

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/01/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

JAQUELINE BIZI

**EXPOSIÇÃO AO *LUTZOMYIA SPP.* E INFECÇÃO POR
LEISHMANIA SPP. EM FELINOS DOMÉSTICOS DE ÁREA
ENDÊMICA**

Araçatuba

2023

JAQUELINE BIZI

**EXPOSIÇÃO AO *LUTZOMYIA SPP.* E INFECÇÃO POR
LEISHMANIA SPP. EM FELINOS DOMÉSTICOS DE ÁREA
ENDÊMICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr. Valéria Marçal Felix de Lima

Araçatuba

2023

B625e Bizi, Jaqueline
Exposição ao Lutzomyia spp. e infecção por Leishmania spp. em felinos domésticos de área endêmica / Jaqueline Bizi. -- Araçatuba, 2023
82 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Gatos. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Sorologia. 4. qPCR. 5. Flebotomíneos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EXPOSIÇÃO AO LUTZOMIA SPP. E INFECÇÃO POR LEISHMANIA SPP. EM FELINOS DOMÉSTICOS DE ÁREA ENDÊMICA

AUTORA: JAQUELINE BIZI

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. CARIS MARONI NUNES (Participação Presencial)
Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária / Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina/USP

Araçatuba, 20 de janeiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EXPOSIÇÃO AO LUTZOMIA SPP. E INFECÇÃO POR LEISHMANIA SPP. EM FELINOS DOMÉSTICOS DE ÁREA ENDÊMICA

AUTORA: JAQUELINE BIZI

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. CÁRIS MARONI NUNES (Participação Presencial)
Aposentada da Faculdade de Medicina Veterinária / Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina/USP

Araçatuba, 20 de janeiro de 2023.

Aos que deixaram esse plano, mas continuam em meu coração,
vô Avelino, vô Luiz, vó Encarnação, vó Aurora, tia Tereza, tio Acácio e Fifa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar a realização de sonhos e sempre me conduzir por toda caminhada, colocando em minha vida pessoas extraordinárias.

Aos meus pais, Sueli e Norival, os quais sempre batalharam muito para que eu me tornasse Médica Veterinária e continuam me apoiando em todas etapas da minha formação e sendo meu maior motivo. Amo vocês! Obrigada por tudo!

À professora Valéria Marçal Félix de Lima, profissional que realiza com empenho todas suas funções como docente e é um exemplo de orientadora, presente, prestativa, resolutive. Obrigada por sempre encontrar tempo para compartilhar seus conhecimentos e por tornar esse trabalho possível. Terei eterno carinho e admiração!

Ao professor Wagner Luis Ferreira e Gisele Fabrino Machado, Cáris Maroni Nunes e Márcia Dalastra Laurenti, pelas valiosas sugestões realizadas e participação nos exames de qualificação e defesa.

Às minhas amigas e parceiras, Natiélle Wajima, a qual foi essencial para esse projeto ser executado e que esteve ao meu lado em toda aventura e também à Isadora Oliveira, nosso braço direito que ajudou em absolutamente tudo que pôde! Vocês fizeram os dias mais desafiadores serem divertidos e gratificantes! Obrigada!

À equipe do laboratório de imunologia e todos que me auxiliaram em diversas etapas dos exames moleculares e sorológicos. Em especial, a Gabriela Venturin, Jéssica Freitas, Matheus Soares, Marilene Oliveira e Sidnei Ferro.

Aos colegas e parceiros, Laís Tubone, Letícia Santana, Natália Canevassi, Nadine Osaki, pelo imensurável auxílio nos procedimentos de castração dos animais que participaram desse projeto. Agradeço também a Equilibrio Vet pela colaboração em locar as salas para os procedimentos e a Paulinha, que foi muito prestativa e colaborativa.

A minhas companheiras de profissão que foram tão compreensivas e parceiras durante esse período, me ajudando e incentivando sempre, Christiane Otsuki, Alessandra Muniz, Tainara Kossakowski e Aline Pereira.

À professora Márcia Dalastra Laurenti e sua orientada Thaise Yumie Tomokane, pelo processamento dos testes de ELISA. Agradeço também pela disponibilidade, paciência e explicações sempre muito esclarecedoras.

Ao Guilherme, parceiro e amigo, sempre a postos a me ajudar em qualquer etapa. Obrigada por ser meu braço direito para todos os desafios da vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

BIZI, J. **Exposição ao *Lutzomyia spp.* e infecção por *Leishmania spp.* em felinos domésticos de área endêmica.** 2023. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Relatos de leishmaniose visceral felina (LVF) estão em ascensão, especialmente em países endêmicos para leishmaniose visceral (LV). Apesar do cão ser o reservatório urbano mais importante, há questionamentos sobre a importância do gato como reservatório adicional. Sabe-se que felinos são suscetíveis a enfermidade, no entanto, são frequentemente assintomáticos e realizam pouca soroconversão, gerando grandes desafios para o diagnóstico. A interação hospedeiro e parasita possui eventos complexos com diversos mecanismos que modulam a resistência ou suscetibilidade à infecção. Adicionalmente, as proteínas salivares do flebotômíneo, inoculadas durante o repasto sanguíneo, também possuem propriedades imunomoduladoras, que podem ser úteis para observação da exposição ao vetor. Esse é o primeiro trabalho que avalia a exposição de uma população de gatos ao *Lutzomyia longipalpis*, vetor da doença predominante nas Américas. Em uma região endêmica para LV, 283 felinos assintomáticos foram testados por métodos paralelos (ELISA e qPCR), a fim de estimar a prevalência de positivos para LVF. A exposição ao flebotômíneo foi avaliada pela presença de anticorpos anti-antígeno bruto salivar (SGS) do *L. longipalpis* e do antígeno recombinante maxadilan (MAX), encontrado também na saliva do flebotômíneo. Observamos exposição ao *L. longipalpis* em 22,62% (64/283) dos gatos, no entanto, sem correlação entre a exposição ao vetor e a positividade para LVF. O MAX e o SGS apresentaram correlação fraca entre si, dessa forma, acreditamos que o MAX não tenha o mesmo desempenho que o SGS para estudos dessa natureza. Observamos prevalência de positivos para LVF de 13,07% e encontramos uma alta taxa de coinfeção pelo vírus da leucemia viral felina (FeLV). Esse é o primeiro delineamento da exposição dos gatos ao *L. longipalpis*. Mesmo que a presença de anticorpos anti-saliva não tenha uma associação com a ocorrência de LVF, os felinos são naturalmente expostos ao vetor. Positividade para LVF foi observada em gatos assintomáticos, tanto no ELISA como

no qPCR. Destacamos a necessidade de monitoramento de gatos de regiões endêmicas, bem como emprego de práticas de prevenção.

Palavras-chave: Gatos. Leishmaniose Visceral. Sorologia. qPCR. Flebotomíneos.

BIZI, J. **Exposure to *Lutzomyia* spp. and infection by *Leishmania* spp. in domestic cats from endemic área.** 2023. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Reports of feline visceral leishmaniasis (FVL) are on the rise, especially in countries endemic for visceral leishmaniasis (VL). Although the dog is the most important urban reservoir, there are questions about the importance of the cat as an additional reservoir. It is known that cats are susceptible to the disease, however, are often asymptomatic and perform little seroconversion, creating major challenges for diagnosis. The interaction between host and parasite has complex events with several mechanisms that modulate resistance or susceptibility to infection. Additionally, the salivary proteins of the sand fly, inoculated during blood repass, also have immunomodulatory properties, which may be useful for observing exposure to the vector. This is the first study to evaluate the exposure of a cat population to *Lutzomyia longipalpis*, a vector of the disease that is prevalent in the Americas. In a VL endemic region, 283 asymptomatic cats were tested by parallel methods (ELISA and qPCR) to estimate the prevalence of VLFV positives. Exposure to the sand fly was assessed by the presence of antibodies to *L. longipalpis* salivary crude antigen (SGS) and the recombinant antigen maxadilan (MAX), also found in sand fly saliva. We observed exposure to *L. longipalpis* in 22.62% (64/283) of the cats, but no correlation between exposure to the vector and LVF positivity. The MAX and SGS showed weak correlation with each other, thus we believe that the MAX does not perform as well as the SGS for studies of this nature. We observed a prevalence of LVF positives of 13.07% and found a high rate of feline viral leukemia virus (FeLV) coinfection. This is the first delineation of the exposure of cats to *L. longipalpis*. Even though the presence of anti-saliva antibodies does not have an association with the occurrence of LVF, cats are naturally exposed to the vector. Positivity for LVF was observed in asymptomatic cats in both ELISA and qPCR. We highlight the need for monitoring cats in endemic regions, as well as employing prevention practices.

Keywords: Cats. Visceral leishmaniasis. Serology. qPCR. Phlebotominae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição dos gatos positivos para leishmaniose visceral de acordo com o método diagnóstico (ELISA ou qPCR), positividade para retrovírus e sinais clínicos.....35
- Figura 2** – Avaliação da exposição de gatos de área endêmica e não endêmica aos antígenos salivares total (2A) e recombinante (2B) do *Lutzomia longipalpis*.37
- Figura 3** – Correlação entre títulos de anticorpos anti-*Leishmania spp* e anticorpos anti-SGS (3A) e anti-MAX (3B) em felinos de área endêmica para LV. .37
- Figura 4** – Correlação entre títulos de anticorpos anti-SGS e anticorpos anti-MAX em felinos de área endêmica para LV.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Associação entre a presença de anticorpos anti-SGS e a positividade para leishmaniose.38

Tabela 2 – Associação entre a presença de anticorpos anti-MAX e a positividade para leishmaniose.39

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpos
CCZSV	Centro de Controle de Zoonoses do município de São Vicente
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FELV	Leucemia Viral Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência felina
IC	Intervalo de confiança
LV	Leishmaniose Visceral
LVF	Leishmaniose Visceral Felina
MAX	Maxadilan
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBA	Punção biópsia aspirativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
RIFI	Imunofluorescência indireta
RP	razão de prevalência
SGS	Sonicado de glândula salivar
USA	United States of América

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.2 Revisão de literatura	18
1.2.1 Leishmaniose visceral.....	18
1.2.2 Leishmaniose visceral felina	19
1.2.3 Diagnóstico leishmaniose visceral felina.....	21
1.2.4 Proteínas salivares e estudos de exposição	22
2 CAPÍTULO 1 - EXPOSIÇÃO AO <i>LUTZOMYIA SPP.</i> E INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA SPP.</i> EM FELINOS DOMÉSTICOS DE ÁREA ENDÊMICA.....	25
2.1 Resumo	26
2.2 Resumo do autor	27
2.3 Introdução	27
2.4 Métodos	29
2.4.1 Triagem dos gatos e coleta de amostras	29
2.4.2 ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania spp.</i>	30
2.4.3 ELISA para pesquisa de anticorpos anti-saliva de <i>Lutzomyia spp.</i>	31
2.4.4 ELISA para pesquisa de anticorpos anti-maxadilan.....	32
2.4.5 Extração do DNA e qPCR de <i>Leishmania spp.</i>	33
2.4.6 Imunocromatografiaa para vírus da leucemia felina (FeLV) e para o vírus de imunodeficiência felina (FIV).....	33
2.5 Análise estatística	34
2.6 Resultados	34
2.6.1 Positividade para <i>Leishmania spp.</i>	34
2.6.2 Positividade para Anticorpos anti-SGS	35
2.6.3 Positividade para Anticorpos anti-MAX.....	36
2.7 Discussão	39

2.8 Referências.....	43
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	50
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	55
APÊNDICE C – FIGURAS SUPLEMENTARES	58
APÊNDICE D – TABELA RESULTADOS GERAIS POR ANIMAL	61
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA	68
ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO PLOS NEGLECTED	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose com distribuição mundial, potencialmente fatal, e faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas (COTTON, 2017). O protozoário *Leishmania infantum* (sinônimo *Leishmania chagasi*) é o principal agente etiológico da doença nas Américas (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

A transmissão do parasita se dá por meio de um vetor flebotomíneo, que no país é representado majoritariamente pelo *Lutzomyia longipalpis*. Apesar dos cães serem o principal hospedeiro urbano da doença é crescente a expansão da infecção em gatos, que é frequentemente descrita especialmente em países endêmicos (PENNISI; PERSICHETTI, 2018).

O fato de o felino doméstico apresentar-se assintomático em grande parte dos casos, somada à reduzida soroconversão que os animais infectados realizam, corrobora para que exista um subdiagnóstico. Dessa forma, seu potencial como hospedeiro e sua importância epidemiológica ainda é questionável (PENNISI *et al.*, 2015; VIDES *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da doença, em todas as espécies de hospedeiros, depende de uma complexa interação entre mecanismos imunológicos com o parasita. Todavia o maior enfoque de estudos concentra-se na relação hospedeiro e *Leishmania*, subestimando o vetor flebotomíneo como variável que pode ser determinante para o desenvolvimento ou não da doença (CECILIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

Os componentes imunogênicos presentes na saliva dos flebotomíneos são capazes de desencadear uma resposta imune humoral no hospedeiro, e a quantificação desses anticorpos é uma ferramenta auxiliar no monitoramento de áreas de risco (LESTINOVA *et al.*, 2017). A IgG específica para a saliva de flebotomíneos verifica a exposição de uma população a esse vetor, através de sorologia, utilizando-se um sonicado de glândula salivar (SGS). Todavia, proteínas recombinantes também são utilizadas em substituição ao SGS, como é o caso do Maxadilan (MAX), substância presente na saliva do *L. longipalpis* e reproduzida em laboratório.

Em região endêmica de Portugal, verificou-se a exposição de gatos ao *Phlebotomus perniciosus* e os resultados obtidos mostram-se muito similares ao observado para a espécie canina, destacando que os gatos são também alvo frequente do flebotomíneo. Verificou-se também maior risco de infecção por *Leishmania* nos animais com anticorpos anti-saliva (PEREIRA *et al.*, 2019).

Tendo em vista que o Brasil é o país que mais apresenta trabalhos sobre leishmaniose visceral felina (LVF) e a escassez de estudos que verifiquem a interação da espécie com o vetor, consideramos pertinente entender melhor a exposição dos gatos ao flebotomíneo. Até o presente momento, não é do nosso conhecimento a existência de um estudo avaliando a exposição da espécie felina ao *Lutzomyia longipalpis* e sua relação com a positividade para LVF. Além disso, nenhum estudo com o peptídeo MAX como marcador de exposição em gatos foi executado.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose de distribuição mundial, potencialmente fatal, e faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas (COTTON, 2017). O protozoário *Leishmania infantum* (sinônimo *Leishmania chagasi*) pertence à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae é o agente etiológico responsável pela doença nas Américas e é transmitido aos humanos e outros vertebrados através da picada de flebotomíneos (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

A doença é de distribuição mundial (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019) e considerada endêmica principalmente em algumas regiões da Europa, África, Ásia, América Central e América do Sul (BANETH *et al.*, 2008). Nas américas, está presente em 19 países, sendo o Brasil o país mais afetado com 96% de todos os relatórios (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A transmissão do parasita se dá por meio do vetor flebotomíneo, que no Brasil é representado majoritariamente pelo *Lutzomyia longipalpis*, também conhecido

popularmente de mosquito-palha ou birigui. A fêmea do vetor necessita de matéria orgânica para maturação dos seus ovos, os quais, quando depositados em substrato orgânico e com calor e umidade adequados, se desenvolvem até a fase adulta (BRASIL, 2003).

Os flebotomíneos realizam a inoculação da forma infectante do protozoário, a promastigota metacíclica, durante seu repasto sanguíneo. Proteínas liberadas durante a hematofagia incitam a ativação de células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos do hospedeiro vertebrado. Esses por sua vez, fagocitam as formas promastigotas, e dentro dos vacúolos parasitofóros, o protozoário perde seu flagelo passando para a forma imóvel, a amastigota. Ocorrem então sucessivas divisões binárias e as células densamente parasitadas se rompem liberando as amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos. Dessa forma se dá a disseminação hematogênica e linfática do protozoário. A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea, quando a mesma ingere macrófagos parasitados, dando continuidade ao ciclo (MAROLI *et al.*, 2013).

Os cães apresentam papel de destaque como principal reservatório urbano e periurbano. O potencial zoonótico dessa espécie na epidemiologia da LV é sustentado com base na alta prevalência da enfermidade em caninos, muitas vezes assintomáticos, e também, pelos hábitos alimentares do flebotomíneo, que frequentemente se alimentam desses animais (DANTAS-TORRES, 2007). De fato, existe correlação positiva entre altos índices de cães positivos e o aumento do risco da infecção em humanos, o que define essa espécie como sentinela da doença (WERNECK *et al.*, 2007).

1.2.2 Leishmaniose visceral felina

Apesar dos gatos já terem sido considerados hospedeiros acidentais e relativamente resistentes à enfermidade, a doença é considerada emergente na espécie e frequentemente relatada em países endêmicos da Europa, Oriente Médio (ATTIPA *et al.*, 2017; CAN *et al.*, 2016; CHATZIS *et al.*, 2014), e América do Sul, entre eles o Brasil (BRESCIANI *et al.*, 2010; VICENTE SOBRINHO *et al.*, 2012). As descrições da LVF são esporádicas em localidades não endêmicas (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). A constante descrição em locais onde existe alta prevalência

da LV canina e humana reflete a capacidade de expansão da doença na espécie felina (COSTA, 2008).

Até o momento, seis espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas em gatos (PEREIRA; MAIA, 2021). Felinos provavelmente são infectados pela mesma espécie que infecta a população humana e canina. A infecção causada por *L. infantum* é relatada principalmente em machos adultos, com idade média de 7 anos, pelo curto e que vivem ou estão em viagem para regiões endêmicas. As manifestações clínicas são de curso crônico e com sinais clínicos muitas vezes inespecíficos, que podem ser confundidos com outras enfermidades. Cerca de um terço dos animais apresentam coinfeção por outras enfermidades como retrovíroses (FIV/FELV), coronavírus felino (FCoV), *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii* (PEREIRA; MAIA, 2021).

Estudos sobre a doença já destacaram que a ocorrência de indivíduos assintomáticos é mais frequente que a manifestação de sinais clínicos (VIDES *et al.*, 2011). Nos gatos sintomáticos, os sinais observados em cerca de 75% dos casos são lesões cutâneas (PEREIRA; MAIA, 2021) e linfadenomegalia (PENNISI *et al.*, 2015). As lesões de pele podem ser a única alteração que o animal apresentará, ou podem estar acompanhadas por sinais sistêmicos inespecíficos. (PENNISI *et al.*, 2015). Cerca de 20% a 30% dos animais apresentam outras manifestações como lesões oftálmicas, lesões em cavidade oral, perda de peso, anorexia, letargia e desidratação (PENNISI *et al.*, 2015; PEREIRA; MAIA 2021). Os achados laboratoriais mais frequentes são anemia, geralmente normocítica normocrômica, e hiperproteinemia (FERNANDEZ-GALLEGO *et al.*, 2020).

Os gatos tem grande popularidade no ambiente doméstico por todo o mundo, colocando em questão seu potencial como espécie reservatório para LV (PENNISI *et al.*, 2015; VIDES *et al.*, 2011). Apesar de estudos com xenodiagnóstico comprovarem a sua infectividade aos flebótomos, alguns autores os consideram apenas hospedeiros acidentais ou alternativos (MAIA; CAMPINO, 2011), enquanto outros trabalhos os colocam na posição de reservatório adicional (MAROLI *et al.*, 2007).

A prevalência da doença para espécie apresenta grande variabilidade de acordo com o método diagnóstico empregado, região avaliada e presença ou não de sinais clínicos. Estima-se, com base em trabalhos anteriores, que esteja próximo a 10% para localidades endêmicas (ASFARAN; FAKHAR; TESHNIZI, 2019).

Entretanto os dados obtidos apresentam grande flutuações, mesmo em pesquisas realizadas na mesma localidade. Por exemplo, na região de Araçatuba, Estado São Paulo, foi encontrada prevalência de 49% em gatos com lesões de pele (VIDES *et al.*, 2011), no entanto, na mesma região brasileira, outros trabalhos identificaram prevalência de 6,5%, 4% e 5,76% (COELHO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2011). Tal fato pode estar ligado com a seleção amostral utilizada nos estudos, já que o diagnóstico em animais assintomáticos ainda é um desafio (VIDES *et al.*, 2011).

1.2.3 Diagnóstico leishmaniose visceral felina

O teste ouro para diagnóstico de LVF é o exame parasitológico direto, em amostras de tecidos obtidas por punção biópsia aspirativa (PBA), identificando formas amastigotas principalmente em linfonodos, medula óssea e baço. Entretanto, a técnica depende diretamente da carga parasitária do animal infectado, o que pode gerar resultados falso-negativos (CHATIZ *et al.*, 2014; VILHENA *et al.*, 2013).

O diagnóstico sorológico é amplamente empregado, sendo o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) (CAN *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2010) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CAN *et al.*, 2016; SPADA *et al.*, 2013) mais comumente utilizados.

Os títulos de anticorpos são úteis em identificar uma resposta imune contra antígenos de *L. infantum*. A RIFI depende muito da experiência do examinador ao fazer a leitura das lâminas (CHATIZ *et al.*, 2014). Além disso deve-se considerar, em regiões endêmicas para *Trypanosoma spp.*, a possibilidade de reações cruzadas. Este é o método sorológico mais utilizado em pesquisas sobre a LVF, de 78 estudos transversais, publicados de 1982 a 2017, sobre o tema, 38,5% usaram esta técnica. Gatos negativos no RIFI, mas suspeitos para doença, devem ser submetidos à testes como PCR ou Western Blot (CAN *et al.*, 2016).

Já o ELISA aparenta ser menos sensível quando comparado ao RIFI para avaliar a infecção de animais ainda em estágio subclínico (PERSICHETTI *et al.*, 2017). Entretanto, outros trabalhos contrastam com esse resultado, referindo os diagnósticos realizados com a técnica do ELISA mais sensíveis (VICENTE SOBRINHO *et al.*, 2012; VIDES *et al.*, 2011). Como a resposta Th2 dos felinos é reduzida, a hipergamaglobulinemia é mais discreta, dessa forma o soro utilizado

para o ELISA deve ter uma diluição cerca de dez vezes mais concentrada quando comparada com a diluição canina. Consequentemente, o teste torna-se mais propenso a reações inespecíficas, diminuindo sua confiabilidade (LIMA *et al.*, 2005; SILVEIRA NETO *et al.*, 2011). Todavia, tanto o ELISA quanto a RIFI apresentaram índices de especificidade de 97% e 98%, respectivamente, sendo igualmente úteis nesse aspecto para o diagnóstico da doença (PERSICHETTI *et al.*, 2017).

O diagnóstico através da reação em cadeia de polimerase (PCR) possui a vantagem de conseguir identificar uma baixa carga parasitária em amostras de sangue total (CAN *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2011) e por isso é recomendado em gatos. Todavia, a seleção de órgãos linfoides ou lesões de pele pode ser preferível em relação às amostras sanguíneas (PERSICHETTI *et al.*, 2017). Outras ferramentas que são válidas para o diagnóstico são a reação imuno-histoquímica das lesões de pele e o Wester Blot (VIDES *et al.*, 2011; PERSICHETTI *et al.*, 2017).

1.2.4 Proteínas salivares e estudos de exposição

O sucesso na infecção pelo protozoário está diretamente ligado à capacidade do parasita de manipular o sistema imune do hospedeiro a seu favor. Essa manipulação não depende apenas de moléculas produzidas pelo parasita, mas também por constituintes presentes na saliva do vetor. A quimiotaxia para macrófagos, por exemplo, é incitada pelos componentes salivares dos flebotomos, o que acelera a fagocitose e, portanto, facilita o parasitismo das células (LESTINOVA *et al.*, 2017).

Alguns autores elucidam que a imunidade anti-saliva de flebotomíneos pode desempenhar uma tendência maior ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 contra a *Leishmania* (GOMES; OLIVEIRA, 2012). Todavia, já foi anteriormente observado que antígenos salivares podem também promover regulação de vias de resposta Th2, principalmente através da IL-6, IL-10, TGF- β . Também há modulação negativa da resposta Th1, envolvendo a IL-12p70, TNF e óxido nítrico, favorecendo a infecção pelo protozoário (BRODIE *et al.*, 2007).

Durante o repasto sanguíneo, os componentes imunogênicos presentes na saliva são capazes de desencadear uma resposta imune humoral no hospedeiro, que desenvolverá anticorpos anti-saliva (TEIXEIRA *et al.*, 2017). A quantificação da

IgG específica anti-saliva de flebotomíneos, tem se mostrado um bom marcador para verificar a exposição de uma população.

O sonicado de glândula salivar (SGS) é utilizado como antígeno para avaliação da exposição aos flebótomos. O antígeno bruto representa, de forma fidedigna, os componentes salivares da espécie avaliada. Entretanto, espécies que possuem muita proximidade filogenética podem apresentar antígenos salivares compartilhados, fazendo com que o macerado da glândula salivar não seja totalmente espécie-específico (LESTINOVA *et al.*, 2017).

Embora o perfil salivar de algumas espécies seja semelhante, a resposta antigênica que provocam parecem ser distintas. Ratos expostos individualmente ao *P. papatasi*, *P. sergenti*, e ao *Lutzomyia longipalpis* produziram anticorpos espécie-específicos para cada vetor (LESTINOVA *et al.*, 2017).

Um fator que limita a utilização da saliva total como antígeno é a dificuldade na obtenção do mesmo, que exige a manutenção de uma população de flebotomíneos, um profissional habilitado para a dissecação das glândulas, bem como o tempo demandado para a obtenção desse material (PRATES *et al.*, 2008). Proteínas recombinantes podem contornar a limitação na obtenção do macerado de glândula salivar (LESTINOVA *et al.*, 2017).

O Maxadilan (MAX) é um peptídeo de 7kda, presente na glândula salivar do *Lutzomyia longipalpis*, com potente ação vasodilatadora e com propriedades diretamente relacionadas à imunomodulação. O MAX foi a primeira proteína a ser identificada na glândula salivar e posteriormente produzida, artificialmente, em laboratório. O MAX recombinante é obtido com o processo de clonagem e purificação através da *Escherichia coli*, e apresenta as mesmas propriedades da substância originalmente presente na proteína salivar (GILLESPIE; MBOW; TITUS, 2000).

Estudos evidenciam a capacidade do MAX em desviar a resposta Th1 para Th2, favorecendo, dessa forma, a infecção por *Leishmania* em decorrência dos seus mecanismos imunomoduladores (ROGERS; TITUS, 2003). De fato, já foi verificado que os componentes salivares do vetor podem interferir no estabelecimento da doença. Morris e colaboradores (2001), avaliaram a capacidade do MAX ou do SGS de interferir em mecanismos de imunomodulação do hospedeiro. Para isso, inocularam proteínas salivares (MAX ou SGS) conjuntamente com a *Leishmania major* em camundongos e notaram que ambos componentes apresentaram efeito da

exacerbação da ação do protozoário no desenvolvimento de lesões cutâneas, em comparação aos animais expostos apenas a *L. major*. No entanto, quando os animais foram previamente imunizados com o MAX, antes da inoculação da *L. major*, houve efeito parcialmente protetivo frente ao desenvolvimento das lesões cutâneas, que se desenvolveram de forma mais branda.

Mesmo com diversas possibilidades para estudo com os componentes salivares, sua maior aplicabilidade é em estudos voltados também para identificação de suscetibilidade, resistência ou exposição ao vetor (KOSTALOVA *et al.*, 2015, 2016; SIMA *et al.*, 2016).

Em cães de uma região endêmica da Espanha, a verificação de produção de anticorpos para o *Phlebotomus perniciosus* verificou correlação positiva com o período de maior disponibilidade desse vetor, de acordo com os padrões sazonais do mesmo. Os animais com títulos anti-saliva mais elevados também foram os que mais se mostraram positivos no ELISA para diagnóstico de *L. infantum* (VELEZ *et al.*, 2018). Estudos em outras espécies também demonstram a aplicabilidade desse método (MARTÍN-MARTÍN; MOLINA; JIMEANEZ, 2015).

O primeiro estudo que verificou a resposta imune na espécie felina frente à exposição ao principal vetor relacionado com a transmissão de LV na região foi conduzido em Portugal. Dos 350 gatos incluídos no estudo, cerca de 47,7% foram expostos ao *P. perniciosus* e houve correlação positiva entre a IgG específica para a exposição ao vetor e o maior risco de infecção por *Leishmania* nesses animais (PEREIRA *et al.*, 2019).

Uma vez que quanto mais exposto ao vetor, maior a chance de contato com *Leishmania*, a exposição ao vetor pode refletir em maior risco de infecção. Seu uso é capaz de auxiliar no monitoramento de áreas de risco e no planejamento de estratégias de controle de vetores (LESTINOVA *et al.*, 2017).

Dessa forma, nosso objetivo foi delinear pela primeira vez o perfil de exposição ao vetor da LV do Brasil na espécie felina, bem como sua associação com a positividade para anticorpos anti-*Leishmania* ou *Leishmania spp.*, por dois métodos distintos (ELISA e qPCR), tendo em vista ampliar os conhecimentos sobre a relevância dos gatos no ciclo urbano da doença.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPK, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, artigo e0004349, 40 p., 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004349.

ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? a systematic review with meta-analysis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 25, artigo e20190012, 10 p., 2019. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0012.

ATTIPA, C.; PAPASOULIOTIS, K.; SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G.; NACHUM-BIALA, Y.; SARVANI, E.; KNOWLES, T.G.; MENGI, S.; MORRIS, D.; HELPS, C.; TASKER, S. Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vector-borne, pathogens in cats from Cyprus. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, artigo 130, 14 p., 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2063-2.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008. DOI: 10.1016/j.pt.2008.04.001.

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

BRESCIANI, K. D. S.; SERRANO, A. C. M.; MATOS, L. V. S.; SAVANI, E. S. M. M.; D'AURIA, S. R. N.; PERRI, S. H. V.; BONELLO, F. L.; COELHO, W. M. D.; AOKI, C. G.; COSTA, A. J. Ocorrência de Leishmania spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p.127-129, 2010. DOI: 10.4322/rbpv.01902012.

BRODIE, T. M.; SMITH, M. C.; MORRIS, R. V.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of the Lutzomyia longipalpis salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 75, n. 5, p. 2359-2365, 2007. DOI: 10.1128/IAI.01812-06.

CAN, H.; DÖŞKAYA, M.; ÖZDEMİR, H. G.; ŞAHAR, E. A.; KARAKAVUK, M.; PEKTAŞ, B.; KARAKUŞ, M.; TÖZ, S.; CANER, A.; DÖŞKAYA, A. D.; İZ, S. G.; ÖZBEL, Y.; GÜRÜZ, Y. Seroprevalence of Leishmania infection and molecular detection of Leishmania tropica and Leishmania infantum in stray cats of İzmir, Turkey. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 167, p.109-114, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.05.011.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania

parasites. **Communications Biology**, London, v. 5, n. 1, artigo 305, 12 p., 2022. DOI: 10.1038/s42003-022-03240-z. PMID: 35379881; PMCID: PMC8979968.

CHATZIS, M. K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A. F.; RALLIS, T.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 217-225, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.02.044.

COELHO, W. M. D.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K. D. S. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 176, n. 2-3, p. 281-282, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.052.

COTTON, J. A. The expanding world of human leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 341-344, 2017. DOI: 10.1016/j.pt.2017.02.002.

COSTA, C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008. DOI: 10.1590/S0102-311X2008001200027.

COSTA, T. A. C.; ROSSI, C. N.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. A. D.; VIDES, J. P.; VICENTE SOBRINHO, L. S.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.07.007.

FERNANDEZ-GALLEGO, A.; BERNABE, L. F.; DALMAU, A.; ESTEBAN-SALTIVERI, D.; FONT, A.; LEIVA, M.; ORTUÑEZ-NAVARRO, A.; PEÑA, M.-T.; TABAR, M.-D.; REAL-SAMPIETRO, L.; SALÓ, F.; LLORET, A.; BARDAGÍ, M. Feline leishmaniosis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 22, n. 10, p. 993-1007, 2020. DOI: 10.1177/1098612X20902865.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 319-331, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2000.00309.x.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The Immune Response to Sand Fly Salivary Proteins and Its Influence on *Leishmania* Immunity. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, artigo 110, 8 p., 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00110.

KOSTALOVA, T.; LESTINOVA, T.; MAIA, C.; SUMOVA, P.; VLKOVA, M.; WILLEN, L.; POLANSKA, N.; FIORENTINO, E.; SCALONE, A.; OLIVA, G.; VERONESI, F.; CRISTÓVÃO, J. M.; COURTENAY, O.; CAMPINO, L.; GRADONI, L.; GRAMICCIA,

M.; VOLF, P. The recombinant protein rSP03B is a valid antigen for screening dog exposure to *Phlebotomus perniciosus* a cross foci of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 88-93, 2016. DOI: 10.1111/mve.12192.

KOSTALOVA, T.; LESTINOVA, T.; SUMOVA, P.; VLKOVA, M.; ROHOUSOVA, I.; BERRIATUA, E.; OLIVA, G.; FIORENTINO, E.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; VOLF, P. Canine antibodies against salivary recombinant proteins of *Phlebotomus perniciosus*: a longitudinal study in an endemic focus of canine leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 6, artigo e0003855, 15 p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003855.

LESTINOVA, T.; ROHOUSOVA, I.; SIMA, M.; OLIVEIRA, C. I.; VOLF, P. Insights into the sand fly saliva: blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, artigo e0005600, 26 p., 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005600.

LIMA, V. M. F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C. ; CORREA, A. P. F. L ; LUVIZZOTO, 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. DOI: 10.1590/S0100-736X2005000400005.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011. DOI: 10.1016/j.pt.2011.03.008.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, n. 2, p.123-147, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Pathology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.11.009.

MARTÍN-MARTÍN I.; MOLINA, R.; JIMEANEZ, M. Kinetics of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in experimentally bitten mice and rabbits. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 11, artigo e0140722, 15 p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0140722.

MORRIS, R. V.; SHOEMAKER, C. B.; DAVID, J. R.; LANZARO, G. C.; TITUS, R. G. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 167, n. 9, p. 5226-5230, 2001. DOI: 10.4049/jimmunol.167.9.5226.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**: epidemiological report of the Americas. Washington, DC: Department of Neglected Infectious Diseases, 2019. Report 7.

PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLEGU, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, London, v. 8, artigo 302, 18 p., 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0909-z.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 251, p.131-137, 2018. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.01.012.

PEREIRA, A.; CRISTÓVÃO, J. M.; VILHENA, H.; MARTINS, A.; CACHOLA, P.; HENRIQUES, J.; COIMBRA, M.; CATARINO, A.; LESTINOVA, T.; SPITZOVA, T.; VOLF, P.; CAMPINO, L.; MAIA, C. Antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in cats naturally exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with *Leishmania* infection. **Parasites and Vectors**, London, v. 12, artigo 128, 9 p., 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3376-0.

PEREIRA, A.; MAIA, C. *Leishmania* infection in cats and feline leishmaniosis: an updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. **Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 1, artigo 100035, 21 p., 2021. DOI: 10.1016/j.crpvbd.2021.100035.

PERSICHETTI, M. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; VULLO, A.; MASUCCI, M.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; VITALE, F.; PENNISI, M. G. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, artigo 119, 8 p., 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2046-3.

PRATES, D. B.; SANTOS, L. D.; MIRANDA, J. C.; SOUZA, A. P. A.; PALMA, M. S.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 45, n. 3, p. 409-413, 2008. DOI: 10.1603/0022-2585(2008)45[409:ciaots]2.0.co;2.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of *Maxadilan* and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 25, n. 3, p.127-134, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2003.00623.x.

ROSSI, C. N.; NUNES, C. M.; SAVANI, E. S. M. M.; LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Feline leishmaniasis in the municipality of Aracatuba, São Paulo, Brazil. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 25, n. 3, p. 714, 2011. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.0702.x.

SILVEIRA NETO, L.; VICENTE SOBRINHO, L. S.; MARTINS, C. O.; MACHADO, R. Z.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 177, n. 3-4, p. 374-377, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.11.055.

SIMA, M.; FERENCIOVA, B.; WARBURG, A.; ROHOUSOVA, I.; VOLF, P. Recombinant salivary proteins of *Phlebotomus orientalis* are suitable antigens to

measure exposure of domestic animals to sand fly bites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, artigo e0004553, 14 p., 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004553.

SPADA, E.; PROVERBIO, D.; MIGLIAZZO, A.; DELLA PEPA, A.; PEREGO, R.; BAGNAGATTI DE GIORGI, G. Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* infection in stray cats in a nonendemic area in northern Italy. **International Scholarly Research Notices Parasitology**, New York, v. 2013, artigo 916376, 6 p., 2013. DOI: 10.5402/2013/916376.

TEIXEIRA, C.; GOMES, R.; COLLIN, N.; REYNOSO, D.; JOCHIM, R.; OLIVEIRA, F. SEITZ, A.; ELNAIEM, D. E.; CALDAS, A.; SOUZA, A. P.; BRODSKYN, C.; I.; OLIVEIRA, C. I.; MENDONCA, I.; COSTA, C. H.; VOLF, P.; BARRAL, A.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum* *chagasi* in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 3, artigo e638, 10 p., 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000638.

VELEZ, R.; SPITZOVA, T.; DOMENECH, E.; WILL, L.; CAIRO, J.; VOLF, P.; GÁLLEGO, M. Seasonal dynamics of canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in an endemic area of *Leishmania infantum*. **Parasites and Vectors**, London, v. 11, n. 1, artigo 545, 9 p., 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-3123-y.

VICENTE SOBRINHO, L. S.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A. D.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; 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. 302-306, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.01.010.

VIDES, J. P.; SCHWARD, T. F.; VICENTE SOBRINHO, L. S.; 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. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.12.042.

VILHENA, H.; MARTINEZ-DÍAZ, V. L.; CARDOSO, L.; VIEIRA, L.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; PASTOR, J.; SILVESTRE-FERREIRA, A. C. Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. **Parasites and Vectors**, London, v. 6, artigo 99, 6 p., 2013. DOI: 10.1186/1756-3305-6-99.

WERNECK, G. L.; COSTA, C. H. N.; WALKER, A. M.; DAVID, J. R.; WAND, M.; MAGUIRE, J. H. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 135, n. 2, p. 195-201, 2007. DOI: 10.1017/S0950268806006881.