

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

Maria Luana Alves
Bióloga

**OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES E GATOS
EM ABRIGOS DE ANIMAIS DE ILHA SOLTEIRA, SP**

**Ilha Solteira
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

Maria Luana Alves

OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES E GATOS
EM ABRIGOS DE ANIMAIS DE ILHA SOLTEIRA, SP

Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Ilha Solteira
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

A474o Alves, Maria Luana .
Ocorrência da leishmaniose visceral em cães e gatos em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP / Maria Luana Alves. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2016
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade : Produção Animal, 2016

Orientador: Wilma Aparecida Starke Buzetti

Inclui bibliografia

1. Abrigos de animais. 2. Elisa. 3. Flebotomíneos. 4. Leishmania infantum.
5. Reação de montenegro. 6. Rifi.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ocorrência da Leishmaniose Visceral em cães e gatos em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP..

AUTORA: MARIA LUANA ALVES

ORIENTADORA: WILMA APARECIDA STARCKE BUZETTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. WILMA APARECIDA STARCKE BUZETTI
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP


Prof. Dr. EDSON GUILHERME VIEIRA
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Prof. Dr. WILLIAN MARINHO DOURADO COELHO
Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina

Ilha Solteira, 03 de março de 2016

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARIA LUANA ALVES – Nascida em 10 de dezembro de 1991, no município de Ilha Solteira, SP. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” em 2009, onde foi bolsista em projetos de extensão, trabalhando em escolas de ensino médio e em assentamento rural. Durante os anos de 2012 e 2013 exerceu práticas de vivências laboratoriais no laboratório de Imunoparasitologia da UNESP- Campus de Ilha Solteira (LIPAIS) sob a supervisão da Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, participando de experimentos com ênfase em leishmaniose visceral em gatos e leptospirose. No último ano da faculdade participou do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência (PIBID). Obteve o título de Bióloga em 2013 e, no ano posterior, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, e atualmente é bolsista FAPESP.

EPÍGRAFE

“A beleza não está nem na luz da manhã nem na sombra da noite, está no crepúsculo, nesse meio tom, nessa incerteza. ”

Lygia Fagundes Telles

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Pedro Alves Filho** e **Maria Ivani da Conceição Alves**, que são meu alicerce e que sempre estão dispostos a me ajudar e fazem do meu caminho nesta vida o mais perfeito possível.

Aos meus irmãos **Arnaldo Alves** e **Maria Fernanda Alves Martin**, são meu exemplo de vida, me protegem e dividem momentos felizes comigo.

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti** por todo o conhecimento. Agradeço pela paciência, profissionalismo e por ter me amparado em todos os momentos.

Ao meu amigo **Diogo Tiago da Silva** pelo bom coração e disposição em me ajudar em grande parte do trabalho. Sou grata pela força de vontade e confiança transmitida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir ser forte o suficiente para chegar onde estou.

Aos animais utilizados durante o experimento.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - campus de Ilha Solteira, essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal (PPGCTA) pela estrutura e amparo.

Agradeço a Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, minha orientadora, por ter depositado confiança em mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e auxílio financeiro referente ao processo 2014/12609-2.

Agradeço aos voluntários Marcelo Cilim, Michele Viegas e Karen Lopes por todo amor que tem com os animais. São exemplos de pessoas competentes e corajosas, que desenvolvem um trabalho maravilhoso de amparo aos animais abandonados. Muito obrigada pela atenção e disposição. Sem eles o trabalho não teria tantos detalhes e qualidades.

Agradeço aos docentes da UNESP de Ilha Solteira e Dracena por todo o conhecimento que obtive durante as disciplinas.

Aos funcionários da UNESP de Ilha Solteira, especialmente à Meiri Sayuri e Cleuza Nozela (Dona Cleuza) pela dedicação e capricho no serviço. Agradeço também aos servidores técnicos Juarez dos Santos (Juju) sempre sorridente, Sidival Antunes pela “água abençoada” do experimento e Wilder Jordão pelas histórias a caminho de Dracena e gambiarras. À Cláudia (Claudinha) pelas conversas animadas.

À Profa. Dra. Glaucia Amorim Faria do Departamento de Matemática da UNESP de Ilha Solteira pela ajuda nas análises estatísticas da pesquisa.

Agradeço à Maria Fernanda Alves Martin (Nandinha), irmã e companheira de pesquisa, pelos ensinamentos que me direcionaram no trabalho.

Aos amigos do LIPAIS (Laboratório de Imunoparasitologia de Ilha Solteira), Diogo Tiago da Silva (Firmeza), Júlio Cesar Pereira Spada (Bebê), Marina Flóro e

Silva (Poia), Juliane Mayara e Aline Cristine da Silva (Joinha) pela ajuda na execução do trabalho e muita descontração.

Agradeço ao amigo-irmão Diogo Tiago da Silva (firmeza) pelo companheirismo e auxílio. Sempre animado no laboratório, esclareceu e direcionou em todas as etapas do trabalho. Foram muitos momentos engraçados e dias “vingadouros”. Muito obrigada!

Ao Júlio Cesar Pereira Spada (Bebê) que foi a comissão de frente nas coletas mostrando o quão eficiente é em sua profissão e demonstrando o amor que tem por ela. Fico grata pela pessoa humilde e profissional que se tornou.

Agradeço à Marcia Jusi da UNESP- Jaboticabal e Murilo Fernandes da USP- Pirassununga pela contribuição no diagnóstico dos animais do trabalho.

Aos alunos da medicina veterinária da Faculdade Stella Maris (FEA) de Andradina, pelo trabalho durante as coletas, no qual foi muito eficiente e prazeroso. Entre eles Fernanda Spada, Laiza Alcântara, Mariana Fogale, Henrique Urzulim, Caio Brugnaro, Bruna, Camilly Siqueira, Gabriela Oliveira, Renata Priscila, Lorena Oliveira, Bárbara Prado, Thamiris Camargo, Claudimir Couto (Juba) e Robson Gonçalves.

Agradeço à minha companheira Camila Nascimento (Cibito) que além da motivação, me auxiliou no trabalho.

Aos meus queridos pais pelo apoio e ajuda nas coletas.

Aos meus amigos lindos que sempre estão ao meu lado, Patrick Ferreira (Cafetão), Philippe Toledo (Feijão), Aline Marchetti (Alina) e Thays Couto. Fico grata por serem tão verdadeiros e companheiros.

OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES E GATOS EM ABRIGOS DE ANIMAIS DE ILHA SOLTEIRA, SP.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), doença causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, é considerada um problema de saúde pública no Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo epidemiológico sobre a ocorrência da LV em cães e gatos e de flebotomíneos em dois abrigos de animais, durante o período de um ano, no município de Ilha Solteira, SP. Amostras de material biológico foram coletadas de 192 cães e de 197 gatos, para realização de exames sorológicos por meio do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para ambas espécies animais e da reação intradérmica de Montenegro para cães. Dos cães examinados, 17,2% (33/192) estavam sorologicamente positivos para LV pelo método ELISA, 19,8% (38/192) pela RIFI e 45,4% (15/33) pela reação intradérmica. Para cães, a concordância entre as técnicas sorológicas foi classificada de razoável a boa, mas quando comparadas à reação de Montenegro foi considerada ruim. No inquérito felino das 197 amostras, a soroprevalência foi de 32,4% (64/197) e 31,9% (63/197) no ELISA e RIFI, respectivamente. Embora a maioria dos cães e dos gatos entregue nos abrigos já estivesse infectada, seis cães e cinco gatos infectaram-se no interior desses abrigos, após algum tempo de permanência nesses recintos. Um total de 131 flebotomíneos foram capturados por meio das armadilhas luminosas, colocadas no interior dos dois abrigos durante o período de dois anos. Os fatores de riscos associados à LV foram determinados estatisticamente pela análise univariada, com valor significativo ($p \leq 0,05$), onde o porte pequeno dos cães, o uso de coleira de deltametrina e o diagnóstico precoce foram variáveis determinantes que influenciaram a positividade dos animais, ou seja, as duas últimas variáveis determinaram significativamente na diminuição de casos positivos da doença nos abrigos. Concluiu-se que os animais desses abrigos estavam vulneráveis a essa parasitose por se tratarem de locais com a presença de flebotomíneos vetores e de animais positivos para LV, oferecendo risco para a disseminação da doença no município.

Palavras chave: Abrigos de animais. ELISA. Flebotomíneos. *Leishmania infantum*. Reação de Montenegro. RIFI.

**OCCURRENCE OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN DOGS AND CATS IN
ANIMAL SHELTERS FROM ILHA SOLTEIRA, SP.**

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL), a disease caused by *Leishmania infantum* and transmitted by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, is considered a public health problem in Brazil. The study aimed to carry out an epidemiological study on the occurrence of VL in dogs and cats, and sand flies during the period of one year in two animal shelters from Ilha Solteira, SP. A total of 197 and 192 biological material samples were collected, respectively from cats and dogs for serological survey by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and an indirect fluorescent antibody test (IFAT) for both species of animals, and the intradermal reaction of Montenegro (only for dogs). During the study with dogs, 17,2% (33/192) were serologically positive for LV by ELISA, 19,8% (38/192) by IFAT and 45,4% (15/33) by the intradermal method. The correlation analysis between the serological techniques was ranged from reasonable to good for dogs, but was bad when compared to the Montenegro reaction. The feline seroprevalence was 32,4% (64/197) and 31,9% (63/197) for ELISA and IFAT, respectively. Although the most of dogs and cats in shelters were infected, six dogs and five cats infected inside the shelters. A total of 131 sand flies were captured by the light traps in both shelters, during two years. The risk factors, statistically determined by univariate analysis ($p \leq 0.05$), demonstrated that the small size of the dogs, the use of deltamethrin collar and the precocious diagnosis, significantly influenced the animals positivity for VL. It was concluded that these animal shelters were vulnerable to this parasitic infection because of the presence of sand flies and positive animals for LV.

Keywords: Animal shelters. ELISA. Sand fly. *Leishmania infantum*. Montenegro reaction. IFAT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Foto aérea mostrando a área de localização do abrigo A (retângulo vermelho) próxima a um fragmento de mata (seta) em um bairro rural do município de Ilha Solteira, SP...	26
Figura 2 -	Fotos das baias de animais do abrigo A. A: baia dos cães e B: baia dos gatos.....	27
Figura 3 -	Foto aérea mostrando a área onde está localizado o abrigo B (retângulo vermelho) próxima a um fragmento de mata em um bairro urbano do município de Ilha Solteira, SP.....	28
Figura 4 -	Fotos das baias de animais do abrigo B. A: baia dos cães e B: baia dos gatos.....	29
Figura 5 -	Fotos mostrando os pontos de localização de armadilhas CDC para captura de flebotomíneos em abrigo A de animais. A: Casa; B e C: Próximas à baia dos cães; D: Próximas à vegetação. Ilha Solteira, SP, 2015	40
Figura 6 -	Fotos mostrando os pontos de localização de armadilhas CDC para captura de flebotomíneos em abrigo B de animais. A: Próximas à casa; B: Próximas à baia dos gatos; C e D: Próximas à vegetação. Ilha Solteira, SP, 2015.....	41
Figura 7-	Fotos de cães sintomáticos para LVC, mostrando alguns sinais clínicos. A: Lesão periocular; B: Magreza; C: Lesões de pele (rarificação pilosa); D: Onicogribose. Ilha Solteira, SP, 2015.....	47
Figura 8 -	Fotos de cães durante a reação de hipersensibilidade tardia. A: Nódulo formado logo após a inoculação do antígeno de <i>Leishmania</i> sp.; B: Nódulo formado em um cão positivo após 72 horas da inoculação do antígeno. Ilha Solteira, SP, 2015.....	50
Figura 9 -	Fotos de gatos sintomáticos para LVF, mostrando alguns dos sinais clínicos mais evidentes. A: Área alopécica com dermatite e formação de úlcera; B: Lesão ocular; C: Perda de pelos e formação de crostas em borda de orelhas e formação de crostas na região nasal; D: Dermatite crostosa na orelha; E: Alopecia; F: Magreza. Ilha Solteira, SP, 2015..	60
Figura 10 -	Variação estacional dos flebotomíneos de acordo com as mudanças de temperatura e precipitação pluviométrica em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Datas das amostragens de sangue realizadas em cães e gatos nos abrigos A e B. Ilha Solteira, SP, 2015.....	30
Tabela 2 -	Número de cães sintomáticos e assintomáticos utilizados para realização da reação intradérmica de Montenegro. Ilha Solteira, SP, 2015.....	38
Tabela 3 -	Classificação dos valores de Kappa de acordo com Landis Jr; Koch (1977).....	42
Tabela 4 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães de acordo com o sexo, porte e localização em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	44
Tabela 5 -	Número de cães repostos no intervalo de um ano no abrigo A. Ilha Solteira, SP, 2015.....	45
Tabela 6 -	Número de cães repostos no intervalo de um ano no abrigo B. Ilha Solteira, SP, 2015.....	45
Tabela 7 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães assintomáticos (A) e sintomáticos (S) para LVC em três coletas realizadas com um intervalo de um ano em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	46
Tabela 8 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães negativos e positivos no ELISA Indireto para LVC de acordo com o período de coleta e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.....	48
Tabela 9 -	Número (N) e porcentagem (%) de cães negativos e positivos na RIFI para LVC de acordo com o período de coleta e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.....	49
Tabela 10-	Número (N) e porcentagem (%) de cães negativos e positivos na reação intradérmica de Montenegro. Ilha Solteira, SP, 2015	50
Tabela 11-	Diagnóstico sorológico dos cães pelo ELISA indireto e pela RIFI, de acordo com a classificação clínica (sintomáticos e assintomáticos). Ilha Solteira, SP, 2015.....	51
Tabela 12-	Análise comparativa dos métodos sorológicos para LV em cães: ELISA indireto e RIFI de abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	52
Tabela 13-	Análise comparativa entre os métodos sorológicos (ELISA indireto e RIFI) e reação intradérmica de Montenegro para LVC em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	53
Tabela 14-	Dinâmica da LVC em diferentes períodos durante um ano no abrigo de animais A. Ilha Solteira, SP, 2015.....	54

Tabela 15-	Dinâmica da LVC em diferentes períodos durante um ano no abrigo de animais B. Ilha Solteira, SP, 2015.....	54
Tabela 16-	Número de cães remanescentes que se infectaram com LVC nos abrigos A e B de Ilha Solteira, SP, 2015.....	55
Tabela 17-	Número (N) e porcentagem (%) de cães dos abrigos A e B, de acordo com os sinais clínicos para LVC. Ilha Solteira, SP, 2015.....	56
Tabela 18-	Número (N) e porcentagem (%) de gatos de acordo com o sexo e localização em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	57
Tabela 19-	Número de gatos repostos no intervalo de um ano no abrigo A. Ilha Solteira, SP, 2015.....	58
Tabela 20-	Número de gatos repostos no intervalo de um ano no abrigo B. Ilha Solteira, SP, 2015.....	58
Tabela 21-	Número (N) e porcentagem (%) de gatos assintomáticos (A) e sintomáticos (S) para LVF em duas coletas realizadas com um intervalo de um ano em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	59
Tabela 22-	Número (N) e porcentagem (%) de gatos negativos e positivos no ELISA Indireto para LVF de acordo com a coleta 1 ou 2 e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.....	61
Tabela 23-	Número (N) e porcentagem (%) de gatos negativos e positivos na RIFI para LVF de acordo com o período de coleta e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.....	62
Tabela 24-	Diagnóstico sorológico dos gatos pelo ELISA indireto e pela RIFI, de acordo com a classificação clínica (sintomáticos e assintomáticos). Ilha Solteira, SP, 2015.....	63
Tabela 25-	Análise comparativa dos métodos sorológicos para LVF em gatos: ELISA indireto e RIFI de abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	63
Tabela 26-	Dinâmica da LVF no período de um ano no abrigo de animais A. Ilha Solteira, SP, 2015.....	64
Tabela 27-	Dinâmica da LVF no período de um ano no abrigo de animais B. Ilha Solteira, SP, 2015.....	64
Tabela 28-	Número de gatos remanescentes que se infectaram com LVF nos abrigos A e B de Ilha Solteira, SP, 2015.....	65
Tabela 29-	Número (N) e porcentagem (%) de gatos dos abrigos A e B, de acordo com os sinais clínicos para LVF. Ilha Solteira, SP, 2015.....	66

Tabela 30-	Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas aos cães associadas à soropositividade para LVC em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	68
Tabela 31-	Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas ao ambiente associadas à soropositividade para LVC em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.....	69

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

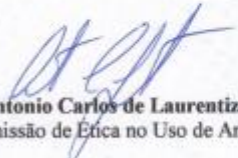


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 02/2015/CEUA, referente ao projeto "Leishmaniose visceral em cães e gatos de associações protetoras dos animais de Ilha Solteira, SP", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia da UNESP/Ilha Solteira.

Ilha Solteira, 29 de abril de 2015.


Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira
Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia
Avenida Brasil Centro, 56 Caixa Postal 31 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
pabe (18) 3743 1000 fax (18) 3742 2735 scorm@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	ÁREAS DE ESTUDO.....	26
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS DOS ANIMAIS.....	29
3.3	COLETA DE SANGUE.....	30
3.4	EXAMES SOROLÓGICOS.....	31
3.4.1	Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)- cães	31
3.4.2	Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)- gatos	32
3.4.3	Produção de antígenos de <i>Leishmania infantum</i>	34
3.4.4	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)- cães	35
3.4.5	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)- gatos	35
3.4.6	Bioquímica sérica	36
3.5	EXAME DE SANGUE.....	37
3.5.1	Hemograma completo	37
3.6	REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (REAÇÃO DE MONTENEGRO).....	37
3.6.1	Metodologia da reação de Montenegro	37
3.6.2	Amostragem da reação de Montenegro	38
3.7	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	38
3.8	COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS.....	39
3.9	QUESTIONÁRIO.....	41
3.10	DADOS CLIMÁTICOS.....	42
3.11	ESTATÍSTICA.....	42
3.12	COMITÊ DE ÉTICA.....	43
4	RESULTADOS	43

4.1	CÃES.....	43
4.1.1	Levantamento epidemiológico.....	43
4.1.2	Fluxo de cães.....	44
4.1.3	Sinais clínicos.....	45
4.1.4	Diagnóstico.....	47
4.1.4.1	<i>Exame ELISA indireto.....</i>	47
4.1.4.2	<i>Exame RIFI.....</i>	48
4.1.4.3	<i>Reação intradérmica de Montenegro (RM).....</i>	49
4.1.5	Análise comparativa entre os diagnósticos.....	51
4.1.6	Prevalência da LVC em abrigos de animais.....	53
4.1.7	Taxa de infecção de cães remanescentes.....	54
4.1.8	Sinais Clínicos em Cães Positivos.....	55
4.2	GATOS.....	56
4.2.1	Levantamento epidemiológico.....	56
4.2.2	Fluxo de gatos.....	57
4.2.3	Sinais clínicos.....	59
4.2.4	Diagnóstico.....	61
4.2.4.1	<i>Exame ELISA indireto.....</i>	61
4.2.4.2	<i>Exame RIFI.....</i>	61
4.2.5	Análise comparativa entre os diagnósticos.....	62
4.2.6	Prevalência da LVF em abrigos de animais.....	64
4.2.7	Taxa de infecção de gatos remanescentes.....	64
4.2.8	Sinais clínicos em gatos positivos.....	65
4.3	LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE FLEBOTOMÍNEOS.....	66
4.4	LEVANTAMENTO DOS FATORES DE RISCOS NOS ABRIGOS DE ANIMAIS.....	68
5	DISCUSSÃO.....	70
5.1	LEVANTAMENTO DE LV EM CÃES NOS ABRIGOS.....	70
5.2	LEVANTAMENTO DE LV EM GATOS NOS ABRIGOS.....	74

5.3	REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (REAÇÃO DE MONTENEGRO).....	78
5.4	LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS.....	80
5.5	ANÁLISE DOS FATORES DE RISCOS.....	83
6	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICES.....	102
	A. QUESTIONÁRIO APLICADO PARA RESPONSÁVEIS PELOS ABRIGOS DE ANIMAIS.....	102
	B. QUESTIONÁRIO PREENCHIDO DURANTE A ANAMNESE DOS ANIMAIS.....	104
	C. RESULTADOS ELISA DOS CÃES.....	105
	D. NÍVEIS ELISA DURANTE AS TRÊS COLETAS.....	107
	E. RESULTADOS ELISA DOS GATOS.....	108

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses infecciosas, consideradas um problema urbano e de saúde pública. Os portadores podem expressar uma série de sintomatologias, que variam de acordo com as espécies do parasito e a sua interação com o hospedeiro. Esses parasitos adaptam-se a inúmeros hospedeiros, vários ambientes e, devido a essa complexidade, o estudo dos vetores e hospedeiros é de grande importância para o conhecimento da doença e, conseqüentemente, das medidas de controle e prevenção em cada região (ASHFORD, 2000; RANGEL; LAINSON, 2003).

Na leishmaniose visceral (LV), considerada a forma mais grave da doença, ocorre uma disseminação crônica da infecção para órgãos como o fígado, baço e medula óssea, o que pode ser fatal se o paciente não for submetido a um tratamento adequado (LYNN et al., 2008). A LV apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina a doença já foi descrita em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região nordeste. Cerca de 59.000 mortes ocorrem anualmente devido a esta forma de leishmaniose (BRASIL, 2003).

A LV é causada pelo parasita *Leishmania infantum* (sinônimo *Leishmania chagasi*), pertencente à família Trypanosomatidae. É um parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico-mononuclear, e afeta qualquer tecido ou víscera dos mamíferos. Apresenta duas formas principais: flagelada ou aflagelada. A flagelada, também conhecida como promastigota, é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e pode ser procíclica, ou seja, se multiplica no intestino do vetor ou metacíclica, encontrada na boca do inseto onde não sofre divisão. A aflagelada ou amastigota é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (CARDOSO, 2012).

A transmissão do parasito ao homem e outros mamíferos é feita exclusivamente através de insetos vetores flebotomíneos, pertencentes a Ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae, dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho e no Novo Mundo, respectivamente. Apesar das 700 espécies de flebotomos já descritas, poucas têm sido encontradas naturalmente infectadas pelo parasito ou comprovadas como vetores das leishmanioses (SOBRINO, 2008).

No Brasil, foram encontradas 229 espécies de flebotomíneos (28,6% do total), sendo que a maior parte estava em ambientes silvestres e a restante em áreas marginais e residenciais (RANGEL; LAINSON, 2003). O gênero *Lutzomyia* é subdividido em diversos subgêneros e espécies, são os principais vetores da leishmaniose. Estudos de Gallati et al. (1997), comprovaram que a *Lutzomyia cruzi* é a vetora da LV no Mato Grosso do Sul. No Brasil, *L. whitmani*, *L. wellcomei*, *L. pessoai*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. flaviscutellata*, são classificadas como vetores da leishmaniose. Algumas dessas espécies possuem relação estreita com espécies de *Leishmania* sendo, portanto, vetores específicos de algumas das formas clínicas das leishmanioses. A espécie *L. longipalpis* é a principal vetora no Brasil e é popularmente conhecida como mosquito-palha ou Birigui (DEANE; DEANE, 1955; MURRAY et al., 2005).

Os flebotomíneos são insetos dípteros, medem de 1,5 a 3 mm, possuem olhos grandes, corpo coberto de pêlos e coloração palha. São encontrados em locais úmidos com temperaturas altas e na presença de matéria orgânica. Os insetos são mais ativos ao amanhecer e entardecer. Apenas as fêmeas são hematófagas, e possuem longevidade de 20 dias, aproximadamente. Seus voos são curtos e baixos, abrangendo um raio de ação que não ultrapassa 200 metros (REY, 1992; SHARMA; SINGH, 2008).

As fêmeas, ao se alimentarem do sangue do animal infectado, ingerem macrófagos contendo formas amastigotas que, no tubo digestivo, sofrem transformações e geram as formas promastigotas. As fêmeas infectadas, ao executarem um novo repasto sanguíneo em um novo hospedeiro, regurgitam as promastigotas metacíclicas em sua saliva. No tecido cutâneo as formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, elas são diferenciadas em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos. Novos macrófagos irão fagocitar essas formas em um processo contínuo, alastrando-se para outros tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, que são ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (BRASIL, 2007).

A distribuição abrangente do flebotomíneo nas áreas urbanas e sua enorme capacidade adaptativa aumentam as expectativas de animais saudáveis de serem

infectados pelo repasto sanguíneo de animais doentes, assim, a leishmaniose deixou de ser considerada unicamente doença rural (SAVANI, 2004).

No Brasil, a doença é endêmica em quase todas as regiões, sofrendo processo de expansão geográfica e urbanização por consequência da destruição antrópica dos habitats dos animais reservatórios e dos vetores. A proximidade ao habitat do flebotomíneo, condições sanitárias propícias ao vetor e presença de animais silvestres, fazem das periferias urbanas ideais para a reprodução do mosquito. Deste modo, a LV passou a ser classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das prioridades dentre as doenças tropicais (WIJEYRATNE; JONES-ARSENAULT; MURPHY, 1994; GONTIJO; MELO, 2004; COSTA et al., 2007; TENÓRIO et al., 2011).

Por meio de técnicas de geoprocessamento em conjunto com as imagens de satélite, um estudo realizado em Ilha Solteira, SP, por Paulan et al. (2012), para verificar casos de leishmaniose visceral canina (LVC) na área urbana do município, revelou uma prevalência estimada de baixa a média-alta, variando de 10% a 14,5%, dependendo do bairro estudado. As áreas com mais densidade de casos para LVC foram os locais próximos de fragmentos de vegetação natural (zoológico) e próximos do assentamento rural, ou seja, mais distantes do centro da cidade. No entanto, esse estudo revelou ainda que 78% dos casos de LVC estavam localizados fora do raio de 250 m dos fragmentos remanescentes de vegetação natural, não indicando nenhuma relação com a LVC. No entanto, alguns casos da doença ocorreram próximos ao zoológico, onde havia vegetação nativa remanescente e havia casos registrados de leishmaniose em canídeos silvestres (TENÓRIO et al., 2011). Esse trabalho reforçou ainda a importância do vetor *L. longipalpis* em se adaptar ao ambiente peridomiciliar sem a necessidade da vegetação como papel importante na dinâmica epidemiológica da doença, sendo possível se estabelecer em diferentes ambientes, aumentando a sua dispersão no estado de São Paulo.

A maioria dos levantamentos epidemiológicos sobre LVC em Ilha Solteira, SP, foi realizada em áreas urbanas; no entanto, em recente publicação, Spada et al. (2014) relataram um estudo epidemiológico realizado em áreas rurais do município e revelaram a prevalência de 31,3% da LVC em canídeos domésticos. Ainda neste

estudo, foi encontrado o mosquito vetor da LVC, o *L. longipalpis*, em todas as propriedades rurais estudadas.

Dentre os reservatórios silvestres, os canídeos são importantes mantenedores do protozoário, e as espécies variam de acordo com a região. No Velho Mundo, encontram-se o chacal (*Canis aureus*), o lobo (*Canis lupus*), e a raposa (*Vulpes vulpes*) (LAURENTI, 2010). No Brasil existem casos de leishmaniose em cachorro-do-mato (*Cerdoconyon thous*) na Amazônia, e em raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) no nordeste (CARDOSO, 2012). Além disso, o vetor pode fazer repasto sanguíneo em felídeos, marsupiais e roedores (RIBEIRO, 1997).

No Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira, o canídeo silvestre *C. thous* foi encontrado infectado e gravemente doente, o que culminou com sua morte natural (TENÓRIO et al., 2011). Em áreas urbanas, o cão (*Canis familiaris*), demonstra ser fonte de alimentação do vetor no ambiente doméstico e é considerado o principal reservatório da infecção para o homem. (ALVAR et al., 2004).

Os gatos também são considerados reservatórios domésticos de *Leishmania* spp. (MAROLI et al., 2007). No entanto, acredita-se que gatos são subdiagnosticados, devido à grande variedade de sintomas, bem como pelo fato de se tratarem de achados clínicos inespecíficos que podem ser confundidos com outras doenças, tais como o vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência (FIV), histoplasmose e esporotricose (SOUZA et al., 2005).

Os gatos, de certa forma, possuem resistência à doença, provavelmente relacionada aos fatores genéticos, mas atuam como reservatórios da mesma, contribuindo para a sua disseminação (MANCIANTI, 2004). Os sintomas relatados de leishmaniose visceral felina (LVF) foram anorexia, emaciação, desidratação, lesões cutâneas, dermatite seborréica, alopecia difusa e uveíte (PENNISI et al., 2004), assim como hipertemia e desidratação (SAVANI et al., 2004).

Cerca de cinco espécies do gênero *Leishmania* já foram identificadas em gatos no novo e velho mundo, entre elas, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. venezuelensis* (PENNISI et al., 2015).

Cães infectados, no entanto, representam risco para a saúde pública. Quando são assintomáticos, a detecção da doença é incerta, dificultando a adoção de

medidas de controle (COSTA; VIEIRA, 2001; MACHADO; HOFFMANN; LANGONI, 2007). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos, e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. A OMS padroniza como medidas de controle o diagnóstico precoce e o tratamento dos casos humanos com antimoniais pentavalentes, identificação e eliminação dos reservatórios, controle vetorial, educação ambiental, assim como a eutanásia dos cães (GONTIJO; MELO, 2004). Estudos demonstram que a eliminação dos cães positivos tem sido menos eficaz que outras medidas de controle (DYE, 1996).

Outras medidas de controle seria a utilização de coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%) contra o mosquito vetor. A coleira provoca repelência de fêmeas no ambiente diminuindo as chances de repasto sanguíneo e consequentemente diminuindo a taxa de infecção entre os cães. Se trocadas a cada seis meses de uso, a coleira seria uma alternativa viável e relativamente barata para a redução da incidência da doença em humanos e cães (CAMARGO-NEVES; RODAS; PAULIQUÉVIS, 2004).

O diagnóstico da LV pode ser determinado com exame necroscópico, levando a uma suspeita da doença, associado a exames complementares sorológicos, parasitológicos (citopatológico, histopatológico e imuno-histoquímico), imunocromatográficos, intradérmicos ou moleculares (MONTENEGRO, 1926; BONAMIGO; OLIVEIRA, 2009; CARDOSO, 2012).

Dentre os exames sorológicos, os mais empregados são o teste imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Estes testes, são baseados na detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* e constituem um instrumento importante no diagnóstico da LVC. Animais doentes desenvolvem resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999).

Atualmente, o Ministério da Saúde utiliza o teste imunocromatográfico DPP® (“Dual Path Platform”) como teste de triagem e o ELISA como confirmatório (BRASIL, 2013). O DPP® é um imunoensaio cromatográfico para testes de diagnóstico rápido, que foi desenvolvido pela empresa norte americana Chembio® e a empresa nacional Bio-Manguinhos®. O teste utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno, uma sequência de 39 aminoácidos clonada da região quinase

específica de *L. chagasi* que tem sido amplamente avaliada no diagnóstico da LVC (BURNS-JR et al., 1993). Nos estudos de Silva et al. (2014), foi relatada boa concordância entre um tipo de teste DPP® (RDT-rK39) com ELISA, RIFI e exame parasitológico. O teste molecular poderia ser um complemento do teste sorológico, principalmente em cães sintomáticos para LVC. No entanto, esse teste mostrou-se menos sensível nos casos de animais assintomáticos (SILVA et al., 2014).

Pelos métodos parasitológicos diretos, as formas amastigotas de *Leishmania* podem ser observadas por meio de material coletado de esfregaço sanguíneo, raspagem de pele, punção aspirativa por agulha fina de linfonodos, medula óssea ou baço. A lâmina deve ser corada com Giemsa e a diferenciação do parasita é feito pelo encontro do cinetoplasto perpendicular ao seu núcleo, garantido a confirmação deste e descartando outros parasitas intracelulares (WEBSTER; RUSSEL, 1993). A baixa especificidade do parasitológico direto está relacionada com o grau de parasitismo, do tipo de material analisado, da experiência de leitura da lâmina e da qualidade de coloração (GONTIJO; MELO, 2004). A sensibilidade pode variar de 30% a 60% dependendo do tipo de tecido avaliado (FERRER, 1999).

A técnica de imunistoquímica é comumente utilizada como ferramenta na confirmação do diagnóstico, uma vez que é muito eficaz na identificação pela marcação específica de proteínas na ligação de anticorpos e antígenos (KIERNAN, 2004). Em comparação com outras técnicas parasitológicas, a imunistoquímica possui maior sensibilidade e especificidade, além de ser de fácil execução (TAFURI et al., 2004; TASCA et al. 2009; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010). Em seus estudos, Queiroz et al (2010) observaram que a associação do método sorológico com a imunistoquímica aumentou o percentual de cães positivos (79,4%), e sugeriram a imunistoquímica como técnica de confirmação da sorologia, por ser considerada mais viável que a técnica molecular e mais sensível que a parasitológica direta.

Outro tipo de diagnóstico que pode ser utilizado é a reação intradérmica de Montenegro, considerado sensível, prático e específico para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar (MONTENEGRO, 1926). Essa reação é caracterizada por uma hipersensibilidade tardia do tipo celular, onde demonstra a reação imune celular do animal frente aos antígenos da leishmaniose. Além disso, ela possui

sensibilidade que varia entre 86 e 100% e especificidade de aproximadamente 100%, o que a consagrou como uma das provas mais usadas na confirmação da doença (MARZOCHI, 1992).

O método molecular é capaz de comprovar a presença do parasito pelo isolamento e amplificação de sequências de pares de bases específicos de seu DNA. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é considerada vantajosa por ser rápida, sensível e específica e tem sido utilizada por muitos pesquisadores. Contudo é um exame inviável do ponto de vista econômico, uma vez que necessitam de estrutura adequada, equipamentos de elevado custo e mão de obra especializada (ASHFORD et al., 1995; SOLANO-GALLEGU et al., 2001; ASSIS et al., 2010).

Utilizando-se a técnica da PCR para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães, Nunes et al. (2007) revelaram que esta técnica apresentava uma sensibilidade de 55% e uma especificidade de 66,3%, em relação à reação de imunofluorescência indireta. Em estudos com a PCR utilizando amostras de sangue, pele e linfonodo de cães, Manna et al. (2004) observaram maior sensibilidade do que a RIFI, sendo que 100% dos cães foram positivos pela PCR e 85% pela RIFI, além de alta positividade em amostras de aspirados de linfonodos de cães (99%), comparadas ao sangue (94%) e pele (95%). Para Assis et al. (2010), a PCR não só confirmou os resultados positivos pelas outras técnicas como ainda detectou DNA do parasita nos tecidos de 100% dos cães negativos e em 89% dos suspeitos nos testes parasitológicos diretos, elevando para 97% a positividade.

Durante um levantamento de LVC, Silva et al. (2014) também concluíram que somente um método diagnóstico não seria suficiente para o diagnóstico da doença, principalmente em cães assintomáticos. Nenhuma prova diagnóstica foi capaz de identificar um animal infectado quando usada isoladamente, necessitando da associação de outros métodos. Os resultados dos diagnósticos estão relacionados com a resposta imune do animal e da taxa de evolução da LV (ASSIS et al., 2010).

Devido a importância do assunto e sua influência na saúde humana e animal, foi realizado um estudo de ocorrência da LV em cães e gatos, um levantamento de *L. longipalpis*, e um estudo sobre os fatores de riscos da LV a esses animais em dois abrigos de Ilha Solteira, SP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a ocorrência da LV em cães e gatos por meio de várias técnicas diagnósticas (ELISA, RIFI e teste intradérmico) e de realizar um levantamento de mosquitos *L. longipalpis* em dois abrigos de animais do município de Ilha Solteira, SP. Além disso, objetivou-se também a realização de um estudo sobre os fatores de riscos dessa doença aos animais deste estudo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar exames sorológicos (ELISA e RIFI) e verificar a soroprevalência de LV em cães e gatos, durante o período de ano;
- Realizar a reação de Montenegro para avaliar a resposta imune celular dos cães;
- Verificar se os animais adquiriram leishmaniose visceral no interior dos abrigos durante o período de estudo;
- Realizar um levantamento de *L. longipalpis* nos dois abrigos de animais, durante o período de dois anos;
- Realizar um levantamento de dados climáticos (temperatura e chuva) e correlacionar com o levantamento de flebotomíneos;
- Correlacionar os dados do levantamento dos flebotomíneos, a positividade dos animais para LV, os aspectos clínicos e físicos dos animais, o manejo dos animais adotados pelos abrigos e os ambientais locais, a fim de verificar possíveis fatores de riscos da doença nesses dois abrigos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO

A cidade de Ilha Solteira pertence à Mesorregião de Araçatuba, localizando-se a uma latitude 20°25'58" Sul e a uma longitude 51°20'33" Oeste, em uma altitude de 335 metros a nível do mar. Esse município é considerado como uma área endêmica para LVC (PAULAN et al., 2012). Possui uma população estimada em 26.344 habitantes (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2015).

Os animais do presente estudo pertenciam a dois abrigos localizados no município de Ilha Solteira, SP. Esses dois abrigos estão descritos abaixo:

Abrigo A: localizado em uma área rural denominada Cinturão Verde situada próxima ao perímetro urbano (20°24'40" Sul e 51°20'51.3" Oeste). Por se tratar de área rural, nos arredores existem sítios que produzem diversos tipos de culturas de plantas e animais. Além disso, o abrigo está localizado próximo de fragmentos de mata (Figura 01).

Figura 1- Foto aérea mostrando a área de localização do abrigo A (retângulo vermelho) próxima à um fragmento de mata (seta) em um bairro rural do município de Ilha Solteira, SP.



Fonte: Google Maps®. (2016).

Na ocasião da pesquisa, o número de animais que se encontrava nos abrigos variava de 50 a 70, de acordo com a quantidade de resgates, mortes naturais, eutanásias e adoções efetuadas. A maioria dos cães e gatos dos abrigos foi abandonada ou foi vítima de maus tratos. O abrigo recebia apenas cães e gatos procedentes de Ilha Solteira e era mantido por um voluntário responsável e duas funcionárias que realizavam limpeza diariamente. Os animais eram mantidos em baias (Figura 2) e separados por afinidade e uma pequena parcela permanecia solta. As baias possuíam chão cimentado e eram totalmente cercadas, não permitindo o fluxo de animais entre elas. Das baias existentes, sete tinham cães e uma gatos. O abrigo recebia uma pequena ajuda de custo mensal da prefeitura municipal utilizada na compra de medicamentos, alimentação, produtos de limpeza e pagamento das funcionárias.

Além disso, o que mantinha as atividades do abrigo era a ajuda de voluntários ilhenses que se comprometiam a doar um valor monetário ou ração. As escolas do município contribuía com sobras de merenda escolar no qual complementava a alimentação dos animais.

Figura 2- Fotos das baias de animais do abrigo A. **A:** baia dos cães e **B:** baia dos gatos.



Fonte: o próprio autor

Abriço B: localizado no perímetro urbano, no bairro Jardim Aeroporto (20°24'40.0" Sul e 51°20'51.3" Oeste) (Figura 3). O abrigo era cercado por fragmento

de mata, além de estar ao lado de um córrego. O número de animais variava de 80 a 100, assim como o abrigo A, dependia da quantidade de resgates e adoções para outras pessoas. Os motivos responsáveis pelo aumento do número de adoções foram principalmente as feiras de adoções que eram realizadas a cada dois meses.

Figura 3- Foto aérea mostrando a área onde está localizado o abrigo B (retângulo vermelho) próxima a um fragmento de mata em um bairro urbano do município de Ilha Solteira, SP.



Fonte: Google Maps®.(2016).

Assim como o abrigo A, a maioria dos animais era oriunda de abandono e maus tratos e, o local recebia apenas cães e gatos procedentes de Ilha Solteira. Diversas pessoas voluntárias mantinham o abrigo, porém, duas foram responsáveis pelos animais, sendo uma delas pelos cães e, a outra, pelos gatos. Essas mesmas pessoas também realizavam a limpeza do local diariamente. Anteriormente, apenas os gatos eram mantidos em baias, mas no decorrer do estudo foram construídas baias também para os cães. Existiam duas baias de gatos (separados por sexo) e cinco de cães, com apenas alguns animais permanecendo soltos (Figura 4).

O abrigo recebia uma pequena ajuda de custo mensal da prefeitura municipal aplicada na compra de medicamentos, alimentação e produtos de limpeza. Todavia, o que mantinha o abrigo era a ajuda de voluntários que se esforçavam para a aquisição de recursos adicionais para complementar o orçamento.

Figura 4- Fotos das baias de animais do abrigo B. **A:** baia dos cães e **B:** baia dos gatos.



Fonte: o próprio autor

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS DOS ANIMAIS

As amostras biológicas, como o sangue para a obtenção do soro utilizado nos exames sorológicos (ELISA e RIFI) para diagnóstico da LV foram coletadas de cães e gatos dos dois abrigos de animais. Essas amostras nos abrigos A e B foram coletadas da seguinte maneira:

Primeira etapa: no início do trabalho (primeira coleta), todos os cães (n=70) e gatos (n=94) foram amostrados para o levantamento da LV. A segunda coleta foi realizada após cinco meses, onde compreendeu apenas cães novos (introduzidos mais recentemente nos abrigos) e os animais soronegativos nos exames anteriores (remanescentes). E finalmente na terceira coleta de sangue, o levantamento foi repetido com ambas espécies, compreendendo animais novos e remanescentes negativos de coletas anteriores (Tabela 1).

Tabela 1- Datas das amostragens de sangue realizadas em cães e gatos nos abrigos A e B. Ilha Solteira, SP, 2015.

Datas das Coletas nos Abrigos A e B			
Tipo de Animal	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Cães	Julho/2014 (n=70)	Fevereiro/2015 (n=64)	Julho/2015 (n=58)
Gatos	Agosto/2014 (n=94)	-	Agosto/2015 (n=103)

Amostragem			
Cães			
Gatos	Todos animais	*Remanescentes e animais novos	*Remanescentes e animais novos

*Animais com sorologia negativa no (s) exame (s) anterior (es)

3.3 COLETA DE SANGUE

Para a coleta de sangue, os animais foram contidos fisicamente, realizando-se a coleta diretamente da veia cefálica do braço ou veia jugular externa. Para isso, foram considerados alguns cuidados como: lavagem da área a ser puncionada com sabão, tricotomia dos pêlos e antiseptia prévia do local com álcool iodado. Foram coletadas amostras de 3 a 5 mL por animal e depositadas em tubos à vácuo, com e sem anticoagulante EDTA.

Nos gatos, a venopunção foi realizada via veia jugular, e a contenção química por meio da aplicação de anestésicos na dose de 11 mg/kg de cetamina + 1,1 mg/kg de xilazina, associados na mesma seringa. O sangue foi separado em dois tubos, um com EDTA (anticoagulante) e outro para obtenção do soro imune, que foi utilizado para realização dos testes sorológicos de diagnóstico da LV por meio do ELISA indireto e RIFI.

3.4 EXAMES SOROLÓGICOS

3.4.1 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) - cães

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) e adaptado por Oliveira et al. (2008) para *L. infantum*. O antígeno foi produzido em laboratório a partir de promastigotas desenvolvidas em cultivo celular de amastigotas provenientes de cães sintomáticos para LV. Este material foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-Jaboticabal, SP.

Em cada cavidade da placa ELISA (fabricada em poliestireno transparente - Fabricante: Kartell S.P.A., Itália) foi adicionado 100µL do antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração 5 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS) 0,05M, pH 9,6. Após incubação em placa, durante 8 a 10 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS (0,01M, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20 acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a 37°C, por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados em duplicata 100µL dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos nas suas diluições ideais em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram novamente incubadas e lavadas. Em seguida, 100µL do conjugado (IgG de coelho anti IgG de cão, acoplada à fosfatase alcalina (SIGMA A-0793) foi diluído 1:40000 em tampão PBS-Tween 20, contendo 5% de soro de coelho. Foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; SIGMA N-9389), foi adicionado, aguardando-se a reação por 45 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (EL800 Universal Microplate Reader Bio-TEK Instruments, INC.), a um comprimento de onda de 405 nm.

Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L.*

infantum, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT; 1980).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos, de acordo com a seguinte equação:

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

3.4.2 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) - gatos

O teste ELISA indireto foi realizado segundo a técnica preconizada por (LIMA, et al., 2005).

Para o teste ELISA, em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida, a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS; 0,01M, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com TCBS-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C, por duas horas. Após quatro lavagens com TCBS-T, para a retirada da solução de bloqueio, adicionou-se 100 µL por poço, em duplicata, das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos a serem testados na diluição 1:400 em TCBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%.

As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e,

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

Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT, 1980).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos, de acordo com a seguinte equação:

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

3.4.3 Produção de antígenos de *Leishmania infantum*

Para realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), foram confeccionadas lâminas com antígeno *L. infantum*, oriundos de culturas de promastigotas no laboratório. Uma cepa contendo formas promastigotas de *L. infantum* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Doenças Tropicais da UNESP-Botucatu. Os parasitos foram cultivados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) (LEMESRE et al., 1988).

A suspensão de células foi mantida em meio RPMI (1640 MEDIUM-SIGMA®), pH=6,8 suplementado com soro fetal bovino a 10%, urina humana masculina fresca (centrifugada por 10 minutos, 3500 rpm) a 2% (modificação), 0,25% de hemina liofilizada, solução de antibióticos diluídos em água destilada (100 µg/mL de estreptomicina+100µg/mL de penicilina). Foi feita uma filtração posteriormente, e o meio RPMI completo foi distribuído no volume de 5 mL em tubos de ensaios auto clavados e estocados em geladeira. Uma pequena parte (2 tubos) foi mantida em estufa a 37°C (48 horas) para observar se houve contaminação do meio.

A cada 72 horas foi realizado o repique das promastigotas de *L. Infantum*, em câmara de fluxo laminar após observação do crescimento destas em microscópio óptico. O meio de cultura de interesse para a confecção das lâminas de RIFI foi centrifugado a 3000 rpm, por 10 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se de 2 a 3mL de solução salina tamponada, 0,01M, pH 7,2 (PBS), e centrifugou-se novamente a 3000 rpm, por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes. Os parasitos foram quantificados em microscópio óptico (aumento de 400x) e, a concentração ótima foi de 20 a 30 promastigotas por campo. Caso a quantidade de promastigotas fosse inferior, a centrifugação era feita novamente, até obter a concentração desejada. Caso a quantidade de parasitas estivesse concentrada, a mesma era diluída em PBS.

As lâminas para RIFI eram compostas de duas fileiras de seis orifícios (perfurações) cada. O antígeno foi fixado pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas. Em seguida, a suspensão foi retirada por aspiração, restando

somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas permaneceram em temperatura ambiente para secagem e guardadas em laminário (-20°C) até o momento de uso.

3.4.4 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) - cães

A RIFI foi realizada conforme a técnica utilizada pelo Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, de Belo Horizonte, MG; para diagnóstico de animais infectados por *L. infantum*, adaptada por (OLIVEIRA et al., 2008).

As lâminas contendo promastigotas de *L. Infantum* foram retiradas do “freezer” e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno foram dispensados 10 µL de cada soro teste diluído na concentração de 1:40. As lâminas, então, foram incubadas em câmara úmida e levadas à estufa (37°C), por 30 minutos, e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão de cinco minutos cada. Após a secagem à temperatura ambiente, os círculos das lâminas foram recobertos com 10 µL do anticorpo anti-IgG de conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (KPK cat nº 02-19-02), diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1%.

As lâminas foram novamente incubadas por mais 30 minutos e depois lavadas, conforme descrito acima. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão, carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e, posteriormente, foram observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus®, BX-FLA). Após a leitura em microscópio, foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluição $\geq 1:40$.

3.4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) - gatos

A RIFI foi realizada conforme a técnica descrita por (CAMARGO, 1966).

Microplacas foram utilizadas para a diluição inicial de 190 µL de solução de PBS 0,01M com pH 7,2 e 10 µL do soro para uma diluição inicial (primeira diluição) de 1:20. Posteriormente, distribuiu-se 100 µL da primeira diluição em 100µL de solução de PBS para obter uma diluição de 1:40 (segunda diluição), a qual foi

utilizada para a triagem da reação. Da mesma forma, foram diluídos soros controles positivo e negativo. Nas lâminas fixadas com o antígeno de *L. infantum*, distribui-se 10 µL de soro diluído (segunda diluição), incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS por 10 minutos, e secadas em estufa.

O conjugado espécie-específico (Anti gato IgG FITC, Sigma®, USA), foi diluído segundo título pré-estabelecido em solução de Azul de Evans a 20%, no qual foi previamente diluído em PBS na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10 µL do conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C, por 30 minutos, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 10 minutos e secas em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínulas de 24x60mm, examinando-se em microscópio de imunofluorescência (Olympus®, BX-FLA) na objetiva de 40x. Depois da leitura dos controles, foi realizada a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se positivas as amostras de soro com titulação igual ou maior que 1:40. Os soros positivos na diluição 1:40 foram avaliados em diluições maiores (1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em gatos.

3.4.6 Bioquímica sérica

O sangue de cães foi coletado em frascos sem anticoagulante e em seguida centrifugado após a formação do coágulo, em centrífuga, a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi levado ao analisador automático (Cobas c111®, Roche), para determinação de parâmetros bioquímicos, como uréia, creatinina, aspartatoaminotransferase (AST), alaninoaminotransferase (ALT), proteínas totais (PT), albumina (A), globulina (G) e relação A/G. Cada análise foi determinada utilizando-se kits específicos, seguindo a metodologia estabelecida de acordo com o fabricante. Antes da realização da rotina, utilizou-se soro controle padrão, para assegurar a confiabilidade dos exames. A função hepática e renal dos cães foi avaliada através das dosagens de ALT (kit ALT2S, ref. 04657373), AST (kit ASTL, ref. 04657543), uréia (kit UREAL, ref. 04657616) e creatinina (kit CREJ2, ref.

05401755), utilizando o sistema Cobas ® c111 Analyser (Roche Instrument Center – SUIÇA, nº série 10276, cod. 4528778001).

3.5 EXAME DE SANGUE

3.5.1 Hemograma completo

O sangue total com EDTA foi processado em analisador hematológico automático (Sysmex pochH-100iV™), após a coleta, para obtenção do valor de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas. O valor do volume globular (VG) foi obtido pela leitura de microcapilar, após centrifugação do sangue total em microcentrífuga (Microline®, Laborline). Os índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de VG, hemoglobina, eritrócitos e comparados com valores normais para cães.

3.6 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (REAÇÃO DE MONTENEGRO)

3.6.1 Metodologia da reação de Montenegro

A reação de Montenegro foi realizada conforme a técnica descrita por (SOKAL, 1975).

Uma suspensão de antígenos foi preparada a partir de promastigotas de *L. infantum* na concentração de 4×10^8 parasitos/mL, fixadas com solução de mertiolate (1:10.000). Foi aplicado um volume de 100 µL do antígeno, por via intradérmica, em uma área previamente depilada da região lateral do pescoço de cada animal. Como controle negativo, foi aplicada a solução de mertiolate (1:10.000) por via intradérmica, do lado oposto do pescoço. A observação da reação dérmica foi realizada após 24, 36 e 72 horas, mas a formação nodular da reação de hipersensibilidade tardia, só foi confirmada após 72 horas pela formação de um eritema ou nódulo. Com o uso de paquímetro a área foi mensurada e o animal que apresentou uma reação nodular com o dobro da área inicial foi considerado positivo

para resposta imune celular específica para *L. infantum*. Antes da aplicação foi feita uma leve tricotomia e desinfecção do local.

3.6.2 Amostragem da reação de Montenegro

A reação intradérmica de Montenegro foi realizada apenas em uma parcela de cães da terceira coleta de sangue, correspondendo a 33 animais, divididos em animais positivos sintomáticos e assintomáticos, e negativos sintomáticos e assintomáticos nos exames sorológicos (Tabela 2). A classificação dos animais em sintomático e assintomático foi realizada a partir dos sinais clínicos visíveis associados com as alterações dos exames de hemograma e bioquímico. Entre as alterações dos exames típicos de LVC nos animais sintomáticos foram hiperproteinemia associada a anemia, trombocitopenia, e diminuição do valor da albumina (LOPEZ et al., 1996; MEDEIROS et al., 2008; CASTRO, 2012).

Na Tabela 2 encontram-se os dados de perfis dos cães que foram utilizados para a realização da reação intradérmica de Montenegro, ou seja, a reação de hipersensibilidade tardia.

Tabela 2- Número de cães sintomáticos e assintomáticos utilizados para realização da reação intradérmica de Montenegro. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de Cães para a Reação de Montenegro			
Diagnóstico Sorológico	Sintomáticos (N=28)	Assintomáticos (N=5)	TOTAIS (N=33)
Positivo	9	1	10
Negativo	19	4	23

3.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Antes da coleta do material biológico, todos os animais passaram por anamnese médica veterinária. Foi observado primeiramente o escore da condição corporal, que foi definido como obeso, gordo, magro ou caquético (LAFLAMME, 1997). A caracterização da pele (normal, alopecia, lesões), coloração das mucosas

(bucal, genital e ocular), tamanho das unhas, palpação dos linfonodos (poplíteos, pré-escapular e submandibular) e temperatura corporal também foram determinados.

Por meio da avaliação clínica, os animais foram classificados em assintomáticos quando não havia alteração clínica da LV e em sintomáticos quando apresentavam ao menos um sinal clínico característico da doença. Nos cães, a classificação foi baseada em Feitosa et al. (2000) e, em gatos, de acordo com sinais clínicos relatados por (PENNISI et al., 2004; SAVANI et al., 2004).

3.8 COLETA DE FLEBOTOMÍNEOS

As capturas de flebotomíneos (*L. longipalpis*) foram realizadas em ambos abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, por meio de armadilhas luminosas do tipo Center for Disease Control and Prevention (CDC) distribuídas em oito pontos diferentes, sendo quatro pontos por abrigo (Figuras 5 e 6), das 17 às 07 horas, durante três dias consecutivos de cada mês, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2015. Foram instaladas em pontos estratégicos (próximas às baías dos animais, vegetação e material orgânico). Todas as armadilhas permaneceram no mesmo local durante todo o período de estudo.

Os flebotomíneos capturados foram agrupados por armadilhas e dia de captura, anotados em uma planilha (controle do período de maior incidência do vetor) e, posteriormente, separados quanto ao sexo e identificados quanto à espécie através de caracteres morfológicos da genitália.

Os mosquitos foram dissecados e foi observado microscopicamente o conteúdo intestinal para verificar a presença de promastigotas de *L. infantum*. Os intestinos foram macerados entre lâmina e lamínula e observado diretamente no microscópio óptico (aumento de 400x).

Figura 5- Fotos mostrando os pontos de localização de armadilhas CDC para captura de flebotomíneos em abrigo A de animais. **A:** Casa; **B e C:** Próximas à baía dos cães; **D:** Próxima à vegetação. Ilha Solteira, SP, 2015.



Fonte: o próprio autor

Figura 6- Fotos mostrando os pontos de localização de armadilhas CDC para captura de flebotomíneos em abrigo B de animais. **A:** Próxima à casa; **B:** Próxima à baía dos gatos; **C** e **D:** Próximas à vegetação. Ilha Solteira, SP, 2015.



Fonte: o próprio autor

3.9 QUESTIONÁRIO

Durante o trabalho, foram feitas observações do ambiente físico e dos animais e um questionário foi aplicado aos responsáveis dos dois abrigos de animais (Apêndices A e B). O levantamento de dados possibilitou averiguar as condições ambientais onde os animais estudados habitavam, assim como as características dos animais (sexo, porte, pelagem, localização, etc) no decorrer das três coletas.

3.10 DADOS CLIMÁTICOS

Os dados climáticos tais como temperatura média mensal e precipitação pluviométrica foram obtidos da Estação Agrometeorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP – Campus de Ilha Solteira, SP –, durante o período de janeiro de 2014 a dezembro de 2015.

3.11 ESTATÍSTICA

Os diagnósticos do ELISA, RIFI e reação de Montenegro foram submetidos à análise estatística, onde foi verificada a concordância entre eles de acordo com o índice Kappa no intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. Os valores obtidos foram classificados de acordo com Landis Jr; Koch (1977).

Tabela 3- Classificação dos valores de Kappa de acordo com Landis Jr; Koch (1977).

Estatística Kappa	Qualidade de Classificação
<0,00	Péssima
0,00 – 0,20	Ruim
0,21 – 0,40	Razoável
0,41 – 0,60	Boa
0,61 – 0,80	Muito boa
0,80 – 1,00	Excelente

Para a análise dos fatores de riscos associados à LV nos abrigos de animais de Ilha Solteira- SP, foi utilizada a análise univariada por meio do teste de Qui-quadrado e o teste exato de Fisher (significância $p \leq 0,05$). O teste exato de Fisher foi utilizado quando os valores das caselas foram menores que cinco, pois o grau de certeza na decisão tomada não foi exatamente aquele fornecido pela distribuição Qui-quadrado.

As variáveis independentes foram as respostas obtidas do questionário aplicado aos responsáveis pelos animais, as observações do ambiente, os dados sobre os animais levantados durante as coletas e a presença dos flebotomíneos. A

variável dependente foi a positividade dos cães para LVC. As análises foram feitas no programa R versão 2.15.3 (R CORE TEAM, 2015).

3.12 COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia da UNESP de Ilha Solteira, em reunião ordinária realizada em 29 de abril de 2015, sob o número de Protocolo N° 02/2015/CEUA.

4 RESULTADOS

4.1 CÃES

4.1.1 Levantamento epidemiológico

Participaram do estudo 146 cães distintos, sendo 113 pertencentes ao abrigo A e 33 ao abrigo B. Durante as coletas de dados, os cães foram agrupados de acordo com as características como sexo, porte e localização no abrigo conforme a Tabela 4.

Os animais machos foram os mais representativos nos abrigos, correspondendo à 52,8% do total de cães. Quanto ao porte dos cães, a maioria era de tamanho médio (40,4%), seguido de porte pequeno (32,1%) e grande (27,5%). Do total, 77,3% eram mantidos no interior de baias enquanto 22,7% ficavam livres no perímetro do abrigo.

Tabela 4- Número (N) e porcentagem (%) de cães de acordo com o sexo, porte e localização em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e porcentagem (%) de cães		
Categorias		Total (N=146)
Sexo	Fêmea	69 (47,2%)
	Macho	77 (52,8%)
Porte	Pequeno	47 (32,1%)
	Médio	59 (40,4%)
	Grande	40 (27,5%)
Localização	Baia	113 (77,3%)
	Solto	33 (22,7%)

4.1.2 Fluxo de cães

Os dois abrigos de animais recebiam quase diariamente animais abandonados, e eventualmente faziam doações de alguns deles, principalmente os mais saudáveis. Esses dois fatores foram responsáveis pela variação diária de animais em cada abrigo estudado. Na primeira coleta, haviam 55 cães no abrigo A, e após seis meses, na segunda coleta verificou-se a entrada de 39 cães novos e apenas 9 cães eram antigos (remanescentes), ou seja, apenas 16,3% dos cães da coleta inicial estavam presentes, verificando-se uma taxa de reposição de cães de 83,7%.

Na terceira coleta, foram encontrados 18 novos cães e 25 remanescentes, de modo que a taxa de reposição de cães diminuiu para 48%, ou seja, 52% dos cães da coleta anterior ainda estavam no abrigo (Tabela 5).

No abrigo B a quantidade de cães foi menor em relação ao abrigo A. Um total de 15 cães estavam abrigados no local na primeira coleta de material biológico. Após seis meses, durante a coleta 2, verificou-se a presença de 11 novos cães, e dos 15 cães da coleta anterior apenas cinco (33,3%) ainda estavam abrigados, apresentando taxa de reposição de 66,6% dos animais.

Finalmente, na coleta 3, haviam 14 cães e, destes sete eram animais novos e os outros sete remanescentes da coleta anterior. Assim como no abrigo A, a taxa de

reposição reduziu. Neste caso, cerca de 43,7% dos animais eram remanescentes, portanto correspondendo à uma reposição de 56,3% (Tabela 6).

Tabela 5- Número de cães repostos no intervalo de um ano no abrigo A. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de Cães do Abrigo A			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Cães remanescentes	55	9	25
Cães novos	-	39	18
Total	55	48	43

Tabela 6- Número de cães repostos no intervalo de um ano em abrigo B. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de Cães do Abrigo B			
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Cães remanescentes	15	5	7
Cães novos	-	11	7
Total	15	16	14

É necessário salientar que durante o estudo, 192 amostras foram analisadas, pois animais remanescentes das coletas anteriores poderiam ser incluídos na coleta seguinte. Dessa forma, na primeira, segunda e terceira coletas foram analisadas amostras de 70, 64 e 58 animais, respectivamente. As análises a seguir foram baseadas nestas 192 amostras.

4.1.3 Sinais clínicos

Pela anamnese realizada, os cães foram classificados em assintomáticos e sintomáticos de acordo com os sinais clínicos para LVC. Foram classificados como assintomáticos 21,3% (41/192) dos animais, ou seja, não apresentaram qualquer sinal clínico evidente para a doença. Dos cães analisados, 78,7% (151/192) apresentavam algum sintoma característico para LVC.

Dos 70 animais encontrados na primeira coleta, 75,7% (53/70) apresentavam pelo menos um sinal clínico para LVC, sendo que na segunda e na terceira coletas houve respectivamente, o aumento de 76,5% (49/64) e 84,4% (49/58) de sinais clínicos em cães. Estes dados estão representados na Tabela 7.

Entre os sinais clínicos observados, pode-se citar, alopecia, magreza, caquexia, lesões perioculares, linfadenomegalia, onicogribose, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões dérmicas, mucosas hipocoradas e atrofia da musculatura craniana (Figura 7).

Tabela 7- Número (N) e porcentagem (%) de cães assintomáticos (A) e sintomáticos (S) para LVC em três coletas realizadas com um intervalo de um ano em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Número e Porcentagem de Cães Assintomáticos (A) e Sintomáticos (S)			
Número da Coleta	Classificação		(N total=192)
	S	A	Cães por coleta
1	53 (75,7%)	17 (24,3%)	N=70
2	49 (76,5%)	15 (23,5%)	N=64
3	49 (84,4%)	9 (15,6%)	N=58

Figura 7- Fotos de cães sintomáticos para LVC, mostrando alguns sinais clínicos. **A:** Lesão periocular; **B:** Magreza; **C:** Lesões de pele (rarificação pilosa); **D:** Onicogrifose. Ilha Solteira, SP, 2015.



Fonte: o próprio autor

4.1.4 Diagnóstico

4.1.4.1 Exame ELISA indireto

O exame sorológico ELISA foi realizado com soros coletados em três etapas diferentes. Portanto, os resultados ELISA dos soros controles negativos e positivos e o cálculo do ponto de corte foram obtidos individualmente para cada etapa de coleta (Apêndice C). Na etapa 1, correspondente à primeira coleta, o ponto de corte (PC) foi o valor de D.O $\geq 0,149$ e NE ≥ 2 (intervalo de D.O de 0,120 a 0,150). Na etapa 2, referente à segunda coleta, o PC foi de D.O $\geq 0,318$ e NE ≥ 2 (intervalo de D.O entre

0,287 e 0,361). E na etapa 3, o ponto de corte foi de soros com D.O \geq 0,39 e NE \geq 1 (intervalo de D.O entre 0,313 e 0,422).

Dos 192 cães analisados durante o estudo, 17,2% (33/192) foram sorologicamente positivos para LVC pelo método ELISA. Dos cães positivos, 57,6% (19/33) estavam na primeira coleta, 24,4% (8/33) na segunda coleta, e na terceira foram apenas 18% (6/33).

Dos cães da primeira coleta 2, 7,2% (19/70) apresentaram sorologia positiva para *L. Infantum*. Na segunda coleta, 12,5% (8/64) foram positivos para leishmaniose visceral, e na terceira coleta a porcentagem de cães positivos reduziu para 10,34% (6/58). Os dados estão ilustrados na Tabela 8.

Os níveis ELISA de acordo com a positividade dos cães foram avaliados de acordo com as coletas. Na primeira coleta, a maioria dos animais encontrava-se no NE 9 (n=11). Já na segunda coleta os cães apresentaram NE=2, 3 e 9, como os mais frequentes (n=2). Na terceira coleta o NE mais frequente foi o NE=3 (n=3), seguido pelo NE=6 e pelo NE=4 (Apêndice D).

Tabela 8- Número (N) e porcentagem (%) de cães negativos e positivos no ELISA Indireto para LVC de acordo com o período de coleta e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Cães				
Diagnóstico	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Total
Positivo	19 (27,2%)	8 (12,5%)	6 (10,3%)	33 (17,2%)
Negativo	51 (72,8%)	56 (87,5%)	52 (89,7%)	159 (82,8%)
Total	70 (100%)	64 (100%)	58 (100%)	192 (100%)

4.1.4.2 Exame RIFI

Dos 192 cães analisados durante o estudo, 19,8% (38/192) foram sorologicamente positivos para LVC pelo exame de RIFI. Dos cães positivos, 52,7% (20/38) estavam na primeira coleta, 26,4% (10/38) na segunda coleta, e na terceira encontrou-se 20,9% (8/38) dos cães (Tabela 9). O ponto de corte foi de 1:40.

Dos cães da primeira coleta 28,6% (20/70) apresentaram sorologia positiva para *L. Infantum*. Na segunda coleta 15,6% (10/64) foram positivos para LV, e na terceira coleta a porcentagem de cães positivos reduziu para 13,7% (8/58) do total de cães analisados. Os dados estão ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9- Número (N) e porcentagem (%) de cães negativos e positivos na RIFI para LVC de acordo com o período de coleta e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.

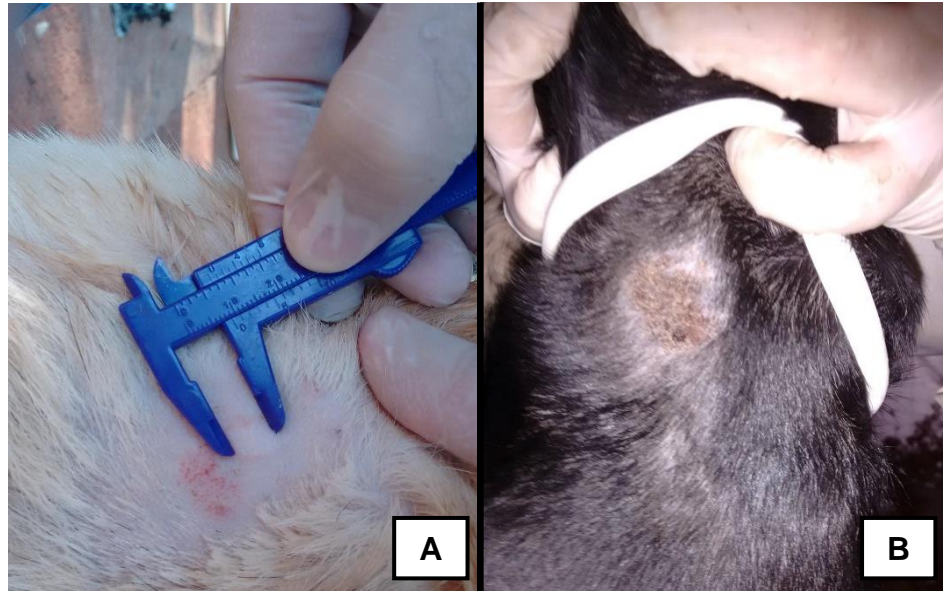
Número (N) e Porcentagem (%) de Cães				
Diagnóstico	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Total
Positivo	20 (28,6%)	10 (15,6%)	8 (13,7%)	38 (19,8%)
Negativo	50 (71,4%)	54 (84,4%)	50 (86,3%)	154 (80,2%)
Total	70 (100%)	64 (100%)	58 (100%)	192 (100%)

4.1.4.3 Reação intradérmica de Montenegro (RM)

Dos 33 cães avaliados na reação intradérmica de Montenegro, 45,4% (15/33) deles reagiram positivamente e 54,6% (18/33) negativamente. Dos animais positivos neste diagnóstico, 86,6% (13/15) apresentavam alterações clínicas de LVC enquanto 13,4% (2/15) eram assintomáticos. Em relação aos animais negativos para a reação intradérmica, 83,3% (15/18) foram sintomáticos e 16,7% (3/18) assintomáticos para LVC.

O diâmetro dos nódulos formados nos animais positivos variou de 12 a 34 mm após o período de 72 horas da inoculação do antígeno (Figura 8). A mensuração média dos nódulos após 24, 48 e 72 horas da inoculação do antígeno foi de 14,3 mm; 17 mm e 21,3 mm, respectivamente.

Figura 8- Fotos de cães durante a reação de hipersensibilidade tardia. **A:** Nódulo formado logo após a inoculação do antígeno de *Leishmania* sp.; **B:** Nódulo formado em um cão positivo após 72 horas da inoculação do antígeno. Ilha Solteira, SP, 2015.



Fonte: o próprio autor

Quanto a sintomatologia dos animais analisados durante o levantamento, dos 28 sintomáticos, 46,4% (13/28) foram diagnosticados positivamente enquanto 53,5% (15/28) negativamente. Dos cinco animais classificados como assintomáticos, 40% (2/5) reagiram ao teste intradérmico e o restante, 60% (3/5) foi considerado negativo (Tabela 10).

Tabela 10- Número (N) e porcentagem (%) de cães negativos e positivos na reação intradérmica de Montenegro. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Cães			
	Sintomáticos	Assintomáticos	TOTAIS
Diagnóstico	(N=28)	(N=5)	(N=33)
Positivo	13 (46,4%)	2 (40%)	15
Negativo	15 (53,6%)	3 (60%)	18

4.1.5 Análise comparativa entre os diagnósticos

Os dados da Tabela 11 mostram o número e porcentagem de cães positivos e negativos nas duas técnicas sorológicas, ELISA indireto e RIFI relacionado com a classificação assintomática ou sintomática dos cães. Observa-se que houve um número bastante representativo de animais sintomáticos, porém, negativos 79,5% no ELISA e 78,2% na RIFI. A maioria dos animais positivos possuía algum sintoma para LVC, sendo 20,5% (31/151) e 21,8% (33/151) animais, pelas técnicas ELISA e RIFI respectivamente. Dentre os animais assintomáticos 95,2% (39/41) e 87,8% (36/41) foram diagnosticados negativamente no ELISA e RIFI, respectivamente.

Tabela 11- Diagnóstico sorológico dos cães pelo ELISA indireto e pela RIFI, de acordo com a classificação clínica (sintomáticos e assintomáticos). Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Cães					
Exame Sorológico	Sintomáticos (N= 151)		Assintomáticos (N=41)		Positivos (N=192)
	P	N	P	N	
ELISA	31 (20,5%)	120 (79,5%)	2 (4,8%)	39 (95,2%)	33 (17,2%)
RIFI	33 (21,8%)	119 (78,2%)	5 (12,2%)	36 (87,8%)	38 (19,8%)

P=positivo; N=negativo.

Os três métodos diagnósticos utilizados no trabalho foram comparados de acordo com o índice de Kappa (nível de significância de 5%). Além da comparação entre técnicas, esta ferramenta estatística foi aplicada no grupo sintomático e assintomático.

Em relação aos três levantamentos sorológicos (ELISA e RIFI), a concordância entre os dois métodos foi distinta nas três coletas realizadas, de modo que na primeira coleta o nível de concordância foi considerado boa com índice Kappa=0,5230769. Assim como na primeira etapa, a concordância na segunda coleta também foi boa, sendo k=0,418605, porém na terceira coleta o valor de k foi classificado como razoável, apresentando nível de concordância k=0,344356

(Tabela 12).

Tabela 12- Análise comparativa dos métodos sorológicos para LV em cães: ELISA indireto e RIFI de abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Relação de concordâncias entre os métodos de diagnósticos ELISA e RIFI						
COL	Técnicas		A (N=17)	S (N=53)	Índice Kappa (κ)	Total
1	ELISA x RIFI	P	2 (11,8%)	17 (32%)	0,5230769	19 (27,1%)
		N	15 (88,2%)	35 (66%)		50 (71,4%)
		D	0	1 (2%)		1 (1,5%)
	Total		17	53		70
Índice Kappa κ			0,1345151	0,371316	Boa	
			A (N=15)	S (N=49)	Índice Kappa (κ)	Total
2	ELISA x RIFI	P	0	8 (16,3%)	0,418605	8 (12,5%)
		N	14 (93,3%)	40 (81,6%)		54 (84,3%)
		D	1 (6,7%)	1 (2,1%)		2 (3,2%)
	Total		15	49		64
Índice Kappa κ			0,113859	0,335803	Boa	
			A (N=9)	S (N=49)	Índice Kappa (κ)	Total
3	ELISA x RIFI	P	0	5 (10,2%)	0,344356	5 (8,6%)
		N	7 (77,7%)	42 (85,7%)		49 (84,4%)
		D	2 (22,3%)	2 (4,1%)		4 (7%)
	Total		9	49		58
Índice Kappa κ			0,046643	0,321296	Razoável	

COL=coleta; A=assintomático; S=sintomático; P=positivo; N=negativo; D=distinto

Na comparação dos métodos sorológicos (MS) com a reação intradérmica de Montenegro (RM) realizada em uma parcela de cães da terceira coleta de material biológico, observou-se que o nível de concordância foi classificado como ruim ($k=0,0645$) (Tabela 13). Os cães selecionados para a comparação entre técnicas possuíam resultados idênticos nos diagnósticos sorológicos (RIFI e ELISA).

Tabela 13- Análise comparativa entre os métodos sorológicos (ELISA indireto e RIFI) e reação intradérmica de Montenegro para LVC em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Relação de concordâncias entre os métodos diagnósticos						
COL	Técnicas		A (N=5)	S (N=28)	Índice Kappa (κ)	Total
3	RM x MS	P	1 (20%)	4 (14,2%)	0,0645	5 (15,1%)
		N	3 (60%)	10 (35,8%)		13 (39,5%)
		D	1 (20%)	14 (50%)		15 (45,4%)
	Total		5	28		33
Índice Kappa κ			0,029	0,003	Ruim	

RM=Reação intradérmica de Montenegro; MS=Métodos sorológicos; COL=coleta; A=assintomático; S=sintomático; P=positivo; N=negativo; D=distinto.

4.1.6 Prevalência da LVC em abrigos de animais

Houve variações da prevalência de LVC em ambos abrigos de acordo com o período em que foram realizadas as coletas. No abrigo A, na primeira coleta, 36,3% (20/55) dos animais foram diagnosticados positivos em pelo menos uma técnica sorológica. A porcentagem de cães infectados diminuiu para 10,4% (5/48) na segunda coleta, porém aumentou para 16,2% (7/43) na terceira coleta (Tabela 14).

Os dados obtidos no abrigo B mostraram um aumento crescente da prevalência de LVC entre os cães. Na coleta 1, não houve cães positivos para leishmaniose. A partir da segunda coleta foi relatado diagnóstico positivo, sendo de 31,2% (5/16) e 21,4% (3/14) na coleta 2 e 3, respectivamente (Tabela 15).

Em parâmetros gerais, a prevalência de animais soropositivos no abrigo A foi de 21,9% (32/146) e no abrigo B 17,7% (8/46).

Tabela 14- Dinâmica da LVC em diferentes períodos durante um ano no abrigo de animais A. Ilha Solteira, SP, 2015.

	Abrigo A		Total
	Positivos	Negativos	
Coleta 1	20 (36,3%)	35 (63,7%)	55
Coleta 2	5 (10,4%)	43 (89,8%)	48
Coleta 3	7 (16,2%)	36 (83,8%)	43

Tabela 15- Dinâmica da LVC em diferentes períodos durante um ano, no abrigo de animais B. Ilha Solteira, SP, 2015.

	Abrigo B		Total
	Positivos	Negativos	
Coleta 1	0	15 (100%)	15
Coleta 2	5 (31,2%)	11 (68,8%)	16
Coleta 3	3 (21,4%)	11 (78,6%)	14

4.1.7 Taxa de infecção de cães remanescentes

Como já foi mencionado anteriormente, durante as coletas de amostras biológicas foi realizado um levantamento de cães presentes em ambos abrigos de animais. Além da quantidade de animais novos e remanescentes em cada etapa do trabalho, este levantamento possibilitou verificar a taxa de infectividade de cães remanescentes, ou seja, dados indicando que a infecção do animal por LVC ocorreu dentro do abrigo.

A Tabela 16 indica que, houve infecção com LVC no interior de ambos os abrigos. No abrigo A, durante a terceira coleta verificou-se que três cães remanescentes que eram sorologicamente negativos em coletas anteriores tornaram-se infectados. No abrigo B, na segunda coleta encontrou-se cinco animais remanescentes e destes, um foi positivo em pelo menos umas das técnicas sorológicas (ELISA ou RIFI). No mesmo local durante a terceira coleta, mais um animal foi infectado no interior do abrigo (Tabela 16).

Tabela 16- Número de cães remanescentes que se infectaram com LVC nos abrigos A e B de Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de Cães Remanescentes				
Coleta	Abrigo A		Abrigo B	
2	Total=48	P= 1	Total=16	P=1
	Rem= 9	N= 8	Rem=5	N=4
3	Total=43	P= 3	Total=14	P= 1
	Rem= 25	N= 22	Rem=7	N=6

Rem=remanescentes; P= positivo; N= negativo

4.1.8 Sinais clínicos em cães positivos

Dos 40 cães sorologicamente positivos para LVC nas três coletas, 32 estavam localizados no Abrigo A e os outros oito animais estavam no abrigo B. Os sintomas mais comuns nos animais positivos do abrigo A foram: Linfadenomegalia (poplíteo, submandibular e pré escapular), onde 62,5% (20/32) dos cães manifestavam esse sinal; em segundo, mucosas hipocoradas (genital, bucal e ocular) com 56,2% (18/32); e dermatite/dermatose 28,1% (9/32). Outros sintomas estavam presentes durante a anamnese, tais como magreza 21,8% (7/32), onicogrifose 25% (8/32), alopecia 25% (8/32), caquexia 9,3% (3/32), atrofia da musculatura cranial 9,3% (3/32), lesão periorcular 3,1% (1/32), hepatomegalia 3,1% (1/32) e esplenomegalia 6,25% (2/32) (Tabela 17).

Já no abrigo de animais B, composta por oito animais positivos durante todas as coletas, o número de sinais clínicos foi inferior em relação ao abrigo anterior, os sinais clínicos encontrados foram: onicogrifose em quatro dos oito animais, demonstrando uma prevalência de 50%; dermatite/dermatose e linfadenomegalia estavam presentes em 3/8 (37,5%) dos cães; e, por último, alopecia em apenas 1/8 (12,5%) dos animais (Tabela 17).

Em parâmetros gerais, ou seja, em relação aos 40 cães positivos em pelo menos uma técnica diagnóstica, o sinal clínico mais evidente foi linfadenomegalia, onde 57,5% (23/40) dos animais manifestaram esta alteração. Mucosas hipocoradas foram verificadas em 45% dos animais (18/40), seguido por onicogrifose e

dermatite/dermatose em 30% (12/40). O restante dos sinais foram: alopecia 22,5% (9/40), magreza 17,5% (7/40), caquexia e atrofia da musculatura cranial 7,5% (3/40), esplenomegalia 5% (2/40), lesão periocular e hepatomegalia 2,5% (1/40) (Tabela 17).

Tabela 17- Número (N) e porcentagem (%) de cães dos abrigos A e B, de acordo com os sinais clínicos para LVC. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Cães			
Sinais Clínicos	Abrigos		Geral (P=40)
	Abrigo A (P=32)	Abrigo B (P=8)	
Linfodenomegalia	20 (62,5%)	3 (37,5%)	23 (57,5%)
Magreza	7 (21,8%)	-	7 (17,5%)
Mucosas Hipocoradas	18 (56,2%)	-	18 (45%)
Onicogribose	8 (25%)	4 (50%)	12 (30%)
Alopecia	8 (25%)	1 (12,5%)	9 (22,5%)
Dermatite/Dermatose	9 (28,1%)	3 (37,5%)	12 (30%)
Caquexia	3 (9,3%)	-	3 (7,5%)
Atrofia de musc. cranial	3 (9,3%)	-	3 (7,5%)
Lesão periocular	1 (3,1%)	-	1 (2,5%)
Hepatomegalia	1 (3,1%)	-	1 (2,5%)
Esplenomegalia	2 (6,25%)	-	2 (5%)

P=positivos

4.2 GATOS

4.2.1 Levantamento epidemiológico

Durante o presente estudo, foram examinados um total de 164 gatos, onde 49 pertenciam ao abrigo A e 115 ao abrigo B. Dados como sexo e localização dos gatos foram observados durante o estudo. Desses, 57,9% (95/164) eram fêmeas e 42,1%

(69/164) machos. A maioria dos animais ficava abrigada em baias, correspondendo a 97,6% (160/164) enquanto somente 2,4% (4/164) permaneciam livres, mas dentro do recinto onde havia as baias (Tabela 18).

Tabela 18- Número (N) e porcentagem (%) de gatos de acordo com o sexo e localização em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Gatos		
Categorias		Total (N=164)
Sexo	Fêmea	95 (57,9%)
	Macho	69 (42,1%)
Localização	Baia	160 (97,6%)
	Solto	4 (2,4%)

4.2.2 Fluxo de gatos

Os dois abrigos de animais recebiam eventualmente gatos abandonados, alguns destes eram doados, no entanto, sempre em número inferior aos adquiridos. A taxa de reposição de animais era determinada por estes dois fatores.

Na primeira coleta foi observada a presença de 39 gatos no abrigo A. Após o período de um ano, 10 animais novos foram incluídos e apenas seis animais permaneciam no abrigo. Na coleta 2, havia apenas 16 animais, evidenciando-se, que em 12 meses a população de felinos reduziu em 59% decorrente de mortes em massa, um detalhe excepcional deste abrigo (Tabela 19).

Tabela 19- Número de gatos repostos no intervalo de um ano no abrigo A. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de Gatos do abrigo A		
	Coleta 1	Coleta 2
Gatos remanescentes	39	6
Gatos novos	-	10
Total	39	16

O número de gatos no abrigo B foi mais representativo comparado ao outro abrigo A. Durante a primeira coleta de amostras biológicas havia 55 animais e, posteriormente após 12 meses foi constatada a presença de 27 animais remanescentes, obtendo-se uma taxa de reposição de 49%. Ainda na segunda coleta, 60 gatos foram recém-adquiridos no abrigo (Tabela 20).

De acordo com os dados, a população de gatos aumentou 107% durante os 12 meses de observação no abrigo B.

Tabela 20- Número de gatos repostos no intervalo de um ano no abrigo B. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de Gatos do abrigo A		
	Coleta 1	Coleta 2
Gatos remanescentes	55	27
Gatos novos	-	60
Total	55	87

Durante as coletas de material biológico, os gatos remanescentes negativos de coletas anteriores foram incluídos na coleta mais recente, sendo, 94 e 103 animais da primeira coleta e segunda, respectivamente. Considerando esta informação, o número amostral foi de 197.

4.2.3 Sinais clínicos

Pelo exame clínico dos gatos realizado concomitante às coletas de sangue pode-se classificar os animais em sintomáticos e assintomáticos. Dos 197 animais examinados, 67,5% (133/197) foram considerados assintomáticos, ou seja, sem nenhum sinal clínico evidente para LVF. Já os animais sintomáticos representaram 32,5% (64/197) do total das análises.

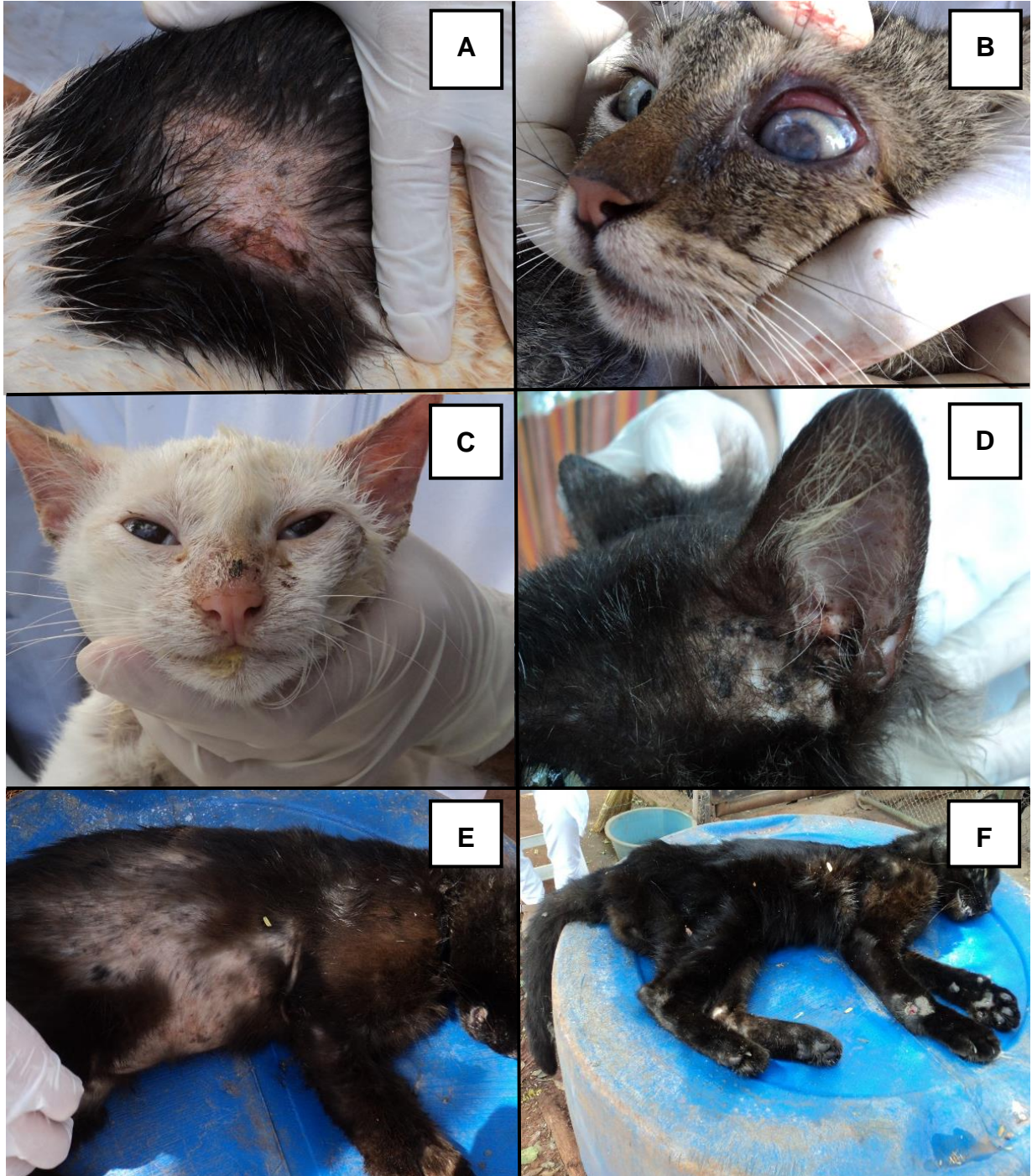
Pelo menos um sinal clínico da LVF foi observado em 30,8% (29/94) e 33,9% (35/103) dos animais, respectivamente na primeira e segunda coleta de sangue. A prevalência de sinais clínicos aumentou 3,6% entre as coletas. Os dados estão representados na Tabela 21.

Durante a anamnese dos animais verificou-se sinais clínicos como alopecia, magreza, lesão ocular, dermatite/dermatose, lesões em orelha, lesão periocular, mucosas hipocoradas e caquexia (Figura 9).

Tabela 21- Número (N) e porcentagem (%) de gatos assintomáticos (A) e sintomáticos (S) para LVF em duas coletas realizadas com um intervalo de um ano em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Número e Porcentagem de Gatos Assintomáticos (A) e Sintomáticos (S)			
Número da Coleta	Classificação		(N total=197)
	S	A	Gatos por coleta
1	29 (30,8%)	65 (69,2%)	N=94
2	35 (33,9%)	68 (66,1%)	N=103

Figura 9- Fotos de gatos sintomáticos para LVF, mostrando alguns dos sinais clínicos mais evidentes. **A:** Área alopécica com dermatite e formação de úlcera; **B:** Lesão ocular; **C:** Perda de pelos e formação de crostas em borda de orelhas e formação de crostas na região nasal; **D:** Dermatite crostosa na orelha; **E:** Alopecia; **F:** Magreza. Ilha Solteira, SP, 2015.



Fonte: o próprio autor

4.2.4 Diagnóstico

4.2.4.1 Exame ELISA indireto

O exame sorológico ELISA foi realizado em duas etapas devido ao intervalo entre as coletas. Portanto, o ponto de corte e os resultados ELISA dos soros controles negativos e positivos foram distintos nos diferentes exames (Apêndice E). Na etapa 1, correspondente à primeira coleta, o ponto de corte (PC) foi o valor de $D.O \geq 0,14$ e $NE \geq 3$ (intervalo de D.O de 0,141 a 0,169). Na etapa 2, referente à segunda coleta, o PC foi de $D.O \geq 0,06$ e $NE \geq 0$.

Dos 197 gatos analisados durante o estudo 32,4% (64/197) foram sorologicamente positivos para LVF pelo método ELISA. Dos gatos positivos, 46,8% (30/64) eram da primeira coleta e os demais, 53,2% (34/64) na segunda. Dos gatos da primeira coleta, 31,4% (30/94) apresentaram sorologia positiva para *L. Infantum*. Na segunda coleta, 33% (34/103) eram positivos para LVF. Nota-se que houve um pequeno aumento de gatos soropositivos na população dos abrigos (Tabela 22).

Tabela 22- Número (N) e porcentagem (%) de gatos negativos e positivos no ELISA Indireto para LVF de acordo com a coleta 1 ou 2 e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Gatos			
Diagnóstico	Coleta 1	Coleta 2	Total
Positivo	30 (31,4%)	34 (33%)	64 (32,4%)
Negativo	64 (68,6%)	69 (87,5%)	133 (67,6%)
Total	94 (100%)	103 (100%)	197(100%)

4.2.4.2 Exame RIFI

Do total de gatos diagnosticados durante o levantamento, 31,9% (63/197) reagiram positivamente ao exame RIFI. Dos animais positivos, 44,4% (28/63) encontravam-se na primeira coleta e 55,6% (35/63) eram animais da segunda coleta. Ainda na RIFI, cerca de 28,5% (28/94) dos gatos da primeira coleta estavam

positivos para LVF, enquanto que 33,9% (35/103) estavam na segunda coleta (Tabela 23).

Tabela 23- Número (N) e porcentagem (%) de gatos negativos e positivos na RIFI para LVF de acordo com o período de coleta e um parâmetro geral. Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Gatos			
Diagnóstico	Coleta 1	Coleta 2	Total
Positivo	28 (28,5%)	35 (33,9%)	63 (31,9%)
Negativo	66 (71,5%)	68 (66,1%)	134 (68,1%)
Total	94 (100%)	103 (100%)	197 (100%)

4.2.5 Análise comparativa entre os diagnósticos

A Tabela 24 mostra o número e a porcentagem de diagnósticos de gatos em cada uma das técnicas sorológicas relacionadas com sinais clínicos. A maioria dos animais positivos não apresentaram sequer um sinal clínico para LVF, sendo 57,8% no ELISA e 54,6% na RIFI. A porcentagem de animais sintomáticos e negativos também se destacou no estudo, sendo 79,7% no ELISA e 78,9% na RIFI.

O índice de Kappa foi calculado com nível de significância de 5% para a comparação das técnicas ELISA e RIFI. O índice também foi aplicado na comparação entre sintomático/assintomático e diagnósticos. O nível de concordância entre as técnicas sorológicas na primeira coleta foi $k=0,5230769$ e na segunda coleta $k=0,418605$, sendo classificadas como boas (Tabela 25).

Tabela 24- Diagnóstico sorológico dos gatos pelo ELISA indireto e pela RIFI, de acordo com a classificação clínica (sintomáticos e assintomáticos). Ilha Solteira, SP, 2015.

Número (N) e Porcentagem (%) de Gatos					
Exame Sorológico	Sintomáticos (N= 133)		Assintomáticos (N=64)		Positivos (N=197)
	P	N	P	N	
ELISA	27 (20,3%)	106 (79,7%)	37 (57,8%)	27 (42,2%)	64(32,4%)
RIFI	28 (21,1%)	105 (78,9%)	35 (54,6%)	29 (45,4%)	63 (31,9%)

P=positivo; N=negativo.

Tabela 25- Análise comparativa dos métodos sorológicos para LVF em gatos: ELISA indireto e RIFI de abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Relação de concordâncias entre os métodos de diagnósticos ELISA e RIFI						
COL	Técnicas	A (N=65)	S (N=29)	Índice Kappa (κ)	Total	
1	ELISA x RIFI	P	14 (21,5%)	13 (44,8%)	0,5230769	27 (28,7%)
		N	47 (72,3%)	16 (55,2%)		63 (67,1%)
		D	4 (6,2%)	0		4 (4,2%)
	Total	65	29	94		
Índice Kappa κ		0,4281525	0,17938	Boa		
2	ELISA x RIFI	P	17 (25%)	14 (40%)	0,418605	31 (30,1%)
		N	46 (67,6%)	19 (54,2%)		65 (63,1%)
		D	5 (7,4%)	2 (5,8%)		7 (6,8%)
	Total	68	35	103		
Índice Kappa κ		0,441762	0,202381	Boa		

COL=coleta; A=assintomático; S=sintomático; P=positivo; N=negativo; D=distinto

4.2.6 Prevalência da LVF em abrigos de animais

A prevalência de LVF durante as coletas foi distinta na comparação entre os dois abrigos. No abrigo A, 48,7% (19/39) dos animais foram diagnosticados positivos em pelo menos uma técnica sorológica. A porcentagem de gatos infectados aumentou para 68,7% (11/16) na segunda coleta. Assim como no abrigo anterior, também houve aumento em 10,7% da prevalência da leishmaniose no abrigo B na população felina, sendo esse aumento de 21,8% para 31,1% no intervalo de 12 meses (Tabelas 26 e 27).

Tabela 26- Dinâmica da LVF no período de um ano no abrigo de animais A. Ilha Solteira, SP, 2015.

	Abrigo A		Total
	Positivos	Negativos	
Coleta 1	19 (48,7%)	20 (51,3%)	39
Coleta 2	11 (68,7%)	5 (31,3%)	16

Tabela 27- Dinâmica da LVF no período de um ano no abrigo de animais B. Ilha Solteira, SP, 2015.

	Abrigo B		Total
	Positivos	Negativos	
Coleta 1	12 (21,8%)	43 (78,2%)	55
Coleta 2	27 (31,1%)	60 (68,9%)	87

4.2.7 Taxa de infecção de gatos remanescentes

Os dados levantados durante o estudo mostraram que gatos se infectaram com *L. infantum* no interior dos abrigos de animais de Ilha Solteira. De acordo com a Tabela 28, no abrigo A haviam 16 animais na segunda coleta, e desses, seis eram remanescentes da coleta interior, e um dos gatos foi posteriormente positivo para

leishmaniose. Já no abrigo B a infecção por *Leishmania* foi detectada em quatro gatos remanescentes da coleta 1.

Tabela 28- Número de gatos remanescentes que se infectaram com LVF nos abrigos A e B de Ilha Solteira, SP, 2015.

Número de infecções de gatos				
Coleta	Abrigo A		Abrigo B	
2	Total=16	P= 1	Total=87	P=4
	Rem= 6	N= 5	Rem=27	N=23

R=remanescentes; P=positivo; N=negativo

4.2.8 Sinais clínicos em gatos positivos

Um total de 69 gatos foram soropositivos em pelo menos uma técnica sorológica durante o intervalo de 12 meses. Cerca de 30 animais positivos pertenciam ao abrigo A e 39 gatos ao abrigo B.

Dentre os sinais clínicos verificados em gatos positivos no abrigo A os mais comuns foram magreza em 40% (12/30) dos felinos, seguido de alopecia em 10/30 deles (33,3%), lesões dérmicas em 23,3% (7/30), mucosas hipocoradas e lesão de orelha em 10% (3/30), caquexia e lesão ocular em um animal (3,3%). Por meio da anamnese dos animais do abrigo B foram observados sinais clínicos como mucosas hipocoradas em 10,2% (4/39), magreza, alopecia e lesão de orelha em 7,6%.

Em relação aos dados gerais de todos os gatos positivos o sinal clínico mais evidente foi magreza, encontrada em 21,7% (15/69) dos animais. Em segundo, alopecia em 18,8% (13/69), lesões dérmicas e mucosas hipocoradas em 10,1% (7/69), lesão de orelha em 4,3% (3/69), caquexia e lesão ocular em 1,4% (1/69) (Tabela 29).

Tabela 29- Número (N) e porcentagem (%) de gatos dos abrigos A e B, de acordo com os sinais clínicos para LVF. Ilha Solteira, SP, 2015.

Sinais clínicos em gatos positivos			
Sinais Clínicos	Abrigo		Geral (P=69)
	Abrigo A (P=30)	Abrigo B (P=39)	
Magreza	12 (40%)	3 (7,6%)	15 (21,7%)
Mucosas Hipocoradas	3 (10%)	4 (10,2%)	7 (10,1%)
Alopecia	10 (33,3%)	3 (7,6%)	13 (18,8%)
Lesões dérmicas	7 (23,3%)	-	7 (10,1%)
Caquexia	1 (3,3%)	-	1 (1,4%)
Lesão Ocular	1 (3,3%)	-	1 (1,4%)
Lesão de orelha	3 (10%)	3 (7,6%)	3 (4,3%)

P=positivo

4.3 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE FLEBOTOMÍNEOS

Foram coletados 131 flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* no período de janeiro/2014 a dezembro/2015 em ambos abrigos de animais. O local com maior quantidade de mosquitos foi no abrigo A, onde foram capturados 71,7% (94/131) dos espécimes, enquanto no abrigo B foram encontrados 28,3% (37/131) dos mosquitos.

Dos 131 flebotomíneos coletados, 77,8% (102/131) eram machos e 22,2% (29/131) fêmeas.

Em relação aos pontos estratégicos onde foram montadas as armadilhas luminosas, o ponto 3, localizado próximo à baía dos cães e à matéria orgânica no abrigo A, foi o local onde houve maior número de capturas de flebotomíneos representando 59,5% (78/131) do total.

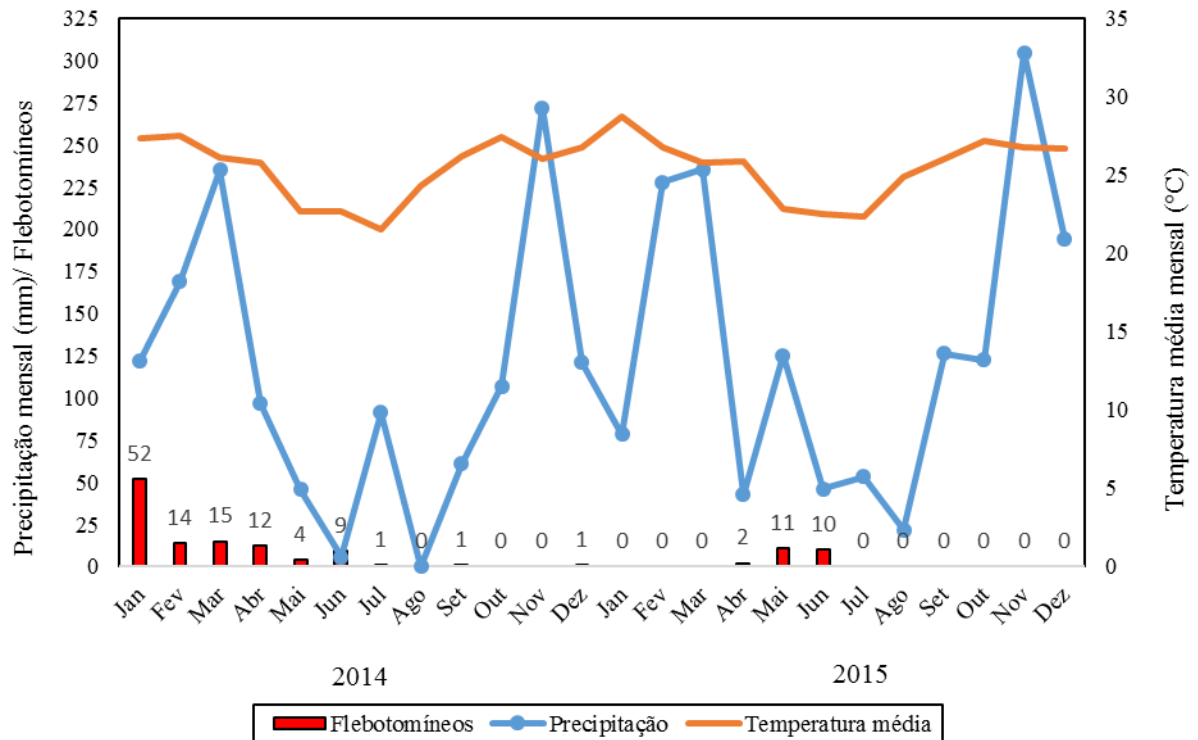
Em pontos próximos à vegetação (4, 7 e 8) foram capturados 33 flebotomíneos, correspondendo a 25,2% do total de insetos capturados durante o estudo. Nos pontos localizados próximos às baias dos cães (ponto 8) e gatos (ponto 6) foram capturados 11 flebotomíneos, representando 8,39% da totalidade. No

ambiente peridomiciliar (pontos 1 e 5) foi onde se capturou o menor número de flebotomíneos 6,87% (9/131) do total.

A sazonalidade dos flebotomíneos durante o estudo está representada na Figura 10, nos quais foram considerados: o número total de insetos coletados mensalmente em todos os pontos de captura, a precipitação total mensal e a temperatura média de cada mês.

Alguns flebotomíneos foram dissecados e examinados, mas não foi encontrado até o momento a presença de promastigotas de *Leishmania* spp.

Figura 10- Variação estacional dos flebotomíneos de acordo com as mudanças de temperatura e precipitação pluviométrica em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.



Fonte: o próprio autor

4.4 LEVANTAMENTO DOS FATORES DE RISCOS NOS ABRIGOS DE ANIMAIS

Entre as variáveis relacionadas aos cães, foram consideradas estatisticamente significativas pela análise univariada: o porte do animal ($p=0,02608$), o uso de coleira de deltametrina ($p=0,03213$) e o diagnóstico precoce da LVC ($p=0,008965$).

A quantidade de animais de porte grande e pequeno era a mesma, correspondendo a 29,8% cada, seguido de cães de porte médio (40,3%). Deste modo animais de porte pequeno seriam mais susceptíveis à LVC que cães de porte médio ou grande, assim como cães que não utilizam a coleira de deltametrina e quando não há diagnóstico prévio da LVC nos abrigos de animais. Esses foram fatores que podem influenciar a ocorrência da doença nos locais estudados (Tabela 30).

Tabela 30- Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas aos cães associadas à soropositividade para LVC em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Variáveis	Categoria	Total (N=192)	Positivos (N=36)	Valor P
Sexo	Fêmea	90 (46,6%)	20 (55,5%)	0,2316
	Macho	102 (53,4%)	16 (44,5%)	
Porte	Pequeno	57 (29,8%)	16 (44,4%)	0,02608*
	Médio	78 (40,3%)	15 (41,6%)	
	Grande	57 (29,8%)	5 (14%)	
Localização	Solto	43 (22%)	4 (11,2%)	0,1161
	Baía	149 (78%)	32 (88,8%)	
Pelagem	Curta	155 (80,6%)	28 (77,7%)	0,7275
	Média	24 (12,6%)	6 (19,4%)	
	Grande	13 (6,8%)	2 (2,9%)	
Uso de coleiras de deltametrina	Sim	71 (36,7%)	16 (44,5%)	0,03213*
	Não	121 (66,3%)	20 (55,5%)	
Rotatividade	Sim	146 (76,4%)	30 (83,3%)	0,2793
	Não	46 (23,6%)	6 (16,7%)	
Diagnóstico	Sim	122 (63,4%)	16 (44,5%)	0,008965*
	Não	70 (36,6%)	20 (55,5%)	
Quarentena	Sim	146 (76,4%)	30 (83,3%)	0,2793
	Não	46 (23,6%)	6 (16,7%)	

*Significância $p \leq 0,05$

As variáveis restantes não foram estatisticamente significativas em relação à susceptibilidade dos cães à doença. A maioria dos cães era macho (53,4%). Quanto a localização, a maioria dos cães ficava acomodada em baias (78%) e uma pequena parcela solta nas dependências dos abrigos (22%).

A maioria possuía pelagem curta (80,6%), seguida de média (12,6%) e grande (6,8%). Em relação à rotatividade dos animais entre as baias e quarentena dos animais novos, a maioria não era submetida a estes manejos (76,4%).

Das cinco variáveis relacionadas ao ambiente nenhuma delas foi estatisticamente significativa na análise univariada (Tabela 31). A maioria dos cães (84,3%) estava presente nos recintos nos períodos em que os flebotomíneos foram capturados nas armadilhas. Assim como a maior parte de cães foi encontrada próximo à matéria orgânica (92,7%), galinheiro (76,4%) e chiqueiro (76,4%). Por outro lado, 23,6% do total dos animais viviam próximo a um córrego, enquanto a maioria não foi encontrada (76,4%) próxima a este fator de risco.

Tabela 31- Análise de correlação univariada de variáveis relacionadas ao ambiente associadas à soropositividade para LVC em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP, 2015.

Variáveis	Categoria	Total (N=192)	Positivos (N=36)	Valor P
Presença de Flebotomíneos	Sim	161 (84,3%)	30 (83,3%)	0.8605
	Não	31 (15,7%)	6 (16,7%)	
Presença de Matéria orgânica	Sim	177 (92,7%)	33 (91,6%)	0.7301
	Não	15 (7,3%)	3 (8,4%)	
Galinheiro	Sim	146 (76,4%)	30 (83,3%)	0.2793
	Não	46 (23,6%)	6 (16,7%)	
Chiqueiro	Sim	146 (76,4%)	30 (83,3%)	0.2793
	Não	46 (23,6%)	6 (16,7%)	
Córrego	Sim	46 (23,6%)	6 (16,7%)	0.2793
	Não	146 (76,4%)	30 (83,3%)	

5 DISCUSSÃO

5.1 LEVANTAMENTO DE LV EM CÃES NOS ABRIGOS

Até o final de 2011, para o diagnóstico sorológico dos cães, os métodos ELISA e RIFI eram recomendados nos levantamentos epidemiológicos. Atualmente, os métodos diagnósticos da LVC recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses, são o teste imunocromatográfico DPP® (“Dual Path Platform”) como triagem e o ELISA como método diagnóstico confirmatório (BRASIL, 2013). Pacheco et al. (2014) afirmaram que o diagnóstico atual apresenta desempenho semelhante ao anterior, e ambos diagnósticos não demonstram boa acurácia em animais assintomáticos. Portanto, se faz necessária a associação de técnicas diagnósticas, já que os resultados dos exames são influenciados pela evolução da doença no animal e a resposta imune do cão (SILVA et al., 2014; QUEIROZ et al., 2010). Para o presente trabalho, utilizou-se os testes ELISA e RIFI pela disponibilidade na rotina laboratorial.

A soroprevalência de animais positivos para LVC variou de 17,7% a 21,9% de acordo com o abrigo estudado, considerado inferior à prevalência dessa doença que foi de 89% no mesmo abrigo de animais, mas observada em levantamentos anteriores (SILVA et al., 2014). Uma possível explicação para uma prevalência inferior poderia ser a prática da eutanásia dos animais positivos e a utilização de coleiras de deltametrina que começaram a ser adotadas nos presentes abrigos, a partir de então. Em outra pesquisa, também na área rural do mesmo município, Spada et al. (2014) verificaram uma prevalência sorológica de 31,25%, enquanto que em área urbana no mesmo município, a prevalência da LVC variou de 10 a 14%, de acordo com o bairro analisado (PAULAN et al., 2012), semelhantes aos resultados aqui obtidos.

A soropositividade para LVC em cães do abrigo A, que está localizado na área rural, foi de 21,9%, levemente superior à do abrigo B (17,7%) localizado na área periurbana. Igualmente, Almeida et al. (2012) verificaram que a soroprevalência para LVC em cães da área urbana foi de 18,8% e de 30,6% para cães de áreas rurais. Segundo Costa et al. (2007), a doença que estava altamente associada com

a permanência de indivíduos em áreas de mata, atualmente também é registrada em focos periurbanos e urbanos.

Outro fator impactante, de acordo com Palatnik e Day (2011), a LV está disseminando-se de áreas endêmicas para áreas não endêmicas pelo transporte de cães e as mudanças climáticas que permitem a distribuição geográfica e a sobrevivência dos flebotomíneos. Como observado durante o levantamento de dados do presente trabalho, a taxa de reposição de animais nos abrigos estudados foi elevada (83,7%), mas muitos cães foram adotados pela população e, em alguns casos, esses animais foram até levados para outras regiões não endêmicas do Brasil, possibilitando a disseminação do protozoário.

Há um crescimento considerável de casos desta doença em vários países da América do Sul, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos (ACARDI et al.; 2010; PALATNIK ; DAY, 2011). O trabalho de Paulan et al. (2012) reforçou a importância da capacidade de adaptação do vetor *L. longipalpis* ao ambiente peridomiciliar sem a necessidade da vegetação como papel importante na dinâmica epidemiológica da doença, podendo assim se estabelecer em diferentes ambientes.

Atualmente, as estratégias de controles adotadas no Brasil incluem o controle dos insetos vetores, diagnóstico e tratamento precoce em humanos e triagem sorológica nos cães e, se necessária, a eutanásia de animais positivos para LV (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). Já Costa e Vieira (2001) defendem que a eutanásia de cães não é eficiente no controle da leishmaniose. No presente trabalho, verificou-se que a eutanásia utilizada como medida preventiva mostrou ser eficiente nesses abrigos, principalmente no abrigo A, quando observou-se uma redução da prevalência de 89% (SILVA et al., 2014) para 21,9% (presente levantamento), embora associado também à prática do uso de coleiras repelentes.

Apesar de observar a redução do número de casos da doença após a eutanásia, esta medida preventiva, no entanto, ainda é controversa quanto à sua eficácia no controle da LVC. Em primeiro lugar, porque mesmo com a eliminação dos cães positivos, ainda existe a transmissão da leishmaniose por outros animais em áreas endêmicas (ASHFORD et al., 1998). O segundo motivo é a taxa de reposição rápida dos cães eutanasiados (BRAGA et al., 1998), um fenômeno também observado no estudo representando taxa de reposição anual dos cães

acima de 66% em ambos abrigos. O terceiro motivo seria a respeito da eficiência do diagnóstico, pois ainda não existe um método 100% eficaz, permitindo que cães positivos e assintomáticos não sejam detectados nos exames (DYE; VIDOR; DEREURE, 1993). Além disso, normalmente há um grande período de tempo entre o diagnóstico e a eutanásia dos animais positivos (REITHINGER et al., 2002), que de certa forma poderia contribuir para a disseminação da LVC principalmente em locais superlotados de cães, como nos abrigos de animais.

No presente estudo, durante o intervalo de um ano seis cães infectaram-se no interior dos abrigos. Os fatores citados acima podem ter contribuído para o aumento da taxa de infecção destes cães remanescentes de ambos os abrigos. Além disso, houve alta taxa de reposição de animais no interior dos abrigos, em decorrência de um grande número de cães normalmente abandonados pela população e que foram abrigados no interior destes dois recintos. Muitos desses animais poderiam já estar infectados quando foram capturados e introduzidos nestes locais. Uma vez em contato com os demais, poderiam estar disseminando a doença. Além disso, era frequente a presença de animais silvestres nas proximidades destes abrigos, como por exemplo os gambás (*Didelphis marsupialis*), contribuindo para a infecção dos possíveis flebotomíneos presentes nos locais.

O uso das coleiras repelentes de deltametrina utilizadas nos cães destes abrigos podem também ter contribuído de alguma forma para a diminuição dos casos positivos para LVC em relação aos estudos realizados em anos anteriores (SILVA et al., 2014) e também em relação ao presente estudo, onde observou-se uma redução de sororeagentes entre o primeiro e o segundo levantamento em cães do abrigo A. Da mesma forma, os resultados obtidos por Camargo-Neves, Rodas e Pauliquévis (2004) realizados no município de Araçatuba-SP apontaram a efetividade da utilização das coleiras de deltametrina associadas a outras medidas preventivas, como a eutanásia de cães. A utilização da coleira também obteve sucesso em experimentos realizados em vários países (KILLICK-KENDRICK et al., 1997), como a repelência e a letalidade de diferentes espécies de flebotomíneos (LUCIENTES, 1999). No Irã, a taxa de prevalência de *L. infantum* reduziu em 69% em cães após 12 meses de utilização da coleira (GAVGANI et al., 2002). Novos estudos devem ser realizados para entender o impacto desta medida preventiva na

disseminação da leishmaniose visceral.

Os sinais clínicos mais evidentes nos cães sintomáticos para a LVC foram alopecia, magreza, linfadenomegalia e onicogrifose. Muitos destes sinais clínicos foram também constatados em um outro estudo realizado no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no município de Ilha Solteira- SP, como mucosas hipocoradas, esplenomegalia, fígado ictérico, linfonodos hipertróficos, onicogrifose, dermatites, alopecia periocular, lesões na ponta dos pavilhões auriculares, descamação, hipotricose e crostas em diferentes partes do corpo (QUEIROZ et al. 2010). A manifestação de sintomas da LV depende das condições imunológicas do cão e da fase da doença; assim, cães parasitados não necessariamente manifestam sinais clínicos. Os sintomas tornam-se evidentes a partir de um mês pós-infecção, ou até anos, mas quando manifestados perpetuam até a morte do animal (GENARO, 1993; PALATNICK-DE- SOUZA et al., 2001). A sintomatologia da LVC está associada à atuação de linfócitos T efetores. Entre as alterações imunológicas encontradas incluem a redução de linfócitos T no sangue periférico, ausência de produção de citocinas (interferon gama e interleucina-2) pelas células mononucleares e ausência de hipersensibilidade do tipo IV ao antígeno (BARBIÉRI, 2006).

No presente estudo, a maioria dos cães apresentava ao menos um sinal clínico típico da LVC, de modo que, 78,6% (151/192) dos animais eram sintomáticos. Da mesma forma, no estudo realizado em um abrigo de animais abandonados, Silva et al. (2014) observaram que a maioria dos cães (82,1%) apresentava sinais clínicos de LVC. Os abrigos estudados aqui, por não terem muitas condições financeiras, não ofereciam o bem-estar adequado aos animais, como o espaço físico adequado, uma alimentação rica em nutrientes, além da falta de medicamentos básicos, que de certa forma poderiam ser fatores desencadeantes do comprometimento da integridade do sistema imunológico dos cães, não só em relação à LV mas também às outras doenças. Além disso, uma infecção simultânea por outro agente parasitário ou infeccioso poderia acarretar alterações no quadro sintomático desses animais (SHAW et al., 2000). Uma possível explicação para uma alta prevalência de animais sintomáticos no presente estudo, seria a superlotação dentro das baias, a falta de medicamentos adequados e das condições de higiene precárias.

No entanto, uma pequena parcela de animais infectados não manifestou

nenhum sinal clínico, observação também vista em um estudo comparativo de métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em Ilha Solteira- SP realizado por Assis et al. (2010), dos oito cães assintomáticos, apenas um foi soropositivo para *Leishmania* sp. Em estudo realizado na Europa, onde foi realizado um levantamento epidemiológico da LVC, foi verificado que aproximadamente metade dos animais soropositivos não apresentava sinais clínicos (GRADONI et al., 1980). Embora a taxa de infecção de um cão positivo infectado seja maior (TRAVI et al., 2001), já foi confirmado que cães positivos e assintomáticos também são reservatórios de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente atuam ativamente no ciclo da doença (PALATNICK- DE-SOUZA et al., 2001).

Quando se analisou a concordância entre os métodos ELISA e RIFI pelo índice Kappa, verificou-se que os dois métodos sorológicos utilizados no presente estudo obtiveram uma concordância boa. No entanto, para um diagnóstico eficiente, seria necessário a associação de técnicas (ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010). Durante um levantamento de LVC em um abrigo de animais de Ilha Solteira, SP, Silva et al. (2014) avaliaram as técnicas sorológicas em relação ao método imunocromatográfico e parasitológico direto, e os resultados mostraram que o ELISA foi o teste que detectou maior número de cães positivos, com prevalência de 71,6%, seguido pela RIFI (65,7%), teste imunocromatográfico (55,2%) e, por último, o parasitológico (40,3%). Nesse estudo, o imunocromatográfico não foi muito eficiente nos cães assintomáticos em relação aos outros métodos testados.

5.2 LEVANTAMENTO DE LV EM GATOS NOS ABRIGOS

Dentre os mamíferos susceptíveis à leishmaniose, o gato doméstico é um deles. Por ser considerado um “pet” e ter uma relação estreita com os seres humanos, é importante entender o seu papel no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral.

As técnicas diagnósticas utilizadas no estudo epidemiológico de leishmaniose felina foram baseadas nas técnicas utilizadas pelo Ministério da Saúde para inquérito canino, utilizadas também em outros trabalhos sobre a leishmaniose felina (VITA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006). Dos animais examinados,

67,5% (133/197) foram considerados assintomáticos, e os sintomáticos representaram 32,5% (64/197) do total das análises. Durante a anamnese dos animais, verificou-se sinais clínicos como alopecia, magreza, lesão ocular, lesões dérmicas, lesões em orelha, lesão periorcular, mucosas hipocoradas e caquexia. Por esses animais estarem confinados em um pequeno espaço, poderia haver a possibilidade de brigas que originassem lesões faciais e corporais. Além disso, de acordo com Costa et al. (2010), são necessários outros exames para descartar a possibilidade dos sintomas serem oriundos de outras causas não específicas da doença em questão. Já foram relatados casos de co-infecções da *L. infantum* com o vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), coronavírus (FCoV) e *Toxoplasma gondii* (PENNISI et al., 2012; SHERRY et al., 2011; VICENTE SOBRINHO et al., 2012). Além disso, a leishmaniose em gatos pode estar associada às infecções imunossupressoras, tais como FIV e FeLV (GREVOT et al., 2005; VICENTE SOBRINHO et al., 2012). No entanto, exames diferenciais para detectar as doenças mencionadas acima não foram realizados na presente pesquisa.

Dos 197 gatos analisados durante o estudo, 32,4% (64/197) foram sorologicamente positivos para LVF pelo método ELISA e 31,9% (63/197) reagiram positivamente ao exame RIFI; estes resultados foram superiores aos achados no estudo de Miró et al. (2014), onde a soroprevalência por infecção de *L. infantum* em gatos errantes na Espanha foi de 3,2% (11/346) do total de gatos analisados durante o estudo. Em área endêmica para LV no Brasil, Costa et al. (2010) relataram a soroprevalência de 11,5% em gatos, enquanto Silva et al. (2008) verificaram a positividade de 25% em gatos domésticos assintomáticos no Rio de Janeiro. A maioria dos 197 gatos estava presa e concentrada em áreas de pequenas dimensões que não possibilitava o comportamento natural e estavam sujeitos ao ataque dos flebotomíneos, o que seria a causa dessa intensa infecção entre os animais.

As taxas de prevalência de infecção felina com *L. infantum* em estudos sorológicos ou de base molecular podem variar de 0% a 68,5% em locais endêmicos do velho mundo (PENNISI et al., 2015). Cardoso et al. (2010) afirmaram que a soroprevalência da infecção por *Leishmania* em gatos é menor que em cães nos mesmos locais, porém, no presente estudo a porcentagem de soroprevalência de

gatos positivos foi maior que em cães, ou seja, de 32,4%, mostrando que o protozoário e o vetor estão adaptando-se rapidamente a espécies diferentes de hospedeiros. Savani et al. (2004) relacionaram a susceptibilidade dos gatos com a imunodeficiência natural adquirida.

Em relação ao ambiente onde os animais estavam inseridos, o abrigo A foi o local com maior índice de animais positivos, chegando a 68,7% do total de gatos infectados durante a segunda coleta de sangue. Este abrigo estava situado em área rural do município, com presença de matéria orgânica em abundância favorecendo um ambiente propício ao vetor. No levantamento de flebotomíneos realizado na presente pesquisa constatou-se a presença desses insetos no abrigo A e também em um outro trabalho realizado por (SPADA et al., 2014). Concomitante à presença do vetor, nesse mesmo abrigo havia cães infectados com LVC em 21,9% deles, um outro fator importante para a infecção dos felinos nesse recinto.

Alguns estudos realizados na Síria e Itália, sugeriram o gato como um potencial reservatório na transmissão da LV, pois foram encontrados parasitas similares no sangue dos gatos e no intestino dos vetores, que se contaminaram ao realizar repasto sanguíneo (MAROLI et al., 2007; LONGONI et al., 2012; VICENTE SOBRINHO et al., 2012). Recentemente, no Brasil, por meio do xenodiagnóstico, Silva et al. (2010) demonstraram a infecção de um flebotomíneo (*L. longipalpis*) por *L. infantum* após o mosquito ter realizado o repasto sanguíneo em um gato, uma importante evidência de que os gatos, podem ser transmissores da doença e atuarem como reservatórios e fonte de infecção de LV. Pela infecção natural, Coelho et al. (2010) relataram a presença de formas amastigotas de *Leishmania* em um gato doméstico do município de Andradina-SP por meio de técnica parasitológica (*imprint*) de linfonodo poplíteo. Diante destes relatos, é necessário mais estudo para se conhecer o papel dos gatos na disseminação da leishmaniose não apenas em abrigos de animais, mas também nos ambientes domésticos, sendo fonte de infecção à população humana. A falta de diagnóstico em áreas endêmicas subestima o risco de transmissão da doença para os flebotomíneos, podendo contribuir com o ciclo do parasito com a transmissão da doença em humanos e outros animais.

Durante a anamnese nos gatos positivos, verificou-se a presença de sinais clínicos tais como magreza (21,7%), alopecia (18,8%), e lesões dérmicas (10,1%), especialmente na região facial dos gatos. O mesmo foi observado por Bonfante-Garrido et al. (1996), de modo que as regiões mais afetadas nos felinos foram a cabeça (75%), o nariz (48%), a orelha (26%) e região ocular (18,6%). Em alguns estudos, foi relatado que os sinais clínicos cutâneos em gatos naturalmente infectados com *Leishmania* sp. encontravam-se geralmente no focinho, orelhas ou em ambos (CRAIG et al., 1986). As lesões dermatológicas podem servir de ferramentas na triagem de gatos infectados em áreas endêmicas como ocorreu nos estudos de Vides et al. (2011), que observaram uma prevalência de 49% de gatos positivos de uma população com problemas dermatológicos oriundos de abrigos.

No entanto, o aparecimento de sintomas oriundos da infecção por *Leishmania* é menos frequente em gatos se comparado aos cães (CARDOSO et al., 2010; COSTA et al., 2010). Este fato foi observado também no presente estudo, com a maioria de cães positiva e sintomática, enquanto que, a maior parte dos gatos soropositiva não possuía qualquer sinal clínico para LVC. Apenas 21,7% dos gatos do estudo manifestaram ao menos um sinal clínico. O fato da maioria dos felinos sorologicamente positiva não expressar nenhum tipo de sintoma, sugere que esses animais podem responder imunologicamente de forma diferente dos cães. Outros autores sugeriram que em áreas endêmicas para LVC, pode ocorrer um alto índice de gatos infectados sem apresentarem sintomas por possuírem maior resistência à doença, provavelmente relacionada aos fatores genéticos e assim passarem despercebidos pela população (KIRKPATRICK; FARRELL; GOLDSCHMIDT, 1984; MANCIANTI, 2004).

Durante a rotina de coleta de material biológico dos gatos do abrigo A foi observada a presença de triatomíneos na baia dos gatos, que provavelmente faziam repasto sanguíneo nos animais, existindo a possibilidade de estarem infectados com *Trypanosoma* spp. Pelo fato de serem protozoários da mesma família, pode ter ocorrido reações cruzadas nos exames sorológicos entre os anticorpos felinos com *Leishmania* e *Trypanosoma* (LONGONI et al., 2012). As amostras de soro não foram testadas para outros antígenos, havendo a possibilidade de ocorrência de outros

tipos de infecções concomitantes ou não, como relatado em cães por (FERREIRA et al., 2007).

Assim como observado na análise dos cães, o nível de concordância entre os dois testes sorológicos foi considerado bom. O aprimoramento de técnicas diagnósticas mais sensíveis e específicas nos últimos anos proporcionou um aumento de casos relatados de leishmaniose em gatos, porém ainda há poucas informações sobre a epidemiologia e clínica da doença nesse grupo de animais (ROUDEBUSH et al., 2004).

5.3 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (REAÇÃO DE MONTENEGRO)

A reação intradérmica de Montenegro, que detecta a hipersensibilidade tardia ou celular, é considerado um teste com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose que, aliado a facilidade de execução e baixo custo, fez com que seu uso fosse difundido desde a década de 19 (MONTENEGRO, 1926; MARZOCHI, 1992). O teste é amplamente utilizado no diagnóstico de leishmaniose tegumentar e inquéritos epidemiológicos de humanos de áreas endêmicas para leishmaniose visceral (CALDAS et al., 2002). No entanto, ainda não é uma prática nos levantamentos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina.

No caso dos caninos, durante a realização da intradermorreação, observou-se que o diâmetro dos nódulos formados nos animais positivos variou de 12 a 34 mm, com a média de 21,3 mm no período de 72 horas após a inoculação do antígeno, representando uma média elevada se comparada à média de 13 mm verificada em um estudo realizado por Reis et al. (2008), onde efetuaram a reação de Montenegro em cães que foram inoculados por duas espécies de *Leishmania* para detectar a leishmaniose tegumentar. Esses dados indicam uma reatividade celular, onde existe o envolvimento de células de memória do sistema imunológico (linfócito T) no processo de infecção. Este tipo de reação de hipersensibilidade tardia poderia ser utilizado também como método diagnóstico de infecção de várias espécies de *Leishmania* (MARZOCHI; BARBOSA-SANTOS, 1988), incluindo a *L. infantum*, como abordado na presente pesquisa.

Dos cinco animais assintomáticos, dois (40%) apresentaram reações de

hipersensibilidade tardia, enquanto no inquérito sorológico apenas um desses foi positivo, ao contrário dos resultados de Silva (2007), onde uma pequena parcela (4,5%) dos indivíduos sadios foi positiva na reação intradérmica para leishmaniose tegumentar. Esse teste poderia ser utilizado no diagnóstico complementar de animais assintomáticos e suspeitos para LVC, em áreas endêmicas. Dos 33 animais diagnosticados, 15 foram positivos na reação intradérmica de Montenegro enquanto apenas 10 foram positivos no diagnóstico sorológico, além disso, o nível de concordância entre os dois testes foi considerado ruim. A diferença nos resultados diagnósticos entre os testes aplicados no estudo está relacionada ao tipo de resposta imune do animal. Sabe-se que humanos na fase aguda da doença não respondem à reação de Montenegro, pois esta fase está relacionada com a ativação de células B e T, e com a indução da resposta humoral, com produção de elevados títulos de imunoglobulinas inespecíficas (IgM e IgG), que possuem pouca importância no controle da infecção. Desta forma, os linfócitos destes animais não produzem IFN- γ e IL-2, e quando estimulados pelo antígeno não ativam os macrófagos para destruição destes, mas sim os fatores séricos já presentes a fim de suprimir a resposta proliferativa (BARRAL et al., 1986; LIEW FY; O'DONNELL, 1993; ANAM et al., 1999).

Na presente pesquisa, os animais sintomáticos apresentaram uma positividade à reação intradérmica de 46,3%, enquanto que os assintomáticos de 40%, ou seja, dados muito próximos, o que não deveria ocorrer, pois sabe-se que os animais assintomáticos desenvolvem uma resposta imune celular muito mais significativa ao contrário dos sintomáticos em que a resposta imune humoral prevalece sobre a celular (FERRER, 1999). No entanto, o número de animais (n=5) assintomáticos da presente pesquisa era muito inferior aos de sintomáticos (n=28), o que pode ter contribuído para esse resultado. Mais estudos deverão ser realizados no futuro, onde o número de assintomáticos seja equivalente ao de sintomáticos.

Nos estudos de Caldas et al. (2004), através da dosagem de citocinas, foi possível observar o aumento na produção de IFN- γ em humanos com LV quando apresentavam melhora clínica. Isso justificaria o resultado negativo da reação de Montenegro para 53,5% dos cães com sinais clínicos para LVC, na presente pesquisa, pois os animais não apresentavam melhora clínica. O semelhante foi

encontrado nos estudos de Akuffo et al. (1995), onde foram testadas preparações comerciais de *Leishmania* para o diagnóstico de leishmaniose cutânea, e concluíram que o antígeno inserido na pele mostrou apenas 50% de positividade em pacientes doentes, porém obteve resultados satisfatórios no diagnóstico de pacientes curados (92%). No entanto, no presente trabalho, isso não foi observado, pois somente 40% dos cães assintomáticos estavam positivos nessa reação intradérmica, contra 60% de negativos. Mas, novamente, vale a ressalva de que o número de cães assintomáticos era muito inferior aos sintomáticos, o que justificaria tal resultado.

5.4 LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS

Dos 131 exemplares de flebotomíneos da espécie *L. longipalpis* coletados nos dois abrigos de animais, o abrigo A, representou com 71,7% dos espécimes, enquanto no abrigo B foram encontrados apenas 28,3%. Em um levantamento de flebotomíneos realizado em 12 propriedades na mesma área rural em que o abrigo A está inserido, durante o ano de 2013, Spada et al. (2014) coletaram 90 exemplares desses insetos, e este local foi um dos que apresentou a maior prevalência em concordância com essa pesquisa. Por se tratar de um local em área rural e com presença de matéria orgânica em decomposição em abundância, as condições de proliferação do mosquito foram maiores, aumentando a possibilidade de transmissão de LV, pois tanto os animais quanto os humanos por possuírem acesso a estes ambientes podem estar igualmente vulneráveis à infecção por LV.

A LV era originalmente associada com o contato do indivíduo com a mata, mas nos últimos 20 anos, a urbanização da LV tem levado a doença a se tornar problema de saúde pública no Brasil. De acordo com Lainson e Rangel (2005) e Costa et al. (2007), entre os fatores que contribuem para a expansão da LV, pode-se citar as mudanças nas condições ambientais consequentes da destruição do habitat associadas ao desmatamento e urbanização crescente, favorecendo o crescimento populacional do flebotomíneo.

No presente trabalho, constou-se que embora o abrigo A estivesse na área rural, o mesmo não era distante do perímetro urbano e o abrigo B, localizava-se no ambiente periurbano. No entanto, em ambos os locais, havia ausência de matas e

havia uma tendência de urbanização devido a presença de residências humanas em suas proximidades.

Sabe-se que presença de animais domésticos no peridomicílio atrai flebotomíneos, que associado com as condições precárias de higiene podem favorecer o crescimento da população destes insetos aumentando o risco de transmissão de *Leishmania spp.* (FORATTINI, 1976; XIMENES; SOUZA; CASTELLÓN, 1999). Por conta disso, os abrigos de animais estudados poderiam desempenhar um papel importante na manutenção da LV no município de Ilha Solteira, por apresentar os animais infectados associados com a presença dos insetos vetores.

A presença também de animais de criação (suínos, bovinos e galinhas) próximos ao abrigo A associada à matéria orgânica em abundância frequentemente encontrada nesses locais, podem ter sido responsáveis pelo aumento da densidade destes insetos. Em seus estudos, Souza et al. (1981) capturaram 1585 flebotomíneos durante um levantamento entomológico próximo aos locais de criação de animais no Rio de Janeiro, assim como no levantamento entomológico realizado em Minas Gerais por Saraiva et al. (2006), o maior número de flebotomíneos foi em abrigo de animais (54,7%), em concordância com os dados aqui obtidos. Na presente pesquisa, o ponto 3, localizado próximo às baias dos cães associado à maior abundância de matéria orgânica, o abrigo A foi o local com a maior captura de flebotomíneos, ou seja, 59,5% do total. De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 1997) e Spada et al. (2014) os flebotomíneos *L. longipalpis* geralmente são encontrados predominantemente em locais com presença de grande quantidade de matéria orgânica no solo.

Do total de flebotomíneos *L. longipalpis* encontrados, 77,8% eram machos e 22,2% fêmeas, semelhante ao observado no levantamento de flebotomíneos de Souza et al. (1981) onde o percentual de machos foi três vezes maior que o de fêmeas, sendo de 86,1% e 13,9%, respectivamente. Da mesma forma, no levantamento realizado por Spada et al. (2014) na área rural de Ilha Solteira- SP, o número de machos representou 72,2% e o de fêmeas 27,8%, ou seja, o número de machos foi 2,5 vezes maior. A diferença de proporção macho e fêmea poderia ser atribuída ao comportamento de dispersão das fêmeas para a realização do repasto

sanguíneo, à oviposição e à diferença da taxa de mortalidade (CHANIOTIS et al., 1971).

Em relação à sazonalidade, o mês de janeiro de 2014 apresentou o maior número de flebotomíneos, sendo de 39,6% (52/131), possivelmente explicada pela alta temperatura (27,9°C) e precipitação pluviométrica alta (267,5 mm) do mês anterior (dezembro/2013) que está de acordo com os trabalhos que relataram o aumento do número de flebotomíneos após períodos de chuva (MICHALSKY et al., 2011; SPADA et al., 2014). Com a chegada do outono e posteriormente inverno do ano de 2014, houve uma drástica redução da população dos flebotomíneos, devido à queda de temperatura, com média de 23,4°C e da redução do volume de chuvas durante esse período, com 239 mm apenas. No entanto, no ano seguinte, os períodos que são tipicamente chuvosos, (outubro a abril) apresentaram precipitação pluviométrica anormal para estação (primavera-verão), ou seja, foi um ano de poucas chuvas para o período, sendo apenas de 120,9 mm e 78,5 mm, respectivamente para o mês de dezembro de 2014 e janeiro de 2015 e dessa forma houve uma quantidade também inferior desses insetos. Em seguida, quando o índice pluviométrico aumentou entre fevereiro e março de 2015, o desenvolvimento dos flebotomíneos foi adiado para o mês de abril, onde constou-se o aumento desses insetos.

Semelhante aos dados obtidos aqui, em outras pesquisas, foi verificado que a densidade de flebotomíneos e os fatores abióticos estão fortemente relacionados, já que interferem no ciclo evolutivo e nos sítios reprodutivos desses dípteros. As precipitações favorecem o desenvolvimento dos flebotomíneos pois possibilitam o crescimento das vegetações e incrementa a quantidade de matéria orgânica (RESENDE et al, 2006). Como pode ser constatado, em Três Lagoas, MS, os flebotomíneos estiveram presentes em praticamente todos os meses do ano. Ao longo do tempo, essa distribuição apresentou um padrão anual de abundância irregular, provavelmente pela intermitência das condições climáticas, com picos de aumento populacional, seguindo com algum atraso dos períodos chuvosos (até mesmo pequenos volumes de precipitação no outono/inverno) e temperaturas entre 22 e 28° C na maior parte do ano (OLIVEIRA et al., 2010).

Dessa forma, os resultados da presente pesquisa em concordância com as de

outros autores reforçam a tese que de fato a população de flebotomíneos vetores da LV está vulnerável à variação climática, podendo flutuar durante o ano. Se houver condições ideais de matéria orgânica para o seu desenvolvimento, com bastante umidade e temperaturas altas, sua população só tende a aumentar.

5.5 ANÁLISE DOS FATORES DE RISCOS

Os animais do presente estudo, por estarem em abrigos estavam sujeitos a alta vulnerabilidade à LVC, por conviverem em locais onde poderiam existir vários fatores de riscos potenciais às infecções. Pelas observações realizadas durante o estudo, os cães eram distribuídos em baias pequenas, onde ficavam concentrados em pequenas áreas e havia um grande fluxo de animais abandonados procedentes de várias partes da cidade. Além disso, a localização dos abrigos em ambientes ricos em matéria orgânica, como matas e córregos, era perfeita para procriação do vetor.

Por meio da aplicação de um questionário e pelas observações diretas do ambiente e dos cães durante as coletas de material, foi possível realizar uma análise dos fatores de riscos relacionados à positividade para LVC. Os resultados dos exames sorológicos (RIFI e ELISA) realizados durante as três coletas de material biológico obtiveram uma concordância boa, como já discutido anteriormente, e por este motivo foram considerados para determinar a soropositividade dos cães, bastando um ser positivo. Dentre as oito variáveis relacionadas aos cães, três foram consideradas estatisticamente significativas pela análise univariada ($p < 0,05$): o porte do animal ($p=0,02608$), o uso de coleira de deltametrina ($p=0,03213$) e o diagnóstico precoce da LVC ($p=0,008965$).

Muitas variáveis não foram consideradas pois todos os cães estavam submetidos as ações destas, e não foi possível fazer a análise estatística. Por exemplo, quanto à origem dos animais: 100% deles eram procedentes de Ilha Solteira. Outras variáveis, como a utilização de citronela, banhos nos animais, vacinas contra a LVC, eutanásia dos cães positivos, uso de piretróides, cadastro de todos os cães e tratamento da LV, não foram relatadas pelos responsáveis dos abrigos. Já as variáveis: acompanhamento veterinário, outras doenças, presença de

animais silvestres e presença de fragmento de mata, foram todas relatadas positivamente no questionário.

De acordo com a análise, os cães de porte pequeno seriam mais susceptíveis à infecção por *Leishmania*. Dos 36 cães positivos, 16 (44,4%) possuíam porte pequeno, ao contrário dos estudos de Galvez et al. (2010) e Spada (2014) onde a soroprevalência para LVC aumentava de acordo com o porte do animal, indicando que os cães de porte grande eram mais vulneráveis. Os animais eram acomodados em baias de acordo com o porte e afinidade com os outros cães. Desta maneira, muitos animais de porte pequeno conviviam numa mesma área, ocasionando uma superlotação, enquanto que o espaço físico oferecido para os cães de porte grande era maior e também havia menor quantidade dos mesmos, o que pode ter possibilitado uma maior contaminação dos animais pequenos em relação aos maiores.

Como já foi relatado anteriormente neste estudo, a utilização de coleira de deltametrina foi considerada determinante na proteção contra a infecção por *Leishmania*, já que a maioria dos 36 animais positivos para LVC não utilizava a coleira (55,5%), possivelmente pela repelência do vetor flebotomíneo. Foram relatados flebotomíneos em um dos abrigos desde os trabalhos de Spada et al. (2014). O mesmo resultado foi observado em outros estudos realizados em vários países, onde a utilização de coleiras com deltametrina foi satisfatória, pois mostrou redução das taxas de repasto sanguíneo do flebotomíneo e alta letalidade desses insetos (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; LUCIENTES, 1999). Na Itália, as coleiras repelentes foram responsáveis pela proteção de 86% cães de áreas tratadas com este método preventivo (MAROLI et al., 2001). Com base nesses resultados, a coleira de deltametrina poderia ser utilizada como um método no controle da LV em áreas endêmicas, junto com outros programas, incluindo o inquérito sorológico, a eutanásia e o controle vetorial.

O diagnóstico precoce da LVC nesses abrigos foi outra variável que estava correlacionada com susceptibilidade do animal à infecção por *Leishmania*. Um total de 20/36 (55,5%) dos animais soropositivos não foram submetidos à um inquérito sorológico no momento em que estavam nos abrigos, concordando com o que já havia sido discutido anteriormente em relação à triagem sorológica nos cães que é,

atualmente, uma das estratégias de controle adotadas no Brasil (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). O inquérito sorológico canino seria de extrema importância destacadamente, em áreas endêmicas, principalmente onde já houve relato de prevalência de LVC mesmo nos cães assintomáticos (ASSIS et al., 2010). Além disso, são necessários levantamentos periódicos dessa enfermidade na população canina para que se antecipem as ações profiláticas, pois já é sabido que os casos caninos da doença precedem os casos humanos (OLIVEIRA et al., 2001). A proximidade desses locais com as residências urbanas ou rurais podem representar um grande risco para a disseminação da LV para a população humana do município de Ilha Solteira.

O sexo dos cães não foi considerado uma predisposição à doença no presente estudo, pois não foi significativa nas análises estatísticas realizadas no presente trabalho, semelhante a outros estudos dessa natureza (FRANÇA-SILVA et al., 2003; NAVEDA et al., 2006). Dos 192 cães analisados no estudo, a maior parte era de machos (53,4%), no entanto a maioria dos animais soropositiva para LVC era de fêmeas, correspondendo a 55,5% dos casos positivos, diferentemente dos trabalhos de Dantas-Torres, Brito e Brandão-Filho (2006) e Julião et al. (2007), que observaram infecção mais intensa nos machos. Apesar de divergir de outros estudos, a presente pesquisa revela a transformação das características epidemiológicas da LVC, relatada também no levantamento realizado por Amóra et al. (2006), onde ocorreu maior positividade entre as fêmeas, principalmente as que eram encontradas em área rural. Considerando que uma parte da pesquisa foi feita em um abrigo situado na área rural do município de Ilha Solteira- SP.

Dos 36 animais positivos, 30 (83,3%) deles viviam próximos à galinheiros e chiqueiros mantidos por moradores próximos ao abrigo A. Assim como Nunes (2007), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a positividade na sorologia para LVC e a presença de outros animais. Apesar de que em Pernambuco foi constatado que a criação de aves em torno das moradias poderia atuar como uma barreira para a infecção por LV, diminuindo os flebotomíneos nas residências e aumentando nos galinheiros (COSTA, 2011). A maioria dos trabalhos considera a criação de animais um fator de risco à LVC, dentre eles, destaca-se o levantamento realizado por Spada et al. (2014), verificando

que a presença de galinhas era um fator de risco para LVC em área rural, pois dos 82 cães soropositivos, 60 (73,1%) conviviam em propriedades que continham galinhas, assim como (RODRIGUES et al., 1999).

A criação de outros animais próximo ao abrigo A, de certa forma favoreceria a atração e manutenção do vetor no local, devido ao aumento da matéria orgânica propícia para o desenvolvimento do flebotomíneo. Cerca de 33/36 (91,6%) dos animais soropositivos foram encontrados em locais com presença de matéria orgânica abundante, como fezes, restos de comida, folhas de árvores, frutas em decomposição, entre outros. Mas esses fatores não foram considerados fatores de risco no presente estudo. A matéria orgânica poderia favorecer o desenvolvimento dos insetos vetores e manutenção da doença (FEITOSA et al., 2000), como foi discutido anteriormente, no abrigo A a quantidade de casos positivos de LVC e flebotomíneos destacou-se em relação ao abrigo B.

6 CONCLUSÕES

- A soroprevalência da LVC para cães foi 17,2% pelo método ELISA e 19,8% pela RIFI. A concordância entre as técnicas sorológicas foi classificada de razoável a boa dependendo da etapa da coleta.
- A soroprevalência da LVF foi de 32,4% e 31,9% no ELISA e RIFI, respectivamente. Os métodos apresentaram concordância boa entre si.
- Houve infecção de gatos e cães por LV no interior de ambos os abrigos de animais no período estudado, mesmo estando com coleiras;
- Pela reação intradérmica de Montenegro, 45,4% dos cães reagiram positivamente ao teste. A concordância com as técnicas sorológicas foi considerada ruim.
- A espécie *L. longipalpis* foi capturada nos dois abrigos, durante os dois anos de levantamento, com maior concentração desses insetos nos locais com maior predominância de matéria orgânica, representando 59,5% dos insetos capturados.

- Dentre as variáveis relacionadas aos cães nos abrigos de animais, três foram consideradas fatores de riscos estatisticamente significantes ($P \leq 0,05$): o porte pequeno do animal, o uso de coleira repelente com deltametrina e o diagnóstico precoce da LVC.
- Pela análise estatística dos fatores de risco, o diagnóstico precoce da LV e o uso de coleiras repelentes foram fatores que influenciaram positivamente ($P \leq 0,05$) na diminuição de casos da LV nos dois abrigos estudados.
- Os animais desses abrigos estavam vulneráveis a LV pela presença de vetores e de animais infectados.

REFERÊNCIAS

- ACARDI, S. A.; LIOTTA, D. J.; SANTINI, M. S.; ROMAGOSA, C. M.; SALOMÓN, O. D. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR RFLP and sequencing-based confirmation assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 6, p. 796-9, 2010.
- AKUFFO, H.; DARCE, M.; MAASHO, K.; BERHAN, T. Y. In vivo evaluation of immune responses in leishmaniasis: the use of cross species leishmaniasis preparations for skin testing. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 53, n. 1, p. 16-22, 1995.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V.R.F.; CRUZ, F.A.C.S.; DAHROUG, M. A. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 359-365, 2012.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.
- AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.
- ANAM, K.; AFRIN, F.; BANERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S. K.; GOSWAMI, R. P.; GUPTA, P. N.; SAHA, S. K.; ALI, N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin g3 in indian kala-azar patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, New York, v. 6, n. 2, p. 231-235, 1999.
- ASHFORD, D. A. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR., R. H. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARÓ, R. Studies of control of visceral leishmaniasis: impacto of dogs control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 59, n. 1, p. 53- 57, 1998.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA-JUNIOR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, jan/mar. 2010.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniosis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BADARÓ R. Supression lymphocyte proliferative response by from patients with american visceral Leishmaniasis. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 35, n. 4, p. 735-742, 1986.

BONAMIGO, R.A.; OLIVEIRA, A. G. **Diagnóstico parasitológico de leishmania sp. em animais Silvestres**. Campo Grande: [s.n.], 2009. Disponível em: <<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=425>>. Acesso em: 30 abr 2014.

BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDIVIA, O.; TORREALBA, J.; GARCÍA, M. T.; GARÓFALO, M. M.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI-JUNIOR, G. Cutaneous leishmaniasis in cays (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (FCV-LUZ)**, Maracaibo, v. 6, n. 3, p. 187-190, 1996.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULIFFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, n. 5, p. 419-510, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. **Leishmaniose tegumentar americana no Brasil (Ferida Brava)**. Brasília: [s.n.], 1997. 39 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: [s.n.], 2003. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.180 p.

BRASIL. Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (Org.). **Guia de orientação para vigilância de leishmaniose visceral canina**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Material elaborado por grupo técnico intersectorial. Disponível em:

<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Vetores/leishmanioses/Guia_Básico_de_Orientacao_Leishmaniose_VisceralCanina.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2016.

BURNS JUNIOR, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, São Paulo, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.

CALDAS, A. J. M. **Marcadores de eficácia terapêutica na leishmaniose visceral humana em crianças e adultos**. 2004.147 f. Tese. (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

CALDAS, A. J. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, A. A. M.; VINHAS, V.; BARRAL, A. Risk factors associated with asymptomatic by *Leishmania Chagasi* in north-east Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 96, n. 1, p. 21-28, 2002.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 8, n. 5, p. 227-234, 1966.

CAMARGO-NEVES, V. F. L.; RODAS, L. A. C.; PAULIQUÉVIS, C. J. R. **Avaliação da Efetivação da Utilização de Coleiras Impregnadas com Deltametrina a 4% para o Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Resultados Preliminares**. [S.l.: s.n.], 2004. Boletim Epidemiológico Paulista, Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa12_lva.htm>. Acesso em: 2 jan. 2016.

CARDOSO, L. L. LOPES, A.P.; SHERRY, K.; SCHALLIG, H.; SOLANO-GALLEGO, L. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 37-42, 2010.

CARDOSO, S. P. **Leishmaniose visceral canina (LVC): revisão de literatura e estudo comparativo entre as técnicas de citopatologia, histopatologia e imunohistoquímica no diagnóstico da LVC em cães naturalmente infectados no Distrito Federal**. 2012. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CASTRO, I. P. **Lesões hepáticas na leishmaniose visceral canina: aspectos histopatológicos e bioquímicos**. 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

CHANIOTIS, B. N.; CORREA, M. A.; TESH, R. B.; JONHSON, K.M. Daily and seasonal man-biting activity of Phlebotomine sandflies in Panama. **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 8, n. 4, p. 415-420, 1971.

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

COSTA, C. H. N.; GOMES, R. B. B.; SILVA, M. R. B.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K. S.; SANTOS, R. S.; R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Competence of human host as reservoir for *Leishmania chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v.182, n. 3, p. 997-1000, 2000.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no combate de leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, P. L. **Comportamento da fauna de flebotomíneos, com ênfase em *Lutzomyia longipalpis*, em área endêmica para Leishmaniose Visceral, Agreste de Pernambuco**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) –Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

COSTA, S.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J.C.; LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 149-153, 2007.

COSTA, T. A. C. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010.

CRAIG, T. M; BARTON, C. L.; MERCER, S. H.; DROLESKEY, B. E.; JONES, L. P. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 35, n. 6, p. 1100-1102, 1986.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from na urban área of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F. L. C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 11, n. 61, p. 32-39, 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Sobral, v. 47, s/n, p. 75-87, 1955.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, Inglaterra, v. 110, n. 3, p. 647-656, 1993.

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

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine leishmaniasis in presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.146, n. 3-4, p. 235 - 241, 2007.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM,1.,1999, Barcelon. **Proceedings...**Barcelona: Hoeschst Roussel Vet., 1999. p. 6-10.

FORATTINI, O. P. Observações feitas sobre a transmissão da Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 31-43, 1976.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.111, n. 2-3, p. 161-173, 2003.

GALLATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO JUNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 378-390, ago 1997. ISSN 1518-8787. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/24301>>. Acesso em: 23 dez. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101997000400007>.

GALVEZ, R.; MIRO, G.; DESCALZO, M. A.; NIETO, J.; DADO, D.; MARTIN, O.; CUBERO, E.; MOLINA, R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 3-4, p. 327-334, 2010.

GAVGANI, A. S. M.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in

Iranian children: a matched-cluster randomized trial. **The Lancet**, Londres, v. 360, n. 9330, p. 374 – 379, 2002.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, Belo Horizonte, 1993.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Minas Gerais, v. 7, n.3, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L.; POZIO, E.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 74, n. 3, p. 421-2, 1980.

GREVOT, A.; JAUSSAUD- HUGUES, P.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; OZON, C; HAAS, P.; BRETON, C.; BOURDOISEAU, G. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, Paris, v.12, n. 1, p. 271-275, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 10 de janeiro de 2016**: censo populacional 2015. Brasília: Editora de Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/POP2015_DOU.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2016.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANJEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA JR., E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

KIERNAN, J. A. **Histological and histochemical methods**: theory and practice. 3. ed. London: Arnold, 2004. 502 p.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, C.; FOCHEUX, J.; DEREURE, M.; PUECH, P.; CADIÈGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomus sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 15 – 21, 1997.

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

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 22, n. 3, p. 10-15, 1997.

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

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

LAURENTI, M. D. **Patologias e patogenias das leishmanioses**. 2010. 112 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2010.

LEMESRE J. L.; DARCY F.; KWEIDER, M.; CAPRON, A.; SANTORO, F. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. **Acta Tropical**, Inglaterra, v. 45, n. 2, p. 99-108, 1988.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advances in parasitology**, London, v. 32, n. 1, p.162-222, 1993.

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

LONGONI, S. S; LÓPEZ-CESPEDES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; BOLILLO-GONZALEZ, M. E.; SAURI-ARCEO, C. H.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. L.; MARÍN, C. 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**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 469-76, 2012.

LOPEZ, R., LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, E.; MARTIN, E.; MOLLEDA, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Medicine Veterinary**, Berlim, v. 43, n. 8, p. 469-74, 1996.

LUCIENTES J. Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of *Phlebotomus perniciosus* with Scalibor® ProtectorBands: preliminary results: canine leishmaniasis: an update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, numero do evento, 1999, Barcelona. . **Proceedings...** Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet, 1999. P. 92 – 94.

LYNN, M. A.; MCMASTER, R. W. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 103-105, 2008.

- MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 1, n. 71, p. 50-58, 2007.
- MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, V. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.
- MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?. **Parasitologia**, Itália, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.
- MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.
- MAROLI, M.; MIZZONI, V.; SIRAGUSA, C.; D'ORAZI, A. D.; GRADONI, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medicine and Veterinary Entomology**, Londres, v. 15, n. 1, p. 358 - 363, 2001.
- MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. et al. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.
- MARZOCHI, M. C. A. As leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **JBM**, São Paulo, v. 63, n. 5-6, p. 81-105, 1992.
- MARZOCHI, M. C. A.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 391-392, 1988.
- MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. N. G.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, M. C. Haematological profile of dogs with visceral leishmaniasis in the city of Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 43-50, 2008.
- MICHALSKY, E. M. et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotômíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n.1, p. 58-62, jan./fev, 2011.
- MIRÓ G.; RUPÉREZ, C.; CHECA, R.; GÁLVEZ, R.; HERNÁNDEZ, L.; GARCÍA, M.; CANOREA, I.; MARINO, V.; MONTOYA, A. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniasis? **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, p.112, 2014.

MONTENEGRO, J. A cutis reação na leishmaniose. **An. Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 1, n.1, p. 323-330, 1926.

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

NAVEDA, L. A. B.; MOREIRA, E. C.; MACHADO, J. G.; MORAES, J. R. C.; MARCELINO, A. P. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 988-993, 2006.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, C. D. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n.5, p. 51231-123, 2001.

OLIVEIRA, G. M. G.; FIGUEIRÓ F. E. A.; ANDRADE, G. M. C.; ARAÚJO, ARAÚJO, L. A.; OLIVEIRA, M. L. G.; CUNHA, R. V. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Pan-amazonense de Saúde**, Anannindeua, v. 1, n. 3, p. 83-94, 2010.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; SOLCÁ, M. S.; BASTOS, L. A.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Comparação dos testes preconizados pelo ministério da saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Educacional Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 58, 2014.

PALATNICK-DE-SOUZA, C. B.; SANTOD, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNICK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasit e Vectors**, Londres, v. 4, n.1, p. 197, 2011.

PAULAN, S. C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. E.; FLORES, E. F.; TACHIBANA, V. M.; KANDA, C.; NORONHA-JÚNIOR, A. C. F.; DOBRE, P. R. Spatial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p.765-774, 2012.

PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALEGO, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-28, 2015.

PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MALARA, D.; MASUCCI, M.; MIGLIAZZO, A.; LOMBARDO, G. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Londres, v. 14, p. 656–657, 2012.

PENNISI, M. G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; GIUDICE, S. Case report of leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, Springer Netherlands, v. 28, n. 1, p. 363-366, 2004. Suplemento.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 207-255.

R CORE TEAM: a language and environment for statistical computing, Vienna: R foundation for statistical computing. [S.l.: s.n.], 2015. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 11 out 2015.

REIS, S. R.; NAIFF, R. F.; ALMEIDA-CAMPOS, F. N.; FRANCO, A. R. Intradermorreação de Montenegro em cães (Mammalia: Canidae) experimentalmente inoculados por *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), principais agentes causadores de Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 593-596, 2008.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Inglaterra, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

RESENDE M. C.; CAMARGO, M. C. V.; VIEIRA, J. R. M.; NOBI, R. C. A.; PORTO, N. M. N.; OLIVEIRA, C. L.; PESSANHA, J. E.; CUNHA, M. C. M.; BRANDÃO, S. T. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 51-55, 2006.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 1, n. 11, p. 13-14, 1997.

RODRIGUES, A. C.; DOS SANTOS, A. B.; FEITOSA, L. F.; SANTANA, C. S.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA JR., E. D. Criação peridomiciliar de galináceos aumenta o risco de leishmaniose visceral humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, s/n, p. 12-13, 1999.

ROUDEBUSH, P.; ALLEN, T. A.; DODD, C. E.; NOVOTNY, B. J. Application of evidence-based medicine to veterinary clinical nutrition. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 11, p. 1765–1771, 2004.

SARAIVA, L.; LOPES, J. S.; OLIVEIRA, G. B. M.; BATISTA, F. A.; FALCÃO, A. L.; FILHO, J. D. A. Estudo dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Alto Caparaó e Caparaó, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n.1, p. 56-63, 2006.

SAVANI, E. S. M. M. **Aspectos da transmissão de leishmanioses no assentamento Guaicurus, Planalto da Bodoquera, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002-3**: infecção natural em animais domésticos e vetores. 2004. 177 f. Tese (Doutorado)– Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SAVANI, E. S. M.; DE CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first Record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 229 - 233, 2004.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control – review articles. **Journal of Vector Borne Diseases**, New Delhi, v. 45, n. 4, p. 255-272, 2008.

SHERRY, K.; MIRÓ, G.; TROTTA, M.; MIRANDA, C.; MONTOYA, A.; ESPINOSA, C.; RIBAS, F.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGU, L. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v. 11, n. 3, p. 239–245, 2011.

SILVA, A. F. **A Reação Intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar**. 2007. 153 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas- FIOCRUZ, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2007.

SILVA, A. V.; DE SOUZA CÂNDIDO, C. D.; DE PITA PEREIRA, D.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropical**, Inglaterra, v. 105, n. 1, p. 92-94. 2008.

- SILVA, D. T.; BUZETTI, W. A. S.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M.; TENÓRIO, M. S.; LOPRES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 17-25, 2014.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SILVA, S. M.; RABELO, P.F.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.
- SOBRINO R; FERROGLIO, E.; OLEAGA, A.; ROMANO, A.; MILLAN, J.; REVILLA, M.; ARNAL, M. C.; TRISCIUOGLIO, A.; GORTÁZAR, C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 3-4, p. 198-203, 2008.
- SOKAL, J. E. Measurement of delayed skin test responses. **New England Journal of Medicine**, Nova Inglaterra, v. 293, n. 10, p. 501-502, 1975.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Inglaterra, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.
- SOUZA, A. L.; BARROS, E. M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M.; MARIN, G. R.; NUNES, V. L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.
- SOUZA, M. A.; SABROZA, P. C.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro 1- Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 2, p. 161-168, 1981.
- SPADA, J. C. P. **Fatores de riscos associados à Leishmaniose visceral canina na área de cinturão verde de Ilha Solteira, SP**. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal)– Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Ilha Solteira, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/115623>>. Acesso em: 5 jan. 2015.
- SPADA, J. C. P.; SILVA, D. T.; MARTINS, K. R. R.; RODAS, L. A. C.; ALVES, M. L.; FARIA, G. A.; BUZETTI, M. C.; SILVA, H. R. S.; STARKE-BUZETTI, W. A. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) and canine visceral leishmaniasis in a rural area of Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 4, p. 456-462, 2014.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALIK, M. S. M. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Oxford, v. 1-2, n. 292, p. 17-23, 2004.

TASCA, K.I.; STARKE-BUZETTI, W.A.; TENORIO, M. S.; PAULAN, S. C.; LIMA, F.L.; QUEIROZ, N. M. G. P.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NEVES, M.F.; NORONHA JR, A.C.F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 27 - 33, 2009.

TENÓRIO, M. S.; SOUSA, L. O.; PAIXÃO, M. S.; ALVES, M. F.; PAULAN, S. C.; LIMA, F. L.; JUSSI, M. M. G.; TASCA, K. I.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoo And Wildlife Medicine**, Yulee, v. 42, n. 4, p. 608-616, 2011.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 64, n. 3-4, p. 119-124, 2001.

VANLOUBBEECK, Y.; JONES, D. E. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. In: Annals of the New York Academy Sciences, 2004, New York. **Annals**. New York, v.1026, p. 267-272, 2004.

VICENTE SOBRINHO, L. S.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A.; LIMA, V. M.; PERRI, S. H.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER, C.; BIONDO, A. W.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 1-2, p. 302-6, 2012.

VIDES, J. P.; SCHWARDT, T. F.; SOBRINHO, L. S. V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M. D.; BIONDO, A. W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 22-28, 2011.

VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 319-321, 2005. Suplemento.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT A. Enzyme-linked immunoassay, p.359-371. In: ROSE, N.; FRIEDMAN, H. (Ed.) **Manual of clinical immunology**. South Carolina: American Society for Microbiology, 1980. 932 p.

WEBSTER, P.; RUSSEL, D. G. The flageller pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today**, Estados Unidos, v. 9, n. 6, p. 201-205, 1993.

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

WIJEYRATNE, P. M.; JONES ARSENAULT, L. K.; MURPHY, C. J. Endemic disease and development: The leishmaniasis. **Acta Tropical**, Inglaterra, v. 56, n. 4, p. 349-364, 1994.

APÊNDICES**A) QUESTIONÁRIO APLICADO PARA RESPONSÁVEIS PELOS ABRIGOS DE ANIMAIS****1) Quais as origens dos cães?**

Ilha Solteira: Sim () Não ()

Caso não, qual cidade? _____ .

É endêmica para LV? Sim () Não ()

2) Vocês adotam algum tipo de rotatividade nas baias utilizadas pelos animais

Sim () Não ()

3) Utilizam algum método preventivo para LV?

() Uso de coleiras repelentes

() Inseticidas

() Banho semanal

() Plantio de citronela

() Uso de citronela tópica

() Vacinação

() Uso de piretróide

() Eutanásia dos animais positivos

() Outros, quais? → _____

4) São realizados exames para diagnóstico de LV em cães?

Sim () Não ()

5) Observaram outras enfermidades entre os animais?

Sim () Não ()

Se sim, quais? _____

6) Possuem acompanhamento veterinário?

Sim () Não ()

7) Os animais possuem cadastro?

Sim () Não ()

8) Há presença de vetor?

Sim () Não ()

9) Há presença de animais silvestres no abrigo?

Sim () Não ()

10) Existe galinheiro, chiqueiro ou paiol ao redor?

Sim () Não ()

11) Existe superlotação de animais por baia?

Sim () Não ()

12) Os animais novos passam por quarentena?

Sim () Não ()

13) Faz tratamento em cães diagnosticados com leishmaniose?

Sim () Não ()

B) QUESTIONÁRIO PREENCHIDO DURANTE A ANAMNESE DOS ANIMAIS

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL

LOCAL:

DATA:

NOME:

ESPÉCIE: () Cão () Gato

SEXO: () F () M

ORIGEM: IDADE: RAÇA:

PORTE: () Pequeno () Médio () Grande

LOCALIZAÇÃO NO ABRIGO: _____

CARACTERÍSTICAS DO ANIMAL: _____

SINAIS CLÍNICOS: _____

OBSERVAÇÕES: _____

C) RESULTADOS ELISA DOS CÃES

D.O. dos controles negativos na primeira coleta (N= 70 cães)

Identificação dos Cães	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Cão 01	0,06	0,049	0,054
Cão 02	0,041	0,044	0,042
Cão 03	0,05	0,047	0,048
Cão 04	0,047	0,057	0,052
Cão 05	0,086	0,091	0,088
Cão 06	0,058	0,043	0,050
Média Geral			0,056
Desvio Padrão			0,016

D.O. dos controles negativos na segunda coleta (N= 64 cães)

Identificação dos Cães	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Cão 01	0,071	0,076	0,0735
Cão 02	0,096	0,078	0,087
Cão 03	0,173	0,171	0,172
Cão 04	0,154	0,15	0,152
Cão 05	0,16	0,174	0,167
Cão 06	0,105	0,12	0,112
Média Geral			0,127
Desvio Padrão			0,042

D.O. dos controles negativos na terceira coleta (N= 58 cães)

Identificação dos Cães	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Cão 01	0,126	0,134	0,130
Cão 02	0,116	0,130	0,123
Cão 03	0,138	0,151	0,144
Cão 04	0,133	0,137	0,135
Cão 05	0,276	0,350	0,313
Cão 06	0,062	0,130	0,096
Média Geral			0,156
Desvio Padrão			0,078

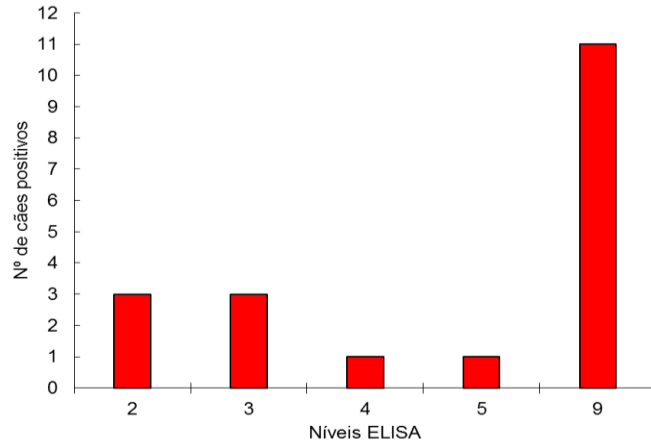
Níveis ELISA e pontos de corte nas três coletas (N=192)

NE	Níveis ELISA		
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
	Intervalo		
0	0,088	0,211	0,312
1	0,089- 0,119	0,212- 0,286	0,313- 0,422
2	0,120- 0,150	0,287- 0,361	0,423- 0,532
3	0,151- 0,181	0,362- 0,436	0,533-0,642
4	0,182- 0,212	0,437- 0,511	0,643-0,752
5	0,213- 0,243	0,512- 0,586	0,753- 0,862
6	0,244- 0,274	0,587- 0,661	0,863- 0,972
7	0,275- 0,305	0,662- 0,736	0,973- 1,082
8	0,306- 0,336	0,737- 0,811	1,083- 1,192
9	0,337	0,812	1,193

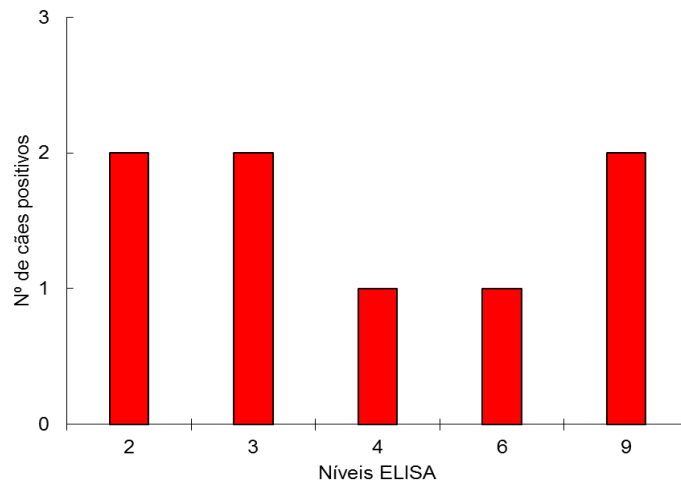
Amarelo=Ponto de corte

D) NÍVEIS ELISA DURANTE AS TRÊS COLETAS

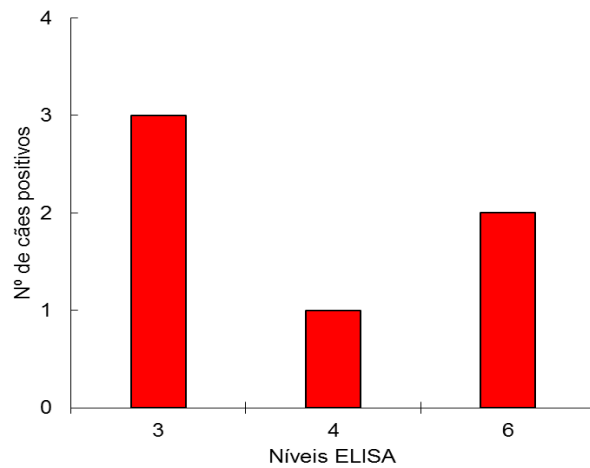
Cães da primeira coleta positivos no ELISA



Cães da segunda coleta positivos no ELISA



Cães da terceira coleta positivos no ELISA



E) RESULTADOS ELISA DOS GATOS

D.O. do controle negativo na primeira coleta (N= 94 gatos).

Identificação dos Gatos	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Gato 01	0,04	0,044	0,042
Gato 02	0,055	0,056	0,055
Gato 03	0,49	0,046	0,047
Gato 04	0,085	0,075	0,08
Gato 05	0,069	0,043	0,056
Gato 06	0,06	0,05	0,055
Média Geral			0,056
Desvio Padrão			0,013

D.O. do controle negativo na segunda coleta (N= 103 gatos).

Identificação dos Gatos	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Gato 01	0,028	0,021	0,024
Gato 02	0,015	0,024	0,019
Gato 03	0,012	0,011	0,011
Gato 04	0,012	0,022	0,017
Gato 05	0,029	0,016	0,022
Gato 06	0,069	0,031	0,05
Média Geral			0,024
Desvio Padrão			0,013

Níveis ELISA nas duas coletas e pontos de corte (N=197)

NE	Níveis ELISA	
	Coleta 1	Coleta 2
	Intervalo	
0	0,082	0,508
1	0,083- 0,111	0,509- 0,686
2	0,112- 0,14	0,687- 0,864
3	0,141- 0,169	0,865- 1,042
4	0,170-0,198	1,043- 1,22
5	0,199- 0,227	1,23- 1,407
6	0,228- 0,256	1,408- 1,585
7	0,257- 0,285	1,586- 1,762
8	0,286- 0,314	1,763- 1,94
9	0,315	1,95

Amarelo=Ponto de corte