Lagoa Azul, Zona Norte, Natal/RN
P10	Lagoa Azul, Zona Norte, Natal/RN
P11	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P23	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P24	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P25	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P32	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P35	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P38	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P40	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P41	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P43	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P44	Neópolis, Natal/RN

P45	Neópolis, Natal/RN
P46	Neópolis, Natal/RN
P47	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P48	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P49	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P50	Neópolis, Natal/RN
P53	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P54	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P55	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P54	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P56	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P57	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P61	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P62	Pium, distrito de Parnamirim/RN
P64	Neópolis, Natal/RN
P66	Neópolis, Natal/RN
P68	Neópolis, Natal/RN
P76	Neópolis, Natal/RN
P77	Neópolis, Natal/RN
P78	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P79	Igapó, Zona Norte, Natal/RN
P80	Igapó, Zona Norte, Natal/RN
P82	Neópolis, Natal/RN
P83	Neópolis, Natal/RN
P91	Neópolis, Natal/RN
P92	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P99	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P114	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P116	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P118	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P119	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P125	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P127	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P128	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN
P130	Campus central da UFRN, Lagoa Nova, Natal/RN

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br

CERTIFICADO

Natal (RN), 29 de julho de 2022.

Certificamos que a proposta intitulada **"Estudo sorológico e molecular da infecção por Leishmania spp. em gatos (*Felis Catus*) na cidade de Natal, Rio Grande do Norte"**, sob a responsabilidade de Marcelo Sousa Silva - e que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi APROVADA, após ajustes, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN, na reunião do dia 28/07/2022.

Protocolo Nº 030/2022	**CERTIFICADO Nº 298.030/2022**

Finalidade	**Pesquisa**
Vigência do Projeto	**DEZEMBRO 2022**
RELATÓRIO	**Janeiro 2023**

Espécie	**Linhagem**	**Idade**	**Peso aprox.**	**Quantidade:**		
				M	**F**	**Total**
Felis catus	raças diversas e sem raça definida)	A partir dos 6 meses	Mais de 1 kg	X	X	Amostra por conveniência
Origem	Centro de Controle de Zoonoses - Natal/RN					
Manutenção	Centro de Controle de Zoonoses - Natal/RN					

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. **O descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.**

Ailanda Mairá Cornélio da Silva
Coordenadora da CEUA-UFRN
Gestão 2021-2022