

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“NECESSIDADE DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília-SP”

”

GABRIELA VILLA PIRAJÁ

Botucatu – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“NECESSIDADE DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília-SP”

GABRIELA VILLA PIRAJÁ

Botucatu – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

“NECESSIDADE DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília-SP”

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Gabriela Villa Pirajá

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Botucatu – SP
2013

Nome do Autor: Gabriela Villa Pirajá

Título: **NECESSIDADE DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília-SP**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Newton Goulart Madeira

Membro titular

Departamento de Parasitologia

Instituto de Biociências (IBB)- UNESP – Botucatu

Prof^a Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani

Membro titular

Departamento: Apoio, Produção e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA- UNESP - Araçatuba

Data da Defesa: 14 de Novembro de 2013

“Grandes coisas fez o Senhor por nós”

Salmos 126:3

*D*EDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Ao meu querido filho, Matheus Villa Pirajá ,

Agradeço desde o momento que te segurei no colo pela primeira vez, neste momento eu encontrei a verdadeira felicidade.

Todo este trabalho eu dedico a você.

Te Amo !

Aos meus pais, Newton e Rosana,

Obrigada por todo apoio moral, sempre do meu lado nos momento mais difíceis da minha vida. Vocês são responsáveis por eu te chegado até aqui.

Amo vocês !

A minha querida avó, Dulce,

Mesmo por ter passado muitos momentos difíceis na sua vida, entes queridos se foram neste percurso, mas a senhora nunca perdeu a força e motivação de viver.

Te Amo Vó!

Ao meu irmão Veterinário Guilherme, e ao meu primo irmão Rafael,

Estamos juntos desde a infância, tantos histórias vividas até aqui, agradeço por tudo.

Amo vocês !

A GRADECIMENTOS

AGRADEÇO:

Em primeiro lugar a Deus por ter chegado até aqui, nesta longa caminhada, por toda força para lutar ;

Ao meu filho Matheus por ele existir, por todas as alegrias proporcionadas em minha vida;

Á todos da minha família, em especial meus pais Newton e Rosana por toda força , e amor em toda minha caminhada;

Á minha orientadora Profa. Simone por todo aprendizado, e crescimento profissional proporcionado ao longo destes anos;

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni por disponibilizar o Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – (FMVZ) Unesp de Botucatu –SP, para a realização das RIFIS;

Aos meus colegas de mestrado: Denise, Gisele Junqueira, por toda vivencia juntos, desde a época da graduação, fomos da mesma turma no curso de Veterinária.

Aos meus colegas de laboratório: Wesley e Livia, Ravi, Fábio , Maria Fernanda e Mirian, por todo convívio e troca de experiência profissional, parcerias;

Á querida Fran do Laboratório de Doenças Tropicais da Unesp de Botucatu, por toda amizade e pensamentos positivos;

Ás queridas Neuzinha, a pesquisadora Lilian Rodas e a Dandara por todo apoio no meu projeto, por cederem as armadilhas Luminosas CDC para o desenvolvimento da pesquisa entomológica e por todo o treinamento técnico, no Laboratório de Leishmanioses da Sucen de Araçatuba;

Á toda equipe do Laboratório de Imunologia da Sucen de São Paulo, em especial a Dra. Maria Esther de Carvalho pelo treinamento da Técnica de Elisa para Hábito Alimentar (ELISA);

Á todos funcionários e pesquisadores da Agência Polo Tecnológico dos Agronegócios (APTA) de Bauru- SP em especial Mirian, Jeremias e Luizão;

Á prefeitura de Marília, por permitir a realização da pesquisa no Bosque Municipal “Rangel Pietraróia”.

Á equipe de controle de Zoonoses (CCZ) em especial ao Médico Veterinário Lupércio Garrido, por ceder o gatil para a capturas de felinos, e pelo aprendizado proporcionado no período de estágio curricular, durante seis meses;

Á equipe do Laboratório de zoonoses da Unesp de Botucatu, em especial a Dani por toda paciência e apoio na realização das RIFIS;

Á Marcelinha do Laboratório de PCR no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela ajuda;

Á veterinária responsável pelo bosque Melissa, pela ajuda nas capturas dos flebotomíneos ;

Á Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio que proporcionou um suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Á Capes pela disponibilização da bolsa de estudos;

Á Faculdade de Medicina Veterinária (FAEF) por ceder o Laboratório de Análises clínicas para o processamento das amostras;

Á Profa. Lúcia Raquel de Carvalho do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pelas análises estatísticas dos resultados da pesquisa.

Ao Prof. José Carlos de Figueiredo Pantoja, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia- FMVZ, Unesp de Botucatu, pelas análises estatísticas da pesquisa.

*L*ista de *T*abelas

LISTA DE TABELAS

	Páginas
TABELA 1. Número de felinos positivos para a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>) em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP “Rangel Pietraróia”.....	71
TABELA 2. Comparação dos resultados positivos aos exames sorológicos de ELISA Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i> e <i>L.(V.) braziliensis</i> realizados em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP.....	77
TABELA 3. Comparação dos Resultados dos exames moleculares e sorológicos para <i>L. infantum</i> realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP.....	80
TABELA 4. Comparação dos resultados positivos de ELISA e RIFI para <i>L. braziliensis</i> com os resultados obtidos ao exame de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>L.(V.) braziliensis</i> , realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP.....	82
TABELA 5. Prevalência de <i>L. (V.) braziliensis</i> ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.....	84
TABELA 6. Prevalência de <i>L. infantum</i> ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.....	85

TABELA 7. Prevalência de <i>L. (V.) braziliensis</i> ao teste de ELISA Indireto a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.....	85
TABELA 8. Prevalência de <i>L. infantum</i> ao teste de ELISA Indireto a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.....	86
TABELA 9. Prevalência de <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> ao exame de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.....	86
TABELA 10. Proporções de concordância e respectivos intervalos de confiança para os testes de ELISA para <i>L.(V.) braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> , RIFI para <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania infantum</i> e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> , realizado em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP.....	87
TABELA 11. Estatística descritiva relativas às variáveis média das amostras subtraído o branco (DO-Blk) e amostra teste em relação ao controle positivo (A/P).....	88
TABELA 12. Número e percentual de ocorrências da variável NE ao exame de ELISA Indireto para <i>L. (V.) braziliensis</i> , realizado em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP..	88
TABELA 13. Resultado Total das Capturas de flebotomíneos no período de 6 meses nos 10 pontos distribuídos no Bosque Municipal de Marília-SP.....	144

TABELA 14. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i> em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP “Rangel Pietraróia”.....	145
TABELA 15. Valores de níveis do Exame de Elisa Indireto nos gatos do Bosque de Marília- SP para <i>L. infantum</i>	147
TABELA 16. Níveis de Elisa em relação ao valor de Absorbância (D.O) para <i>L. infantum</i>	149
TABELA 17. Valores dos níveis do Exame de Elisa Indireto dos gatos do Bosque de Marília- SP para <i>L. (V.) braziliensis</i>	150
TABELA 18. Níveis do Elisa em relação ao valor da Absorbância (D.O) para <i>L. (V.) braziliensis</i>	152
TABELA 19. Comparação dos Exames sorológicos Elisa Indireto e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i>	153
TABELA 20. Comparação dos Exames Sorológicos Elisa Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. (V.) braziliensis</i>	155

*L*ISTA DE *A*BREVIATURAS

E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

NE	Níveis ELISA	M	Molar
CDC	Center Disease Control	ml	Mililitros
pH	Potencial hidrogeniônico	mg	Miligramas
BOD	Demanda química de oxigênio	µl	Microlitros
PBS	Tampão Fosfato Salino	mM	Milimolar
PBS-T	Tampão Fosfato Salino+ Tween 20	°C	Graus centígrados
TBE	Tris- EDTA- Borato	®	Marca registrada
A/P	Amostra Teste em relação ao controle positive	EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PCR	Reação em Cadeia Polimerase	LIT	Lifer Infusion Tryptose
DO	Densidade Óptica	KCL	Cloreto de Potássio
NNN	Novy MacNeal- Nicolle	HCL	Ácido Clorídrico
rpm	Revolutions per munute of rotor	DNA	ácido desoxirribonucleico
X	Veze	DNTp	Desoxirribonucleotídeos
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta		

*L*ISTA DE *F*IGURAS

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1. Mapa do bosque Municipal de Marília- SP “Rangel Pietraróia”	51
FIGURA 2. Características do local de pesquisa.....	52
FIGURA 3. Gaiola de contenção para coleta de sangue de gato capturado no Bosque Municipal de Marília – SP.....	53
FIGURA 4. Procedimentos de captura de flebotomíneos no Bosque.....	54
FIGURA 5. Mapa do Bosque Municipal de Marília, “Rangel Pietraróia”, identificando os pontos de instalação das armadilhas para flebotomíneos.	55
FIGURA 6. Triagem inicial dos flebotomíneos capturados.....	56.
FIGURA 7. Procedimentos e materiais utilizados para a realização da triagem inicial dos flebotomíneos para posterior pesquisa de promastigotas para <i>Leishmania</i> spp.....	57
FIGURA 8. Espécimes machos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> capturados no Bosque Municipal de Marília, utilizando-se armadilha CDC luminosa	69
FIGURA 9. Espécies de flebotomíneos capturados no Bosque Municipal de Marília, distribuídos em dez diferentes pontos.....	69
FIGURA 10. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i> realizado em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP.....	72

- FIGURA 11.** Procedimentos da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando soro dos gatos.....72
- FIGURA 12.** Resultados obtidos ao teste de ELISA Indireto para *L. infantum* em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.....73
- FIGURA 13.** Resultados obtidos aos níveis do teste de ELISA Indireto para *Leishmania infantum* em 50 soros de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP.....74
- FIGURA 14.** Resultados obtidos ao teste de ELISA Indireto para *L. (V.) braziliensis* em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP.....75
- FIGURA 15.** Resultados obtidos aos níveis do teste de ELISA Indireto para *L.(V.) braziliensis* em 50 soros de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP.....75
- FIGURA 16.** Procedimento de Coleta de sangue dos felinos para a pesquisa de *Leishmania spp*.....143

SUMÁRIO

SÚMARIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	46
4. OBJETIVOS.....	48
4.1- Objetivos gerais.....	48
4.2- Objetivos específicos.....	48
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.1- Local da pesquisa.....	51
5.2 - Características do local	52
5.3- Colheita do sangue.....	53
5.4- Capturas dos flebotomíneos.....	54
5.5- Dissecção e identificação dos flebotomíneos.....	58
5.6- Exame parasitológico direto do conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados.....	59
5.7- Teste do Hábito Alimentar (ELISA) de captura.....	59
5.8- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	60
5.9-Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para <i>L. infantum</i> (<i>syn. L.chagasi</i>).....	61
6.0- Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para <i>L. (V.) braziliensis</i>	63
6.1 - Preparo dos cultivos para extração do DNA	63
6.2- Extração do DNA a partir de amostras de sangue dos gatos.....	63
6.3- Extração do DNA a partir do conteúdo intestinal dos flebotomíneos	64
6.4- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para <i>L. infantum</i> (<i>syn. L.chagasi</i>).....	64
6.4.1- Eletroforese em gel de agarose	65

6.5- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	65
6.5.1- Eletroforese em gel de agarose.....	66
6.6 - Análise estatística.....	66
7- RESULTADOS	68
7.1- Capturas dos flebotomíneos.....	68
7.2- Exame parasitológico direto do conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados.....	70
7.3- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i>	70
7.4- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. (V.) braziliensis</i>	72
7.5-Teste Imunoenzimático (ELISA Indireto) para <i>L. infantum</i>	73
7.6- Teste Imunoenzimático (ELISA Indireto) para <i>L. (V.) braziliensis</i>	74
7.7- Comparação dos resultados positivos aos exames sorológicos de ELISA Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania infantum</i> e <i>L.(V.) braziliensis</i> realizados em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP	76
7.8. - Exames Moleculares.....	78
7.8.1- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para <i>Leishmania infantum</i>	78
7.8.2- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	78
7.8.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> a partir do conteúdo Intestinal dos flebotomíneos.....	78
7.9- Comparação dos resultados dos exames moleculares e sorológicos para <i>L. infantum</i> realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP.....	79
7.10 -Comparação entre os resultados dos exames sorológicos das amostras de sangue dos gatos positivos para <i>L.(V.) braziliensis</i> com os resultados moleculares de PCR.....	81

7.11- Análise Estatística dos resultados.....	84
8- DISCUSSÃO.....	90
9. CONCLUSÕES.....	96
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
11. TRABALHO CIENTÍFICO.....	114
12. ANEXOS.....	132
13. APÊNDICES.....	143

***R*ESUMO**

PIRAJÁ, G.V. **NECESSIDADE DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília-SP.** Botucatu, 2013. 155 p. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Leishmania infantum (syn. *L. chagasi*) é o agente causador da Leishmaniose Visceral (LV) no Novo Mundo, com áreas endêmicas que se estendem do Sul dos EUA ao norte da Argentina. As leishmanioses assumem grande importância em saúde pública por sua natureza zoonótica e, atualmente, vêm apresentando crescente disseminação nas diferentes regiões do Brasil, em especial no Estado de São Paulo. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar (LT) tem sido assinalada em praticamente todos os Estados e vem crescendo progressivamente nos últimos 20 anos, ocorrendo surtos em todas as regiões do país. Apesar dos registros de ocorrências de infecções esporádicas de leishmaniose felina (LF), são necessários mais estudos para se considerar os felinos como reservatórios importantes nas leishmanioses. Estes animais quase não apresentam sinais clínicos, mesmo estando infectados, constituindo-se em importantes fontes de infecção para outros animais domésticos, o homem ou vice-versa. Coletaram-se amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília, área de grande concentração de transeuntes e já detectado flebotomíneos no local. Armadilhas do tipo CDC luminosas foram instaladas em dez diferentes pontos do bosque, nos meses de julho a dezembro/2012, tendo-se capturado um total de quatro espécies de *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) sendo dois machos e duas fêmeas e quatro espécies fêmeas do gênero *Brumptomyia* spp. A análise parasitológica do conteúdo intestinal das duas fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* foi negativa. Realizou-se a prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*, tendo-se quatro (8%) animais reagentes. Todos os animais foram não reagentes à prova de RIFI para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em relação ao teste de ELISA indireto para *Leishmania infantum*, 42% dos animais (21/50) foram reagentes. Para *L. braziliensis*, 18% dos animais (9/50) foram reagentes ao teste de ELISA. Os exames de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* a partir das amostras de sangue dos gatos e a partir dos conteúdos intestinais das duas fêmeas *Lu. longipalpis* e das quatro fêmeas do gênero *Brumptomyia* foram todos negativos. Os resultados obtidos revelam que, apesar de não ter-se encontrado parasitas nos flebotomíneos capturados, os gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília estão representando um sinal de alerta para a necessidade da vigilância epidemiológica para as leishmanioses no município, tendo em vista a grande quantidade de gatos sorologicamente positivos, o que demonstra o contato prévio com o agente, ainda que não estivessem clinicamente doentes.

Palavras- chave: gato, flebotomíneos, leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, diagnóstico.

ABSTRACT

PIRAJÁ, G.V. **Need for surveillance for *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) and *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies and stray cats from the Municipal Grove of Marília-SP.** Botucatu, 2013. 155 p. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Leishmania infantum (syn. *L. chagasi*) is the causative agent of visceral leishmaniasis (VL) in the New World, with endemic areas that spreads from the south of United States until the north of Argentina. Leishmaniasis represents a great importance in public health due to the zoonotic nature, and currently have been presented a great dissemination in different regions of Brazil, specially in Sao Paulo State. In Brazil, cutaneous leishmaniasis has been occurred in almost all States, and have been growing up progressively in the last twenty years, occurring outbreaks in all regions of the country. Even though the sporadic reports of feline leishmaniasis, more studies are necessary to consider cats as the great importance as reservoirs in the feline leishmaniasis. These animals almost do not represent any clinical symptoms, even infected, representing important source of infection to another domestic animals, humans and vice-versa. Blood samples were collected from fifty cats habiting the Municipal Grove from Marília-SP, an area with high number of visitors and already detected sandflies. Traps CDC were installed in ten different points of the Municipal Grove from Marília-SP, since July to December/2012. Four specimens of *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) were captured (two males and two females) and four females specimens of the *Brumptomyia* genre. The parasitological analysis of gut contents of two females of *Lu. longipalpis* was negative. The Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for *Leishmania infantum* was performed, resulting in four (8%) reagent animals. All cats were non-reagent to *Leishmania braziliensis* by IFAT. Regarding to Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for *Leishmania infantum*, 42% of the animals (21/50) were reagent. For *L. braziliensis*, 18% of the animals (9/50) were reagent to ELISA test. The Polimerase Chain Reaction (PCR) for *Leishmania infantum* and for *Leishmania braziliensis* from the blood samples and gut contents from two females of *Lu. longipalpis* and from four females of *Brumptomyia* were all negative. The results reveal that, despite not having been detected parasites in sand flies, cats from the Municipal Grove of Marília-SP feature a warning signal for the need for epidemiological surveillance of leishmaniasis in the city, in view of the large number of cats serologically positive, which represents prior contact with the agent, even if they have not shown signs or symptoms of the disease.

Keywords: cat, sandflies, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, diagnosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as doenças infecciosas parasitárias de maior incidência no mundo (MEDEIROS et al., 2012). Em 98 países, estima-se que dois milhões de novos casos (1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 casos de leishmaniose visceral (LV) ocorrem anualmente, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A transmissão das leishmanioses se dá pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. O gênero *Lutzomyia* é considerado o de maior importância por conter espécies transmissoras de patógenos aos humanos, com ampla distribuição no Brasil, em regiões do sul até o norte do país, tendo-se os flebotomíneos como vetores de protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (BRASIL, 2007). Para o desenvolvimento das pesquisas entomológicas, diversas armadilhas têm sido desenvolvidas e produzidas comercialmente. A armadilha do tipo “CDC” (Center on Disease Control) vem sendo bastante utilizada pela sua eficiência .

Os reservatórios da doença incluem mamíferos domésticos e silvestres que possam infectar-se por *Leishmania* spp. (GUSHI, 2008). De acordo com a OMS, os animais hospedeiros podem ser distinguidos em primário, secundário ou acidental. Diferentes espécies de mamíferos são considerados hospedeiros primários, incluindo primatas (humanos), canídeos (o cão doméstico, *Canis familiaris*), roedores, edentados e marsupiais (OLIVEIRA-PEREIRA et al.,2008; COLOMBO, 2012;).

Da mesma forma, infecções por *Leishmania* foram relatadas em numerosas outras espécies animais, que podem em alguns casos, atuar como reservatórios secundários ou simplesmente como hospedeiros acidentais sem afetar a epidemiologia da doença (OLIVEIRA- PEREIRA et al., 2008).

O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo ou não ser sintomático (DANTAS-TORRES et al., 2006). De acordo com Bray (1982), um bom reservatório deve estar em contato estreito com o homem, deve ser sensível ao agente patogênico e deve fazê-lo disponível para o vetor em quantidades suficientes para causar infecção e, esta

deverá apresentar uma evolução crônica, permitindo que o animal sobreviva pelo menos até a próxima transmissão; assim, o fato dos gatos se infectarem pelo protozoário e não desenvolver a doença, ao mesmo tempo em que podem portar o parasito no sangue periférico, qualifica essa espécie animal como reservatório e, pelo fato de coabitarem com os humanos, pode-se sugerir que os gatos possam atuar como reservatório alternativo de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), e não apenas como hospedeiro acidental.

O presente estudo objetivou a determinação da importância de gatos errantes como hospedeiros da *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP, no contexto epidemiológico das leishmanioses visceral e tegumentar, no Bosque Municipal de Marília- SP.

***R*evisão de *L*iteratura**

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias de caráter zoonótico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, dos quais 22 espécies são patogênicas para o homem. Dependendo da espécie do protozoário envolvido e da relação do parasita com seu hospedeiro, pode apresentar distintas formas clínicas, ou seja mucocutânea, cutânea ou visceral (LONGONI et al., 2012).

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose reemergente e um grave problema de saúde pública, pois está amplamente distribuída nos quatro continentes, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e Oriente Médio, sul da Europa, norte da África, América do Sul e Central, sendo que 90% dos casos estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Afeganistão, Bangladesh e Brasil. No Novo Mundo, onde áreas endêmicas se estendem do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, o principal agente causador da LV é a *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), sendo que cerca de 97% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil (BRASIL et al., 2012).

L. infantum (syn. *L. chagasi*) é o agente causador da LV no Novo Mundo, com áreas endêmicas que se estendem do Sul dos EUA ao norte da Argentina. Duas hipóteses sobre a origem da LV no Novo Mundo são sugeridas: a recente importação da *L. infantum* do Velho Mundo; origem nativa e a distinta posição taxonômica do parasita no Novo Mundo (KUHLS et al., 2011). Inicialmente considerada uma doença rural, passou a acometer áreas urbanas de pequeno e médio porte e, atualmente, ocorre em grandes centros urbanos, revelando o processo de periurbanização da doença (MISSAWA et al., 2011).

Atualmente, países da América do Sul, como Argentina e Paraguai, vem apresentando, de forma crescente, relatos da enfermidade em cães e em humanos; entretanto, o Brasil é responsável por 90% dos casos da América Latina (ACARDI et al., 2010). Além disso, a leishmaniose está emergindo dentro de áreas não endêmicas, principalmente por causa do transporte de cães de áreas endêmicas e as mudanças climáticas, favorecendo a adaptação de algumas espécies a áreas modificadas (PALATNIK e DAY et al., 2011).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as

regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste e um comportamento epidemiológico cíclico, com aumento no número de casos em períodos médios a cada cinco anos (ELKHOURY et al., 2005; KUHLS et al., 2011). A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) foi registrada pela primeira vez no Estado do Rio de Janeiro em 1977, no município do Rio de Janeiro (SABROZA et al., 1978; MARZOCHI et al., 1985).

Em São Paulo, o primeiro relato da doença aconteceu em Diadema, em uma criança de 10 meses (IVERSSON et al., 1979). No ano de 1998, foram registrados os primeiros casos caninos na região de Araçatuba (LUVIZZOTO et al., 1999) e em 1999 casos humanos da doença na mesma região (GALIMBERTTI et al., 1999). Em 2010 foram notificados 21.981 casos confirmados do agravo, dos quais 2428 foram procedentes da região Sudeste (MINISTÉRIO, 2011).

O município de Marília – antes classificado como silencioso, receptivo e vulnerável devido a sua proximidade com municípios onde ocorre a transmissão, agora é classificado como município com transmissão da doença pelo Ministério da Saúde, tendo em vista a notificação do caso de LV em uma criança, em outubro de 2011, na zona norte da cidade (DOENÇA, 2011). A partir de junho de 2013, segundo o jornal Diário de Marília, a equipe da Comissão de Controle da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) do Instituto Adolfo Lutz começou uma parceria com a Divisão de Zoonoses da cidade para que sejam desenvolvidas ações do programa de combate e erradicação do flebotômico, já que há a comprovação da infestação destes insetos em Marília pela colocação de armadilhas em 2011, aparentemente restrito à região periférica da cidade (RIBEIRO, 2013).

Não menos importante que a LV, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as principais espécies *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (NETO et al., 2008). No Brasil, a LTA tem sido assinalada em praticamente todos os estados e vem crescendo progressivamente nos últimos 20 anos, ocorrendo surtos em todas as regiões do país (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006). No Estado de São Paulo, a LTA encontra-se em expansão e a região do Vale do Ribeira apresenta ao longo do período, as taxas de incidência mais altas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000).

L. (V.) braziliensis constitui-se em um dos agentes etiológicos da LTA, cujo ciclo em ambiente urbano apresenta um perfil de transmissão no intra e no peridomicílio, condicionado à adaptação de algumas espécies de flebotomíneos ao meio ambiente da periferia das cidades, atingindo indivíduos adultos e crianças (PASSOS et al., 1996). Desde 2002, registraram-se casos esporádicos de infecção ou exposição de cavalos a *Leishmania infantum* em várias regiões da Europa . Recentemente, um estudo encontrou sangue de cabras e búfalos infectados por *Leishmania donovani* no Nepal, Ásia (MAIA et al., 2010).

Na Guiana Francesa relatou-se o primeiro caso de uma gata fêmea (*Felis catus*) infectada por *L. (V.) braziliensis*. O animal apresentava ulcera cutânea no nariz e nódulos de diferentes tamanhos nas orelhas. O diagnóstico foi confirmado por análise molecular de amostras cutâneas as quais foram positivas para a técnica de PCR para *L. (V.) braziliensis*. Tal achado sugere a possibilidade dos gatos representarem o papel de reservatórios secundários de Leishmanias (Rougeron et al., 2011).

No Brasil, Passos et al. (1996) relataram um caso de leishmaniose tegumentar (LT) por *L. (V.) braziliensis* em gato diagnosticado em Belo Horizonte, que apresentava lesões na região interdigital. No município do Rio de Janeiro, foram descritos os primeiros dois casos de LT em felinos pelo mesmo agente referido acima, em que os animais apresentavam somente manifestações cutâneas e com exames moleculares e parasitológicos positivos (SCHUBACH et al., 2004).

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

Da descrição do primeiro caso clínico até os dias atuais, a literatura mundial tem registros de 45 casos positivos de Leishmaniose Felina (LF) pelo exame parasitológico para *Leishmania* spp. em diversos países, como nos Estados Unidos (BARNES; STANLEY; CRAIG, 1993), França (OZON et al., 1998; GREVOT et al., 2005); Espanha (HERVAS et al., 1999; LEIVA et al., 2005 e MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007); Itália (POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004 e VITA et al., 2005); Portugal (COSTA-DURÃO et al., 1994 e MAIA;

NUNES; CAMPINO, 2008); Suíça (RUFENACHT et al., 2005) e Brasil (MELLO, 1940; PASSOS et al., 1996; SAVANI et al., 2004; S; ROSSI, 2007; DA SILVA et al., 2008; COELHO et al., 2011; DA SILVA et al., 2010; VIDES et al. 2011; CARDIA et al., 2013). Destes casos, 24 (53,3%) ocorreram no Novo Mundo e 21 (46,6%) no Velho Mundo (COSTA et al., 2010).

Desde os anos 90, a LF tem sido extensivamente investigada e, quando os primeiros casos foram relatados, alguns pesquisadores hipotetizaram a participação do gato doméstico (*Felis catus*) na epidemiologia dessa enfermidade (MANCIANTI, 2004). Mais de 40 casos de LF foram relatados na literatura científica mundial (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007).

Tem sido sugerido que, em locais endêmicos, os gatos sejam reservatórios secundários de *Leishmania infantum*, fazendo-se necessário avaliar o status da infecção e o seu papel na epidemiologia (MANCIANTI, 2004; CARDOSO et al., 2010; MAIA et al., 2010).

Acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade, provavelmente relacionada a fatores genéticos (MANCIANTI, 2004 e VITA et al., 2005). Evidências apontam que a LF pode estar associada a doenças imunossupressoras, tais como a leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) viral felina (NAUCKE, 2000; RODRIGUEZ et al., 2002; MANCIANTI, 2004; GREVOT et al., 2005). Os sinais clínicos são inespecíficos e comumente incluem lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras e alopecia (MANCIANTI, 2004).

Sobrinho et al. (2012) concluíram em seu estudo que gatos vivendo em áreas endêmicas de leishmaniose visceral são mais propensos a serem co-infectados com FIV, sendo que, de 66 gatos apresentando *Leishmania*, 12 estavam co-infectados com FIV.

Já Longoni et al.(2012) realizaram uma pesquisa em 95 gatos de dois estados do México e verificaram a presença de anticorpos anti-*L. mexicana*, anti-*L. braziliensis* e anti-*L. panamensis*, utilizando as técnicas de ELISA e Western blot .

Maia et al. (2010) realizaram uma pesquisa para leishmaniose em 138 gatos, na área metropolitana de Lisboa, Portugal. De todos estes animais, apenas em 28 detectou-se no sangue periférico *Leishmania infantum* utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), ou seja, em 20,3%. Com resultados diferentes, no Oriente Médio, na região de Jerusalém, Nasareddin et

al., (2008) encontraram soroprevalência em felinos por *L. infantum* de 6,7%, utilizando a técnica de ELISA .

Na Espanha, o primeiro caso de LF foi referenciado em 1933 e, desde então, casos clínicos esporádicos foram relatados. Estudos sorológicos, realizados em diversas regiões da Espanha, a soroprevalência variou de 1,7 a 60% em gatos (MAROLI et al., 2007). Em Madrid, área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC), identificaram em felinos, soroprevalência de 1,29 % (3/233) pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando ponto de corte de 1/100. Observou também que sete gatos foram sororeativos para *L. infantum*, com ponto de corte 1/50, resultando em 4,29% de animais sororeativos. À PCR, apenas um animal (0,43%) apresentou positividade (AYLLON et al., 2008).

Na Grécia, o primeiro estudo de soroepidemiológico de *Leishmania* spp. em gatos, foi realizado apenas em 2009 e apresentou uma baixa soroprevalência (3,87%), embora este país tenha se apresentado altamente endêmico para leishmaniose humana e canina (DIAKOU et al., 2009).

No Brasil, Serrano et al., (2008) relataram o primeiro caso de LF em Araçatuba- SP, área endêmica para leishmaniose visceral, em que o animal apresentava alopecia e descamação na região do ouvido e temporal, características de dermatites crostosas. Foram utilizados as técnicas de RIFI e ELISA para verificar a presença de anticorpos anti- *Leishmania* spp., exame parasitológico e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), sendo esta última confirmado a infecção .

Em outro estudo, realizado na cidade de Araçatuba, utilizando 200 gatos adultos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), a existência da infecção foi confirmada pela pesquisa direta do parasito em esfregaços obtidos por punção aspirativa de linfonodo, medula óssea, baço e fígado, assim como pela determinação de anticorpos anti- *L.chagasi*, no teste de ELISA indireto. Os resultados demonstraram prevalência de infecção em 14,5% (31/200), sendo 4 % (8/200) por diagnóstico parasitológico e 11,5% (23/200) por sorologia. Observou-se que dois gatos soropositivos apresentaram lesões de pele e hepatoesplenomegalia, contudo, não foi possível afirmar que tais alterações eram decorrentes da infecção por *Leishmania* spp., uma vez que não foram excluídas outras enfermidades infecciosas (COSTA et al., 2010).

Estudo conduzido no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, área considerada não endêmica, a partir de um caso canino de LTA, foi realizado um inquérito sorológico em 177 cães e 43 gatos, sendo detectados pela RIFI, 10,7% sororreagentes e 5,6% foram inconclusivos. Entre os felinos, nenhum foi reagente à RIFI, porém ao ELISA, 2,4% apresentaram sororreatividade e 4,8% apresentaram resultados indeterminados (FIGUEIREDO et al., 2009). Já Da Silva et al., (2008), relataram em um município do Rio de Janeiro, soroprevalência elevada para *Leishmania* spp. (25,0%) em gatos domésticos assintomáticos.

No Distrito Federal, com o objetivo de verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos domésticos em área endêmica para leishmaniose visceral humana e canina em 89 gatos domiciliados, realizou-se exame clínico inicial e coleta de sangue para a aplicação da PCR, tendo-se identificado 53 amostras de sangue positivas para *Leishmania* spp. (59,55%). Posteriormente, foram coletadas 10 amostras de linfonodos, medula óssea e pele de animais positivos, para o diagnóstico da *Leishmania* spp. por meio de técnicas moleculares (PCR e RFLP-PCR), parasitológicos, imunohistoquímico e imunocitoquímico e cultivo celular. Na PCR dos tecidos, 9/10 amostras de linfonodos e medula óssea, foram positivas e 8/10 fragmentos de pele, também foram positivas. Todas as amostras foram negativas, para as outras técnicas testadas. Não houve alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas significativas quando comparados com os animais negativos. (MARODIN, 2011).

Coelho et al., (2011) em Andradina, no estado de São Paulo, avaliaram 52 gatos do município, com o objetivo de detectar espécies de *Leishmania*. Foram realizados exames parasitológicos diretos, como *imprints* de linfonodo, medula óssea e baço e, após avaliação das amostras positivas, as mesmas foram submetidas ao PCR e sequenciamento. A infecção foi detectada em 5,76% (3/52) dos gatos examinados. Em apenas dois animais identificou-se a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. de amostras de linfonodos, utilizando-se exames parasitológicos.

Outra pesquisa realizada por Coelho et al. (2011), no mesmo município apresentou estudo soroepidemiológico em 70 gatos com a finalidade de identificar a infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Leishmania* spp. nesses animais. Foram detectados anti-*T.gondii* em 15,7% (11/70) dos

animais e em relação a *Neospora caninum*, nenhum animal foi positivo. Raça, idade, alimentação e contato com animais de outras espécies foram significativos para considerar a positividade para *T. gondii* ($P \leq 0,0001$). Os felinos que têm acesso às ruas (17,1%, 11/64), co-habitantes com ratos (19,6%, 10/51), e que se alimentavam de comida caseira e leite cru (27,2%, 6/22) foram positivos para *T. gondii*. Além disso, 4,2% (3/70) dos gatos foram positivos para *Leishmania* spp. pela técnica de ELISA e negativos pela RIFI sem co-infecção com *T. gondii* e *Leishmania* spp. Não houve positividade contra o vírus da imunodeficiência felina ou vírus da leucemia felina.

Estudo realizado no Mato Grosso do Sul, avaliando o comportamento histopatológico das lesões características da leishmaniose cutânea em camundongos infectados com uma amostra de *Leishmania amazonensis* isolada de um gato, demonstrou um elevado grau de parasitismo cutâneo na pata, 20 dias após a infecção nos camundongos. Associado a infecção, observou-se infiltrado inflamatório linfo-histocitário eosinofílico intenso e difuso, além de necrose moderada e difusa. Ocorreu também inflamação focal e perivascular no fígado, contudo não foram observados os parasitos no mesmo (DUARTE et al., 2010).

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses em felinos pode ser realizado por exames parasitológicos (identificação do parasita em esfregaço sanguíneo e/ou cultivo do parasita), imunológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e moleculares (Reação de Cadeia em Polimerase- PCR) (MINISTÉRIO, 2007).

Os exames parasitológicos, baseados na demonstração de formas amastigostas do parasita, tanto dentro do macrófago como na forma livre, permitem o diagnóstico definitivo da infecção, desde que se associem à clínica do animal (se houver) as informações epidemiológicas do mesmo, bem como é pertinente a utilização de outras provas diagnósticas complementares, tais como exames sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI e ELISA) bem como exames moleculares (PCR).

A citologia aspirativa é indicada nas lesões cutâneas (LT), da mesma maneira para os linfonodos superficiais na LV, sendo realizada pelo material coletado a partir das lesões cutâneas e, no caso da LV, coleta-se material dos linfonodos ou medula óssea, sendo estes materiais corados pela técnica de Giemsa. O mesmo material coletado para a realização do exame direto pode

ser utilizado em exames parasitológicos indiretos, como a inoculação em meios de cultura. Para o cultivo de *Leishmania* é fundamental utilizar meio bifásico, sendo vários deles empregados, como o meio líquido Liver Infusion Tryptose (LIT) e o meio de Novy-MacNeal-Nicolle – NNN ou ágar-sangue como fase semissólida.

Em casos com resultados parasitológicos e sorológicos negativos ou inconclusivos, é possível realizar em laboratórios de referência o diagnóstico molecular, utilizando fragmentos de pele, mucosas, sangue periférico, medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (MINISTÉRIO, 2011). O melhor teste de laboratório para diagnosticar LV é a demonstração do parasita em material de biópsia ou punção aspirativa de tecidos, com o de baço sendo mais sensível que de medula óssea (MELLO, 2004).

Em relação aos flebotomíneos, o conhecimento da distribuição e ecologia das diferentes espécies é fundamental para a vigilância epidemiológica das leishmanioses. A pesquisa e a divulgação do encontro destes insetos colaboram para a determinação do risco de transmissão das mesmas (CUTOLO e ZUBEN, 2008).

Em uma área não endêmica para as leishmanioses, no Distrito de Rubião Junior, em Botucatu- SP, Cutolo et al. (2013) relataram capturas de 216 exemplares de flebotomíneos, no período de 2001 a 2005. As espécies mais abundantes encontradas foram *Pintomyia monticola* e *Brumptomyia guimaraesi*, com 56 indivíduos capturados por espécie (25,93%); *Pintomyia fischeri*, com 28 (12,96%) e *Psathyromyia pascalei* com 18 espécimens (8,33%). Outras espécies capturadas foram *Lutzomyia amarali*, *Sciopemyia sordelli*, *Psathyromyia aragaoi*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia bianchigalatae*, *Pintomyia misionensis*, *Brumptomyia carvalhoi*, *Brumptomyia cardosoi*, *Brumptomyia cunhai*, *Brumptomyia nitzulescui*, *Brumptomyia brumpti* e *Brumptomyia* spp. representado por 58 (26,85%) espécimens. Entretanto, a espécie *Brumptomyia* spp. é apenas um indicativo de tocas de tatus no ambiente a ser pesquisado.

Nos flebotomíneos, a hematofagia é um hábito exclusivo das fêmeas, que necessitam de sangue para a maturação dos ovos; desta forma, enquanto se alimentam, as fêmeas podem ingerir macrófagos infectados, que no trato digestório das mesmas transformam-se em promastigotas. Ao realizar o repasto sangüíneo em outro vertebrado, os flebótomos inoculam saliva

juntamente com as promastigotas, que ao serem fagocitados por macrófagos no tecido, perdem seu flagelo devido acidez no interior do fagolisossomo, caracterizando a forma amastigota (GUSHI, 2008).

Os flebótomos são pequenos dípteros de aproximadamente 1 a 2 mm de comprimento, com pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Voam aos saltos e mantêm as asas eretas mesmo em repouso, ao contrário de outros dípteros, o que facilita sua identificação. Apenas as fêmeas são hematófagas e realizam o repasto sanguíneo a noite, e no período diurno voam em saltos. Machos se alimentam dos sucos de flores e plantas. Em cada região do Brasil, os flebótomos recebem varias denominações: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado, arrepinado, etc (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

Algumas espécies de flebotomíneos que até então apresentavam comportamento silvestre têm sido encontradas perto de habitações humanas, em plantações de bananeiras e também em áreas florestais demonstrando que se encontram em processo de adaptação às modificações provocadas pelo homem (MARZOCHI, 1989).

A taxa de flebotomíneos naturalmente infectados em áreas endêmicas e a identificação correta da espécie de *Leishmania* em uma determinada espécie de flebotomíneo são de grande importância epidemiológica nas leishmanioses. Das 476 espécies de flebotomíneos encontradas nas Américas, aproximadamente 40 estão envolvidas na transmissão desta zoonose. Destas, algumas são comprovadamente vetoras, baseando-se nas características antropofílicas, na identificação da infecção natural e na distribuição espacial e sazonal em associação com o registro de casos humanos. Outras espécies são incriminadas por evidências epidemiológicas, acrescidas ou não da infecção natural pelos parasitos (KILLICK- KENDRICK, 1985).

De acordo com Colombo (2012), embora *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) seja uma espécie prevalente nas zonas urbanas , tem sido a única responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), na área urbana dos Municípios da região Oeste do estado. Contudo, na região metropolitana de São Paulo, a sua presença não foi detectada. Este fenômeno leva a supor que outras espécies de flebotomíneos ou outros ectoparasitas de cães, como os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e as pulgas *Ctenocephalides felis* possam estar envolvidas na transmissão da LVA.

Lu. longipalpis é o vetor mais importante da leishmaniose nas Américas, e é certamente a única espécie de flebotomíneo (incluindo aqueles associados com a transmissão dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar), que atende a todos os critérios estabelecidos para a competência vetorial (KILLICK-KENDRICK, 1990), destacando-se a antropofilia como sendo essencial, coincidindo com a distribuição espacial dos casos humanos da doença, e a infecção natural por *L. infantum chagasi*. (DEANE, 1956; KILLICK-KENDRICK, 1990; LAINSON e SHAW, 1998; LAINSON e RANGEL, 2005) .

Os biótopos onde podem ser encontrados flebotomos adultos variam de acordo com fatores ambientais (OLIVEIRA- PEREIRA et al., 2008). Galati et al. (2003), enfatizaram a relevância de chiqueiros e galinheiros como locais de criação e manutenção de alta densidade de flebotomíneos no ambiente como um fator de risco a ser considerado pela vigilância epidemiológica no planejamento e ações do controle das leishmanioses, sinalizando assim, a importância do vetor na epidemiologia da leishmaniose como o fator que impulsiona os estudos dos flebotomíneos, responsáveis pela transmissão dos protozoários de hospedeiros reservatórios aos susceptíveis. Para o desenvolvimento das pesquisas entomológicas, diversas armadilhas têm sido desenvolvidas e produzidas comercialmente.

A armadilha do tipo “CDC” (Center on Disease Control) vem sendo bastante utilizada pela sua eficiência. O posicionamento da lâmpada proporciona cobertura extensa e eficiente da área estudada, atraindo os insetos presentes nos arredores. Após a escolha do sítio de captura, a armadilha é exposta, preferencialmente no período vespertino, posicionada em uma altura de 1,5 metros, funcionando durante toda a noite, e recolhidas no dia seguinte (PUGEDO et al., 2005).

Outra armadilha que vem sendo bastante utilizada é a Shannon, composta por uma tela, onde se utilizam uma lanterna e um capturador manual. Geralmente, este tipo de armadilha é colocada em mata. Os capturadores manuais a pilha vem sendo utilizados em ambientes domiciliares, principalmente no peridomicílio, onde existam galinheiros. Todas as armadilhas tem como objetivo a busca de flebotomíneos alimentados ou infectados, ou mesmo para o conhecimento da fauna local. Armadilhas de emersão, com o posicionamento no solo, tem como objetivo identificar os criadouros naturais deste mosquito.

Estudos entomológicos com a utilização de armadilhas de captura dos flebotomíneos vem sendo realizados, como as citadas anteriormente. No Vale do Ribeira, na região sul do Estado de São Paulo, Domingos et al. (1998), desenvolveram uma pesquisa que teve como objetivo identificar a fauna flebotomínea, com o uso de armadilhas Shannon no peridomicílio e armadilhas tipo CDC no ambiente intra e peridomicilar, bem como florestal (margem e interior), as quais foram instaladas a partir do crepúsculo vespertino. Como resultados, foram coletadas oito espécies de flebotomíneos, totalizando 11.096 exemplares, sendo *Lu. intermedia* a espécie dominante (96,4%) .

Oliveira – Pereira et al. (2008) identificaram no município de Buriticupu, Amazônia Maranhense, as fontes alimentares sanguíneas de flebotomíneos por meio do teste de precipitina. Um total de 274 fêmeas ingurgitadas foram encontradas e distribuídas entre *Lu. choti* (164 exemplares), *Lu. triacantha* (90 exemplares) e *Lu. whitmani* (20 exemplares), sendo que 6,7% dos flebotomíneos haviam se alimentado com sangue humano.

No nordeste do Estado do Maranhão, Silva et al. (2012) utilizaram armadilhas do tipo CDC luminosas, com o objetivo de conhecer a associação dos flebotomíneos com os abrigos de animais domésticos em zonas rurais e peridomiciliares, como currais, galinheiros e chiqueiros. Foram capturados um total de 1.190 flebotomíneos de dez espécies diferentes, sendo as mais freqüentes *Lu. evandroi* (90,6 %; n= 1.078), *Lu. termitophila* (2,8 %; n= 33), *Lu. longipalpis* (2,4%; n=29) e *Lu. whitmani* (2,4%; n= 28) . O galinheiro foi o abrigo que apresentou maior número de indivíduos (88%), sendo que *Lu. evandroi* foi a espécie mais frequente neste ambiente (94,8%).

Legriffon et al. (2012), relataram os resultados de capturas realizadas no município de Sarandi (PR), utilizando armadilhas luminosas de falcão, em ambientes florestais e extra- florestais. Foram capturados 4.506 flebotomíneos de 13 espécies, com predomínio de *Nyssomyia whitmani* (*Ny. whitmani*) (71,8%), sendo que, a maior porção capturada deu-se no ambiente florestal (52,6%) em relação ao extraflorestal, representado por residências e chiqueiros, com 47,7% . Entretanto, a proporção de *Ny. whitmani* coletada foi maior no ambiente extraflorestal 38,9%, do que no florestal , sendo 33,5%.

Teles et al. (2013) identificaram flebotomíneos no município de Monte Negro, estado de Rondônia, Brasil, acreditando-se que fossem vetores da LTA no local. Foram utilizadas armadilhas CDC entre julho de 2006 e julho de 2008.

Foram capturados 1935 espécimes de 53 espécies de flebotomíneos, sendo três do gênero *Brumptomyia* e 50 do gênero *Lutzomyia*. As espécies predominantes encontradas foram *Lu. acanthopharynx*, *Lu. whitmani* e *Lu. davisii*, sendo que nenhum foi positivo para *Leishmania* spp.

Em relação aos métodos diagnósticos utilizados para avaliação da infectividade dos flebotomíneos, a correta identificação de vetores que ocorrem em uma área endêmica de leishmaniose, bem como as taxas de infecção natural das diferentes espécies de *Leishmania*, auxiliam na compreensão da epidemiologia da doença e também na adoção de medidas de prevenção e controle desta parasitose (MICHALSKY et al., 2002).

O processo de armazenamento de insetos para o diagnóstico da infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos utilizando-se de métodos moleculares, constitui-se em importantes passos prévios a serem sugeridos ao entomologista de modo a tornar esta ferramenta mais sensível e específica. A facilidade de transporte das amostras com preservação adequada do DNA de um local menos apropriado, para outro melhor equipado, mantém sua integridade por longos períodos, sendo importante as temperaturas de transporte e condições adequadas de conservação, que pode ser a seco ou conservado em algum tipo de reagente, como o etanol (PAIVA et al., 2007).

Monteiro (2012) citou que a realização da técnica de PCR em tempo real, a partir da pele de pavilhão auricular do hospedeiro vertebrado após repasto sanguíneo pelo *Phlebotomus papatasi* infectado com *L. (L.) major*, pode inocular no ato da picada de 100 a 100.000 parasitos. Cerca de 75% dos flebotomíneos liberaram aproximadamente 600 promastigotas enquanto os demais liberaram mais de 1.000 células. As altas doses infectantes foram associadas a intestinos fortemente infectados, com mais de 30.000 parasitos.

O estudo da fonte alimentar de vetores, inicialmente realizada pela técnica de precipitina, proporcionava suporte para análises epidemiológicas, bem como auxiliava na avaliação do potencial vetorial de importantes e numerosas espécies transmissoras de agentes patógenos ao homem, sendo um excelente indicador para avaliar os possíveis animais que participavam do ciclo biológico do vetor, bem como para identificar os possíveis reservatórios da doença. Esta técnica já foi largamente utilizada para identificação sanguínea na determinação dos repastos sanguíneos em espécimes coletados mediante vários procedimentos (LOROSA e ANDRADE, 1998).

Nos dias atuais, a técnica de precipitina foi substituída pelo teste de ELISA de captura, já que o mesmo apresenta maior sensibilidade e especificidade e tem sido a mais indicada para a detecção de sangue ingerido por pequenos dípteros, mais especificamente de flebotomíneos e culicídeos, como relatado na literatura (SERVICE, VOLLER, BIDWELL, 1986; QUINNELL, DYE, SHAW, 1992; COLMENARES et al., 1995; SVOBODOVÁ et al., 2003 ; MASSARÁ et al., 2004).

Em relação ao tratamento da leishmaniose, este envolve uma combinação de antimônio e alopurinol, como a primeira opção no protocolo terapêutico. Embora estes fármacos promovam, na maioria dos casos, a recuperação clínica de animais, eles não produzem a eliminação completa do parasita (SOLANO-GALEGO et al., 2007).

Até o momento, o tratamento para a doença, tanto canina como felina, é contraindicado no Brasil, de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, a qual proíbe o tratamento de cães com LV, por não existir até o momento uma garantia de que os fármacos existentes sejam eficazes ou que haja redução na transmissão da doença, ou ainda que o animal não se mantenha como reservatório, vetando em todo território nacional o tratamento da LV em cães infectados ou doentes com produtos de uso humano ou produtos não registrado no MAPA (Ministério da Agricultura Pecuário e Abastecimento) (WHO, 2012).

Na Espanha, o tratamento da leishmaniose felina é descrito em poucos casos, com resultados clínicos que variam de completo sucesso até eutanásia (MARCOS et al., 2009). Estes autores relataram um caso clínico de um gato de quatro anos de idade, com leishmaniose visceral, que apesar do tratamento, apresentou piora clínica e foi submetido á eutanásia. Isto possivelmente tenha ocorrido devido ao fato de que a leishmaniose felina continua a ser uma doença subdiagnosticada e mal esclarecida, enquanto a maioria de tratamentos clínicos empregados na LF segue protocolos de terapias usadas para cães (SIMÕES-MATTOS et al., 2002).

Na tentativa de barrar a expansão dessas doenças emergentes, o controle de flebotomíneos iniciou inconscientemente no Brasil a partir do uso do inseticida DDT contra o vetor da malária. Após o DDT, utilizou-se o BHC até 1992, quando por razões de impacto ambiental, uso descontrolado e aparecimento de resistência e tolerância em três espécies de flebotomíneos no

Velho Mundo (*Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus argentipes* e *Sergentomyia shortii*), a Organização Mundial da Saúde (OMS) proibiu a utilização dos organoclorados na maioria dos países. Foi então que se iniciou o uso de piretróides, buscando causar menor impacto ambiental (WHO, 2001).

A proteção dos animais por meio de inseticidas tópicos à base de deltametrina, como as coleiras, que tem como objetivo de repelir flebotomíneos implicados na transmissão, bem como a vacinação de cães, são medidas que tem mostrado efeitos adicionais no controle da leishmaniose visceral canina (PALATNIK et al., 2009). Ainda que, em outubro de 2011, a comercialização e o uso de uma das vacinas contra LV canina tenha sido deferida pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), este método ainda é controverso, uma vez que ainda não foi comprovado, por meio do xenodiagnóstico, que cães vacinados não são transmissores da enfermidade aos vetores. Além disso, o Ministério da Saúde e a OMS não recomendam o uso da vacina em Saúde Pública ou como um método preventivo da LV (WHO, 2012).

Estudos para prevalência sorológica indicam que os felinos podem ser infectados e apresentarem-se assintomáticos (DA SILVA et al., 2008). Apesar da existência de alguns estudos pesquisando a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas, não está claro ainda se as baixas prevalências de infecção e de doença em gatos provenientes de áreas endêmicas, são devidas a falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose.

3. JUSTIFICATIVAS

O Bosque Municipal Rangel Pietraróia, conhecido como Bosque Municipal de Marília, Estado de São Paulo, situa-se geograficamente a 22°12'16" da latitude sul e 49°55'96" de longitude oeste, localizado na zona urbana da cidade. Possui uma área total de 20 ha, cuja mata tem características de floresta atlântica, latifoliada e semidecídua (MASCARIN e DEMATTÊ, 2005). Pode-se verificar no Bosque a presença de alguns animais silvestres que circulam livremente, entre eles cotias, preguiças, teiús, sagüis e gambás, bem como alguns animais em cativeiro, tais como capivaras, veado catingueiro e algumas espécies de pássaros. É um ponto turístico e de lazer, proporcionando atividades culturais, pesquisas e educação infantil para a população Mariliense, com praça de alimentação ativa, onde existe a contínua circulação de pessoas, principalmente em finais de semana. Atualmente o Bosque vem enfrentando um grande problema de Saúde Pública, devido à superpopulação de gatos errantes que habitam o local, com aproximadamente 50 a 60 gatos abandonados pelos próprios moradores da cidade. Representa um problema de Saúde Pública, já que estes animais podem atuar como reservatórios de diversas zoonoses, dentre elas a leishmaniose, tendo em vista que já foram detectados flebotomíneos no local quando da colocação de armadilhas. No ano de 2011, a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), encontrou no Bosque Municipal, por meio de utilização de armadilhas luminosas do tipo CDC, exemplares de flebotomíneos, fato nunca registrado no Município. Além disso, no mês de outubro de 2011 um caso autóctone de leishmaniose visceral humana foi detectado em Marília, daí a necessidade constante de medidas de vigilância epidemiológica, e a proposta deste estudo, tendo em vista a existência de fatores favoráveis ao surgimento de casos de leishmaniose visceral canina e humana, bem como tegumentar, devido a presença de flebotomíneos já detectado no local, a presença de animais silvestres e uma grande concentração de gatos que possam atuar como reservatórios de leishmanias e fonte alimentar para os flebotomíneos, associado ao fato de que a cidade de Marília situa-se geograficamente muito próxima a Bauru (cerca de 100 km), área endêmica para leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral canina e humana.

*O*BJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1- OBJETIVOS GERAIS

- Pesquisar a ocorrência de *L.infantum* (syn. *L. chagasi*) e *L. (V.) braziliensis* em gatos errantes procedentes do Bosque Municipal de Marília (SP);
- Determinar a importância destes gatos como reservatórios das leishmanioses visceral e tegumentar;
- Avaliar a ocorrência da leishmaniose nestes animais, e nos flebotomíneos capturados no ambiente, como medida de vigilância epidemiológica para o município.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar os métodos sorológicos de (RIFI) e ELISA, cultura do conteúdo intestinal de flebotomíneos em meio de Liver Infusion Tryptose (LIT) e identificação das culturas e das amostras de sangue dos gatos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L.infantum* (syn. *L. chagasi*) e *L. (V.) braziliensis*;
- Identificar os flebotomíneos capturados no interior do Bosque Municipal de Marília-SP e analisar o comportamento alimentar dos mesmos pela aplicação do teste de ELISA de captura.

*M*aterial e *M*étodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foram realizados no Laboratório de Zoonoses – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP de Botucatu. O teste de ELISA foi realizado no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Sede Bauru. A identificação e dissecação dos flebotomíneos foi realizada no Laboratório de Entomologia da SUCEN de Araçatuba-SP, com auxílio da pesquisadora Dra. Lílian Colebrusco Rodas. Tendo em vista que os insetos não haviam se alimentado, não foi possível a realização do teste de ELISA de captura para identificação do hábito alimentar dos flebotomíneos, o qual seria realizado no Laboratório de Soroepidemiologia da SUCEN de São Paulo-SP, com auxílio das pesquisadoras Dra. Maria Esther de Carvalho e Dra. Izilda Curado.

5.1- Local da Pesquisa

O Bosque Municipal de Marília, Estado de São Paulo, situa-se a 22°12'16" de latitude sul e 49°55'96 " de longitude oeste, localizado na zona urbana da cidade. Possui uma área total de 20 ha (**Figura1**).



Figura 1. Mapa do bosque Municipal de Marília- SP “Rangel Pietraróia”. Botucatu, SP, 2013

Fonte: *Google Maps*

5.2- Características do Local

O bosque tem como vegetação a floresta atlântica, latifoliada e semidecídua (MASCARIN e DEMATTÊ, 2005). Em seu habitat encontram-se alguns animais soltos, entre eles cotias, preguiças, teiús, sagüis e gambás e, em cativeiro, capivaras, veado catingueiro e algumas espécies de pássaros. É um ponto turístico e de lazer, proporcionando atividades culturais, pesquisas e educação infantil para a população Mariliense, com praça de alimentação ativa, onde existe a continua circulação de pessoas. **(Figura 2)**



Figura 2. Características do Local de pesquisa. **(A)** Entrada Principal do Bosque Municipal de Marília; **(B)** Acúmulo de folhas (ambiente com matéria orgânica); **(C)** Viveiro dos pássaros. Botucatu, SP, 2013.

5.3- Colheita do sangue

Foram coletadas amostras de sangue de 50 gatos de ambos os sexos e idades variáveis, procedentes do Bosque Municipal de Marília - SP, que circulavam livremente por todo o local. Foram observadas e anotadas quaisquer alterações dermatológicas, bem como a condição corpórea dos animais no momento da coleta.

Como procedimento de contenção dos animais, os mesmos foram previamente anestesiados com Zoletil® (10 mg/kg) pela via intramuscular e mantidos em gaiolas até recuperarem-se da anestesia (**Figura 3**). As amostras de sangue dos animais foram coletadas uma única vez e, para que não houvesse repetição da amostra, estes foram marcados com esmalte na região da orelha. As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos para obtenção do soro e imediatamente acondicionadas em caixas de isopor sob refrigeração até a chegada ao Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Sede Bauru, onde foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e o soro obtido armazenado em freezer a – 20°C, até o momento de realização das técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA.



Figura 3. Gaiola de contenção para coleta de sangue de gato capturado no Bosque Municipal de Marília –SP. Botucatu, SP, 2013.

5.4- Captura dos flebotomíneos

A partir do mês de julho de 2012 foi realizada a captura dos flebotomíneos no Bosque Municipal de Marília, “Rangel Pietraróia”. Para isso, foram colocadas armadilhas do tipo CDC luminosas (**Figura 4**), instaladas em dez pontos estratégicos dentro dos 20 hectares do parque (**Figura 5**). Tais armadilhas ficavam posicionadas em uma altura de 1,5 metros, colocadas no período crepuscular (a partir das 18 horas até às 7 horas da manhã), por três noites consecutivas, durante os meses de julho, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro de 2012.

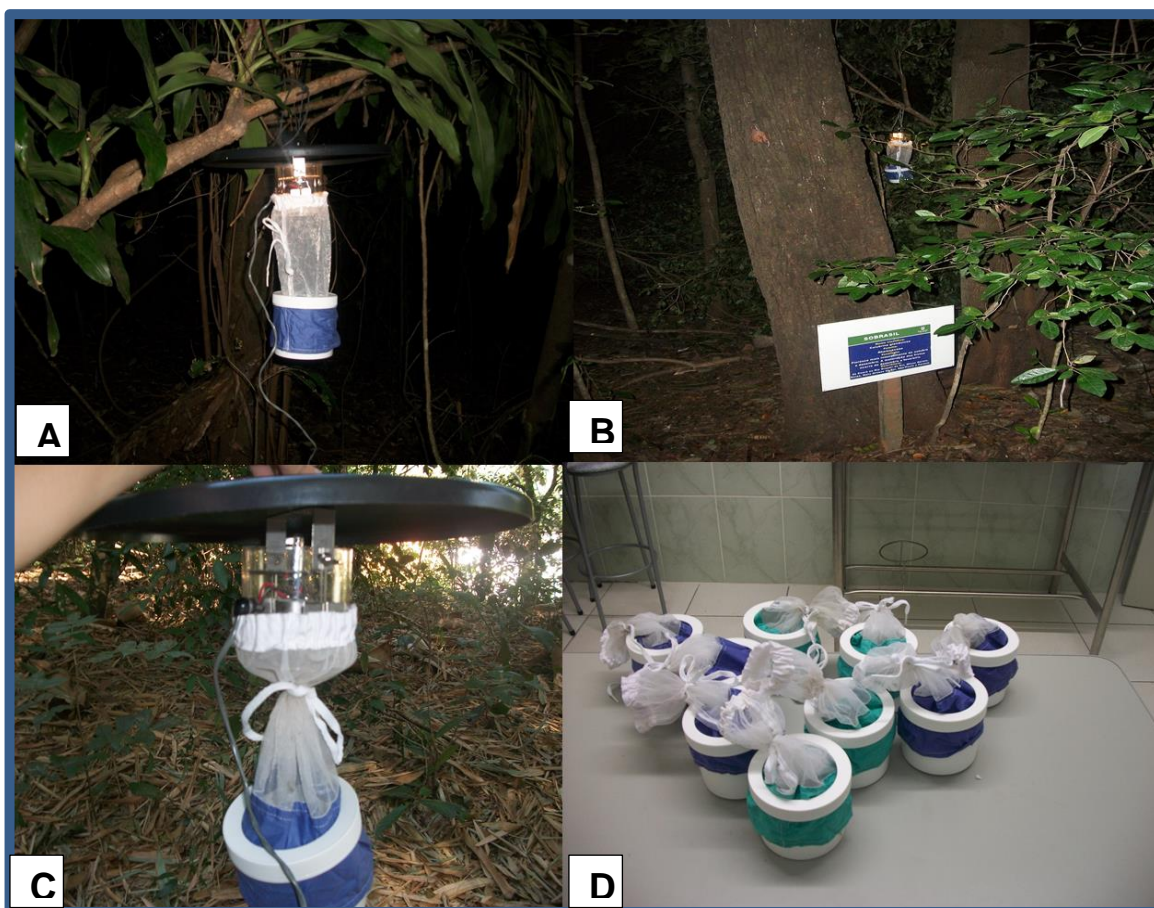


Figura 4. Procedimentos de captura de flebotomíneos no Bosque. **(A, B)** Armadilhas tipo CDC luminosas instaladas para captura de flebotomíneos no período crepuscular; **(C)** Armadilha CDC retirada no período da manhã; **(D)** Copos coletores das armadilhas na sala de triagem inicial. Botucatu, SP, 2013.

A **Figura 5** mostra os dez pontos de colocação de armadilhas no interior do Bosque Municipal “Rangel Pietraróia”.



Figura 5. Mapa do Bosque Municipal de Marília, “Rangel Pietraróia”, identificando os pontos de instalação das armadilhas para flebotomíneos.

Fonte: SUCEN – Marília (2012)

Legenda:

- Companhia da Policia Ambiental
- Entrada Bosque Municipal “Rangel Pietraróia”
- Centro de Educação Ambiental
- Viveiros dos pássaros
- Lanchonete
- Academia dos idosos
- Parquinho
- Lago
- Quiosques próximos ao lago
- Orquidário

Por três dias consecutivos de cada mês, no período total de seis meses, foram coletados os flebotomíneos com armadilhas do tipo CDC, distribuídas em 10 pontos estratégicos do bosque municipal de Marília- SP. Ao final de cada coleta, as armadilhas eram recolhidas e levadas a uma sala específica, para a realização da triagem dos insetos. Inicialmente, os insetos eram identificados a “olho nu” em busca de flebotomíneos, pelas suas características morfológicas específicas (**Figura 6**).

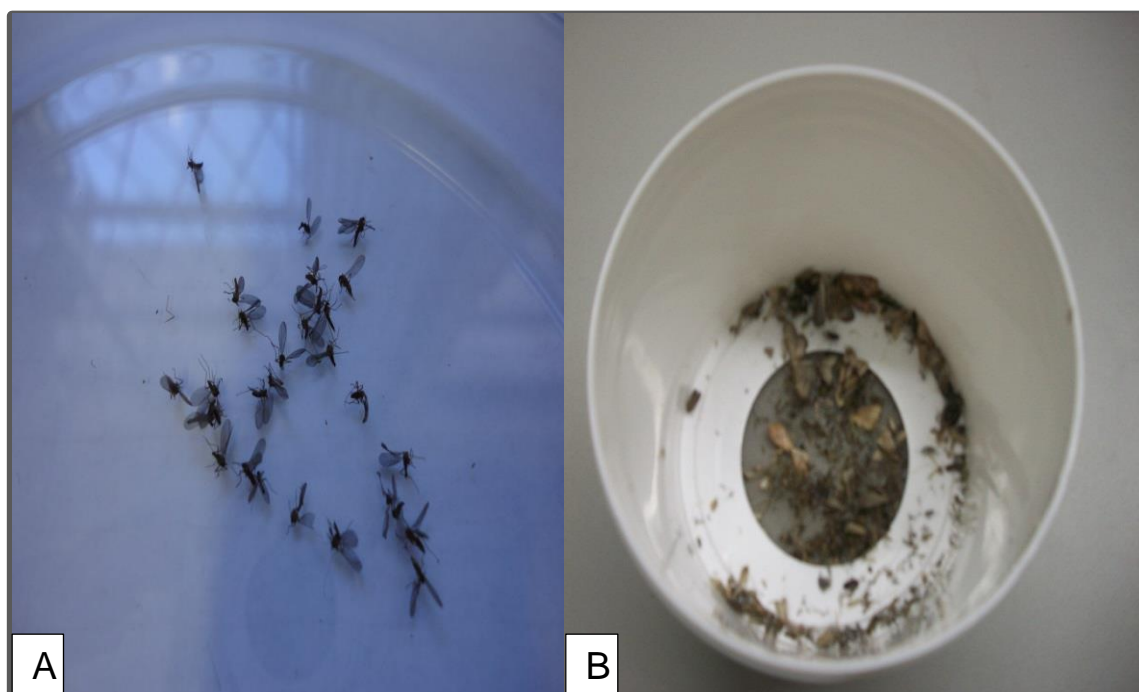


Figura 6. Triagem inicial dos flebotomíneos capturados. **(A)** Triagem dos mosquitos capturados no Bosque Municipal de Marília, com uso de armadilhas do tipo CDC luminosas **(B)** Copo de castro com insetos para triagem inicial. Botucatu, SP, 2013.

Após esta triagem, utilizou-se o capturador, mais conhecido como “Castro”, o qual constitui-se em uma espécie de mangueira com duas porções: uma para a sucção, a qual é separada por uma tela no seu intermédio interior, e a segunda porção, longa e transparente, onde os insetos ficam aprisionados. Por meio deste capturador é que se leva o flebotomíneo para dentro do copo de castro, o qual estará previamente forrado interiormente com gesso (**Figura 7**).



Figura 7. Procedimentos e materiais utilizados para a realização da triagem inicial dos flebotomíneos para posterior pesquisa de promastigotas para *Leishmania* spp. **(A)** Castro e Copo de castro para a triagem inicial dos flebotomíneos, **(B)** Copos de Castro com amostras de flebotomíneos capturados para a triagem inicial, **(C)** Gesso no interior do Copo de Castro para a conservação dos exemplares de flebotomíneos, **(D)** Copo coletor das Armadilhas Luminosas do Tipo CDC com insetos. Botucatu, SP, 2013.

Este procedimento tem por objetivo a conservação dos exemplares, caso haja algum flebotomíneo, até o envio ao laboratório, para sua identificação. Os copos de castro sempre encontram-se etiquetados com os dados da coleta: data, ponto de coleta e quantidade de flebotomíneos capturados. Se houver a captura dos flebotomíneos, uma vez armazenados no copo de castro, estes serão colocados em uma caixa de papelão e, para que permaneçam vivos, serão alimentados com mel e água destilada, na proporção de 1:1, até o terceiro dia da coleta. Estes procedimentos foram realizados durante todos os seis meses de captura (de julho a dezembro de 2012).

5.5- Dissecção e Identificação dos Flebotomíneos

Este procedimento foi realizado junto ao Laboratório de Entomologia da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), do município de Araçatuba- SP, com auxílio da pesquisadora Dra. Lílian Colebrusco Rodas. Caso houvesse captura de flebotomíneos pelas armadilhas colocadas nos pontos do Bosque, os mesmos foram sacrificados com uso de acetato de etila, em seguida transferidos para uma placa de Petri, onde foram submetidos a triagem sob estereomicroscópio, separando-se os machos das fêmeas. Para tal, os adultos eram clarificados e corados para análise microscópica. Para isto, foi adicionado aproximadamente, 1,0 mL de fenol líquido até cobrir os flebotomíneos.

Decorridas 24 horas, todo o fenol foi retirado com o auxílio de pipetas Pasteur e, após, adicionou-se aproximadamente, 1,0 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 10 % até cobrir todos os exemplares. Decorridas 12 horas, todo o KOH foi retirado com auxílio de pipetas Pasteur e, posteriormente, foram adicionadas de 2 a 3 gotas de Fucsina Ácida e ácido Acético 10 % até cobrir todos os exemplares. Após 30 minutos, toda a solução foi retirada. Em seguida, uma série de lavagens em soluções de álcoois foi feita por 10 minutos em cada diluição; iniciando-se com álcool etílico 70 %, seguido de 80 %, 90 %, 95% e finalizando-se com álcool absoluto. Após esses procedimentos, os exemplares foram imersos em Eugenol e, em seguida, identificados de acordo com a chave de identificação (GALATI, 1995,2003).

5.6-Exame parasitológico direto do conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados

Os exemplares das fêmeas foram submetidas à dissecação sob estereomicroscópio, com duas gotas de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). Caso a fêmea estivesse ingurgitada seriam retirados 50 µL de sangue diluído na solução e armazenados em congelador para análise do hábito alimentar; entretanto, todas as fêmeas coletadas não haviam se alimentado. Posteriormente, com o auxílio de estilete foi realizada a retirada do tubo digestivo para o exame parasitológico direto de formas promastigotas de *Leishmania* spp. e o reconhecimento da espécie de vetor mediante o aspecto morfológico da espermateca, sob aumento de 400 vezes. Em seguida, o material proveniente da dissecação, foi acondicionado em tubos plásticos tipo *ependorf* com álcool 70%, para posterior análise do conteúdo do trato digestório, quanto a presença de material de DNA de formas flageladas pela técnica do PCR. Tendo em vista que o exame parasitológico direto foi negativo, não foi possível realizar-se a cultura em meio LIT a partir do conteúdo intestinal dos flebotomíneos analisados.

5.7- Teste do Hábito Alimentar (ELISA) de captura

Inicialmente separa-se a cabeça e a parte do tórax para a identificação da espécie. Em seguida, coloca-se a parte posterior dos flebotomíneos em microtubos de 1,5 mL com tampa, adicionando-se 50 µL de PBS (pH 7,2) e tritura-se com o auxílio de pistilo acoplado ao homogenizador automático. Após, coloca-se 350 µL de PBS e centrifuga-se a 4.400 rpm por 7,5 minutos. Retira-se o sobrenadante e transfere-se para outro microtubo, sendo essencial manter as amostras a - 20° C até serem testadas. No momento do uso, deve-se aguardar o tempo necessário para atingir a temperatura ambiente. Adiciona-se 50 µL /poço do antissoro a ser testado diluído em solução de PBS, e mantido em temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida. Após, retira-se o antissoro da placa e bloqueia-se com 200 µL /poço de PBS pH 7,2 Tween- 20 (PBS-T20) 0,005 % e leite desnatado Molico 5 %, permanecendo-se por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, a solução de leite é retirada da placa, e posteriormente a placa é invertida . Posteriormente a placa é batida sobre papel absorvente para remover o excesso de líquido residual, sem

deixar secar completamente. Adiciona-se 50 µL /poço das amostras a serem testadas , que serão acrescidos do controle positivo, negativo e branco, incubando-se a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Após lavagem por três vezes com PBS-T20 adiciona-se 50 µL /poço de conjugado peroxidase diluído em leite a 2,5 %, e esta placa deverá ser incubada a temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida. Por último, efetuar a lavagem novamente com PBS-T20 seguido de uma lavagem com água destilada. Posteriormente, adiciona-se 50 µL/ poço de Substrato, e após permanece em câmara escura e a referência será medida, pelo aparecimento da coloração do controle positivo. Em seguida, é colocado no leitor de microplacas á 405nm. Esta técnica segue o protocolo da Superintendência de Controle de Endemias- SUCEN, de São Paulo. Entretanto, tendo em vista que todos os flebotomíneos capturados não se alimentaram de sangue, não foi possível realizar este teste.

5.8- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* e *Leishmania (V.) braziliensis*

Os antígenos utilizados constituíam-se em formas promastigotas de *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis*, encaminhados pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC/FIOCRUZ. Cepas de *Leishmania infantum* foram mantidas em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal- Nicolle (NNN) e cepas de *L. (V.) braziliensis* mantidas em tubos contendo 10 mL de meio Schneider (Sigma®) adicionado de 20% de soro fetal bovino e 5 mL de meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN). Tais cepas eram repicadas semanalmente nos dois tipos de meio de cultura. Para cada parasita, em capela de fluxo laminar, retirava-se uma gota de cada um dos tubos de manutenção mais recentes (repique da semana anterior), colocando-a entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40 vezes, para avaliação do crescimento das formas promastigotas. Do tubo que apresentasse parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, foi repicado 0,5 mL para três novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos foram mantidos em estufa BOD a 25°C. Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foram adicionados de 2 a 3 mL de

solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por mais três vezes. Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica, utilizando-se como antígeno quando houvesse de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, em avaliação de 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm. As lâminas de antígeno foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso, por um período máximo de duas semanas. A técnica de RIFI foi realizada segundo Camargo (1966).

5.9- Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para *L. infantum* (syn. *L. chagasi*)

Para o teste de ELISA, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY) foram sensibilizadas com o antígeno solúvel bruto de *L. infantum*. Os soros foram diluídos a 1:400 em duplicata, e o conjugado (Cat IgG- heavy and light chain Antibody, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluído a 1:40.000. A técnica foi realizada de acordo com Lima et al. (2005).

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 SST 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com PBS-T, para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados 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 PBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com PBS-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG 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 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada 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 D.O dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram 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 testado de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor das D.O dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (1980).

Os níveis de anticorpos de cada soro testado foram calculados mediante a determinação do valor de A/P (amostra teste em relação ao controle positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos de acordo com a equação preconizada por Machado et al.(1997), demonstrada a seguir.

$$\frac{\text{ABSORBÂNCIA MÉDIA DA AMOSTRA}}{\text{ABSORBÂNCIA MÉDIA DO SORO DE REFERÊNCIA NEGATIVO}}$$

A/P = _____

$$\frac{\text{ABSORBÂNCIA MÉDIA DAS AMOSTRAS DE SORO DE REFERÊNCIA POSITIVO}}{\text{ABSORBÂNCIA MÉDIA DE AMOSTRA DE SORO DE REFERÊNCIA NEGATIVO}}$$

Após a realização do exame de ELISA, calculou-se o ponto de corte, os níveis de ELISA (NE) e os valores de amostra em relação ao positivo (A/P).

6.0- Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para *L. (V.) braziliensis*

Para o ELISA, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY) foram sensibilizadas com o antígeno total parcialmente solúvel de *L. (V.) braziliensis*. O antígeno bruto foi produzido no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado. Os soros foram diluídos a 1:40 em duplicata, e o conjugado (Cat IgG- heavy and light chain Antibody, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluído a 1:40.000. A técnica foi realizada de acordo com Figueiredo et al. (2009). Os valores de D.O dos soros e os níveis de anticorpos foram determinados de acordo com a preconização de Voller et al. (1980) e Machado et al. (1997), respectivamente descritas no **item 5.9**.

6.1- Preparo dos cultivos para extração do DNA

Segundo Pinto (2000) com algumas modificações, as culturas positivas e negativas do conteúdo intestinal dos flebotomíneos foram lavadas três vezes em Solução Salina Tamponada (PBS) estéril, pH 7,4, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sedimento armazenado em microtubos estéreis livres de DNases e RNases a -20°C, até o momento do uso para extração do DNA.

6.2- Extração do DNA a partir das amostras de sangue dos gatos

A extração do DNA a partir das amostras de sangue dos gatos capturados no Bosque Municipal de Marília foi realizada utilizando-se de kit comercial Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit da GE Healthcare®, seguindo-se as normas recomendadas pelo fabricante (**ANEXO 8**)

6.3 -Extração do DNA a partir do conteúdo intestinal dos flebotomíneos

A extração do DNA a partir do conteúdo intestinal das duas fêmeas *Lu. longipalpis* e das quatro fêmeas do gênero *Brumptomyia* spp. foram realizadas utilizando-se o kit de extração DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN®), seguindo-se as normas recomendadas pelo fabricante (**ANEXO 9**)

6.4- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para *L. infantum* (syn. *L.chagasi*)

Para amplificação dos produtos da região específica do gene de *Leishmania infantum*, foram utilizados os iniciadores descritos por Neto et al. (2012).

LCS1 5'-GCAATGCCAGCTACATATATG-3'

LCS3 5'- CAGCTTTTGGGTGGGTAACA- 3'

Nesta reação, os produtos resultantes apresentam 259 pares de base (pb), que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica do gene 18S rDNA para *L. infantum*.

Foram utilizados 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl), 1,5U de *Taq*-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mM de MgCl₂, 10 mM de DNTPs, 2 µL da amostra testada e 17,5 µL de água ultra pura (MIX-PCR), em cada tubo de reação de 0,2 mL. As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram seguidas conforme descritas por Neto et al. (2012), sendo a desnaturação inicial em um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto e uma extensão final de 72°C durante 2 minutos.

6.4.1- Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para isso, alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5µL de solução de azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5. O gel para eletroforese foi preparado com 1,5g de agarose pura em 100mL de tampão Tris-EDTA-Borato (TBE) 0,5. A agarose foi dissolvida em TBE 0,5X previamente aquecido, para que se dissolva totalmente, adicionando-se solução de Syber Safe®. O material foi distribuído uniformemente na cuba de eletroforese. A corrida foi realizada a 80 volts por 50 minutos. As bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300nm. Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), e como negativos água miliQ estéril. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado DNA Ladder, 100pb. A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta (296 nm), sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificado a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo.

6.5- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *L. (V.) braziliensis*

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi realizada com 2µL do DNA extraído adicionado ao tampão de PCR contendo 200mM de DNTp, 5µL de tampão 10X , 2,5U de Taq DNA Polimerase e 1 pg de cada iniciador B1 e B2 e perfazendo um volume total de 50 µL. Estes iniciadores amplificam especificamente o kDNA do complexo *L. (V.) braziliensis* resultando em um produto de 750 pb (DE BRUJIN; BARKER, 1992).

B1 5´GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3´

B2 5´CTA ATT GTG CAC GGG GAG G 3´

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram de acordo com Alexander et al. (1998), consistindo em um total de

35 ciclos, sendo um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos e 60°C por 1 minuto, seguido por 33 ciclos a 95°C por 30 segundos, e 60°C por 1 minuto; e um ciclo final de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

6.5.1- Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados foi realizada conforme descrito no item 7.1.2, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificado a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo, esperando-se um padrão visual de 750pb, que correspondem aos tamanhos esperados para *L. (V.) braziliensis*.

6.6- Análise estatística

Inicialmente a prevalência de *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum* foi estimada com base em cada teste diagnóstico. O coeficiente Kappa (e intervalos de confiança 95%) foi utilizado para estimar a concordância entre os testes diagnósticos. Estatísticas descritivas foram produzidas para as variáveis do Elisa Indireto DO-BIk e A /P. As análises foram realizadas com os procedimentos PROC FREQ e PROC MEANS (SAS Institute, 2011).

Resultados

7- RESULTADOS

7.1- CAPTURAS DOS FLEBOTOMÍNEOS

A primeira captura dos flebotomíneos realizada em dez diferentes pontos do Bosque, conforme pode-se observar na **Figura 5**, ocorreu no mês de julho/2012, tendo apresentado baixas temperaturas nas três noites de coleta (a partir das 18 horas até às 7 horas da manhã). Coletaram-se alguns insetos suspeitos, porém no final da coleta os mesmos não sobreviveram. Finalizado os três dias da coleta, todos os insetos foram prontamente encaminhados ao Laboratório de Entomologia da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) em Araçatuba-SP para identificação, sendo que todos os insetos não foram caracterizados como flebotomíneos. Novas coletas foram realizadas nos meses seguintes até dezembro de 2012, tendo-se coletado uma espécie de *Lu. longipalpis* fêmea no mês de agosto (ponto 5 - lanchonete), porém o exame parasitológico para a pesquisa de formas evolutivas de *Leishmania* spp. a partir do tubo digestivo foi negativo e sem presença de sangue no conteúdo intestinal. No mês de setembro, em três pontos de coleta (ponto 2 – entrada do Bosque e ponto 4 – viveiro dos pássaros) foram capturados dois espécimes de *Lu. longipalpis* machos (**Figura 8**) e um espécime fêmea de *Lu. longipalpis* em dezembro no ponto 1- Companhia da Policia Ambiental, com parasitológico negativo e sem presença de sangue no conteúdo intestinal. Foram capturadas também quatro espécies fêmeas de flebotomíneos do gênero *Brumptomyia* sp., no mês de dezembro (três mosquitos capturados no ponto 1 e um capturado no ponto 5 e somente um macho do gênero *Brumptomyia* spp. no mesmo ponto.



Figura 8. Espécimes machos de *Lutzomyia longipalpis* capturados no Bosque Municipal de Marília, utilizando-se armadilha CDC luminosa .Botucatu, SP, 2013.

As diferentes espécies de flebotomíneos capturados no Bosque pode ser visualizadas na **Figura 9.**

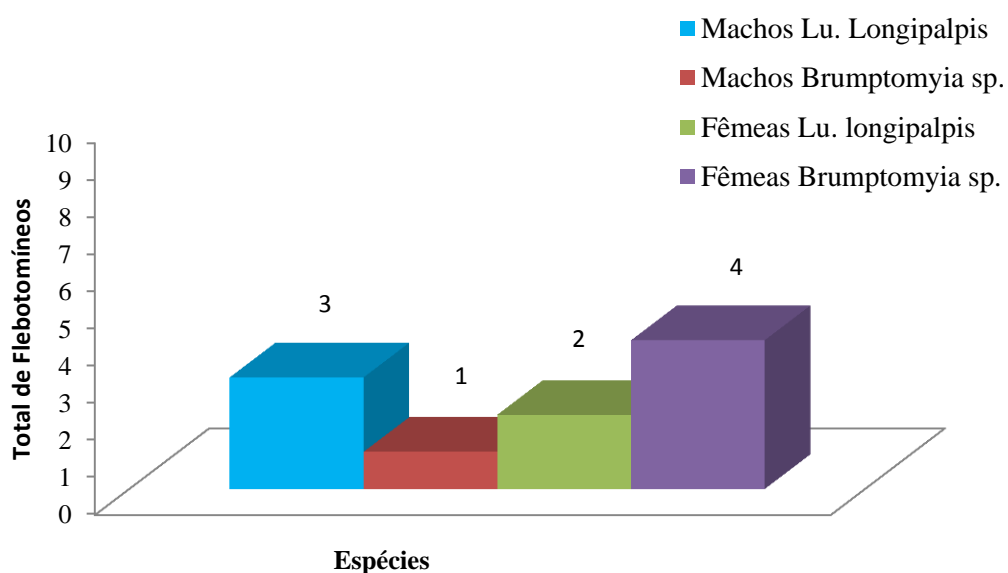


Figura 9. Espécies de flebotomíneos capturados no Bosque Municipal de Marília, distribuídos em dez diferentes pontos. Botucatu, SP, 2013.

Entre os dez exemplares capturados, dois (20%) eram de fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* e quatro (40 %) eram de fêmeas do gênero *Bumptomysia* spp; em relação aos machos, dois (20%) eram da espécie *Lu. longipalpis* e apenas um exemplar (10%) era da espécie *Brumptomysia* spp.

7.2-Exame parasitológico direto do conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados

Os exemplares das fêmeas foram submetidas à dissecação sob estereomicroscópio, com duas gotas de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) para a pesquisa de formas flagelares de *Leishmania* spp. Das seis fêmeas analisadas (quatro da espécie *Brumptomysia* spp. e duas *Lu. longipalpis*), todas foram negativas ao exame parasitológico. Portanto, o exame de cultura do conteúdo intestinal não foi realizado.

7.3- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum*

Como podemos verificar na **Tabela 1**, 8% dos animais (4/50) apresentaram reatividade ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum*. Os animais em questão não apresentavam ao momento da coleta de sangue nenhuma alteração clínica dermatológica evidente, nem emagrecimento aparente (**Figura 3**).

Tabela 1. Número de felinos positivos para a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP “Rangel Pietraróia”. Botucatu, SP, 2013.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	
<i>L. infantum</i>	
Titulação	
Nº DO GATO	<i>L. infantum</i>
13	1:640
14	1:160
15	1:40
18	1:40

Ponto de Corte para RIFI de *L. infantum* = 40 (Camargo, 1966)

Como podemos verificar na **Figura 10**, apenas quatro animais dos 50 estudados (8%) foram reagentes à RIFI para *L. infantum*, sendo que dois destes com altos títulos (160 e 640) e os outros dois com títulos mais baixos (40), como pode ser observado na **Tabela 1**. Nenhum dos quatro animais apresentavam lesões de pele no momento da coleta.

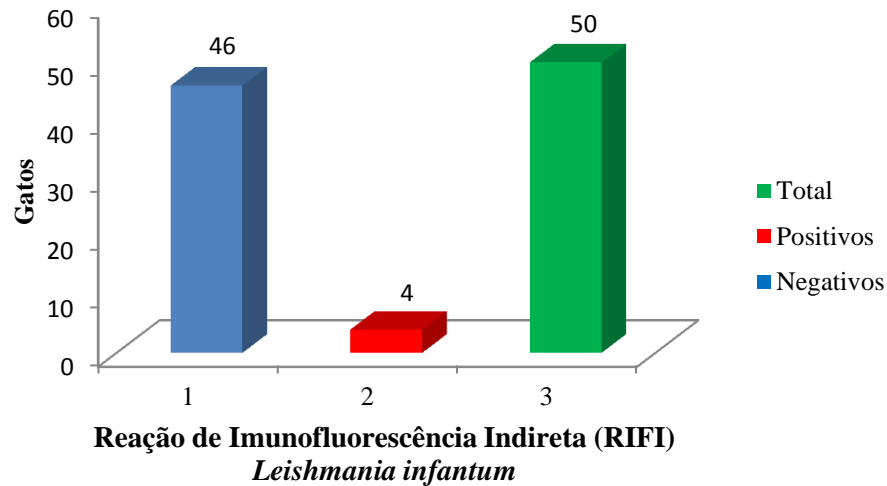


Figura 10. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* realizado em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP. Botucatu, SP, 2013.

7.4- Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. (V.) braziliensis*

No presente estudo, todas as 50 amostras de soros felinos foram não reagentes para *L. (V.) braziliensis*.

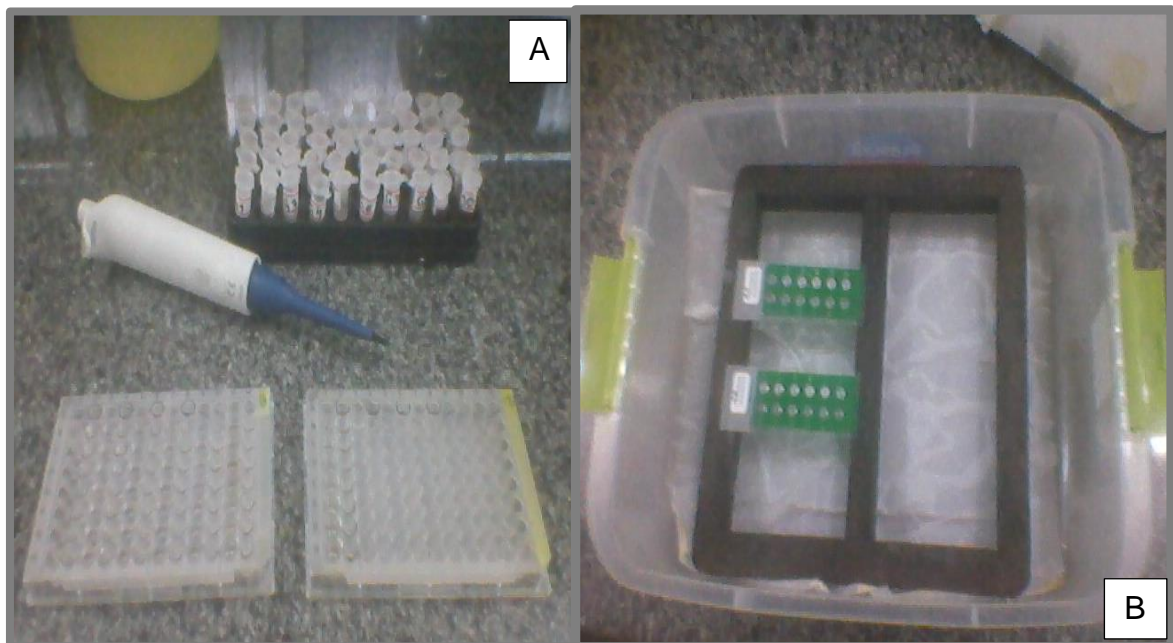


Figura 11. Procedimentos da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando soro dos gatos. **(A)** Amostras de soros de gatos e placas para a diluição; **(B)** Lâminas de RIFI com as amostras para a titulação. Botucatu, SP, 2013.

7.5 - Teste Imunoenzimático (ELISA Indireto) para *L. infantum*

Após o término do teste, calculou-se os pontos de corte, os níveis do ELISA (NE) e os valores das amostras em relação ao positivo. Dessa forma a Densidade óptica (D.O) média dos gatos negativos estabeleceu-se em $0,033167 \pm 0,000764$, resultando em um ponto de corte de $D.O \geq 0,083$ e nível (NE ≥ 3). Já os gatos positivos apresentaram densidade óptica média igual a $0,142 \pm 0,0337$. Para a média da D.O os soros controle positivos utilizados foram procedentes de duas áreas endêmicas, Ilha Solteira e Bauru. Os soros controle negativos utilizados foram procedentes de gatos dos mesmos locais, previamente testados e negativos ao teste.

Desta forma, trabalhou-se com a média de absorbância para os controles (positivos e negativos) e com valores de A/ P para os soros testados. A demonstração dos níveis do ELISA podem ser visualizados no **(Apêndice 4.)** Analisando-se os resultados, obteve-se uma reatividade positiva de 42% (21/50) para leishmaniose, distribuída em níveis ELISA (NE) superior ou igual ao ponto de corte (NE ≥ 3). Vinte e nove (29) dos 50 animais testados (58%) foram considerados negativos, como podemos verificar na **(Figura 12)**. O maior número de gatos com reatividade positiva foi observado no NE = 9 (6/50) e negativos foi no NE=0 (27/50). **(Figura 13)**

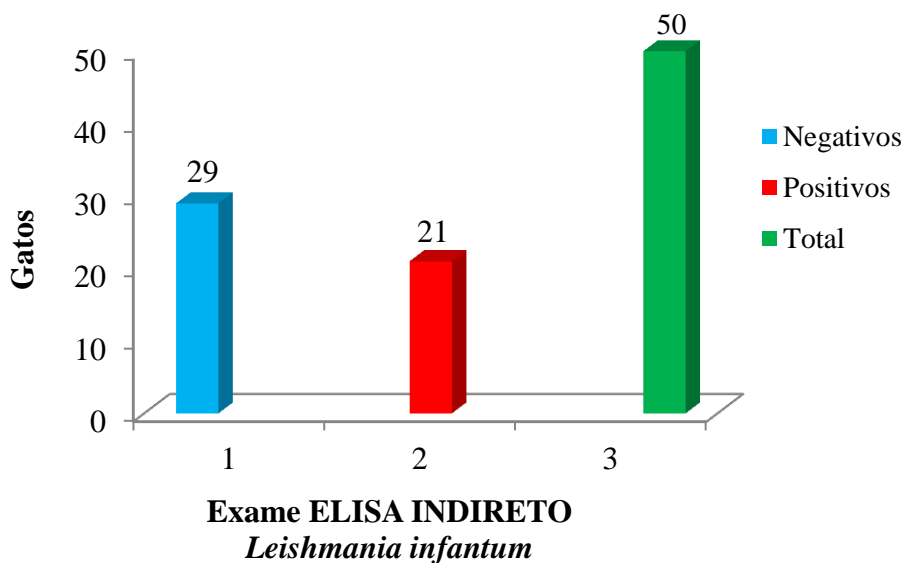


Figura 12. Resultados obtidos ao teste de ELISA Indireto para *L. infantum* em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu, SP, 2013.

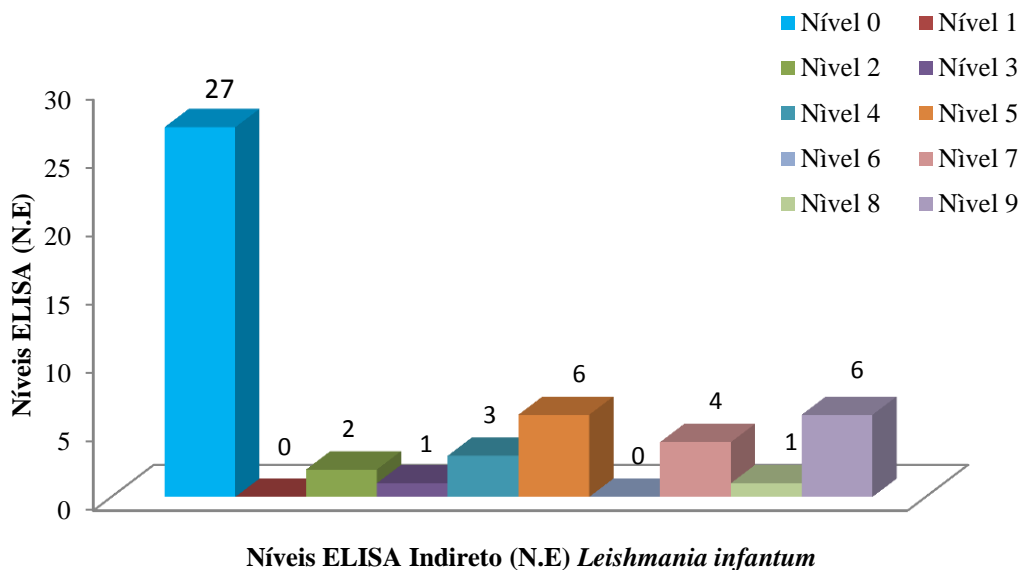


Figura 13. Resultados obtidos aos níveis do teste de ELISA Indireto para *L. infantum* em 50 soros de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP. Botucatu, SP, 2013.

7.6 -Teste Imunoenzimático (ELISA Indireto) para *L. (V.) braziliensis*

Após o término do teste, calculou-se os pontos de corte, os níveis do ELISA (NE) e os valores das amostras em relação ao positivo. Dessa forma a Densidade óptica (D.O) média dos gatos negativos ficou estabelecido em $0,0805 \pm 0,04272$, resultando em um ponto de corte de $D.O \geq 0,201$ e nível ($NE \geq 1$). Já os gatos positivos apresentaram densidade óptica média igual a $0,8376 \pm 0,731$. Para a média do D.O o soro controle positivo utilizado foi procedente de duas áreas endêmicas, Ilha Solteira e Bauru. Os gatos utilizados para controles negativos foram procedentes dos mesmos locais dos positivos.

Desta forma, trabalhou-se com a média de absorbância para os controles (positivos e negativos) e com valores de A/ P para os soros testados. A demonstração dos níveis ELISA podem ser visualizados no **Apêndice 6**.

Analisando-se os resultados, pôde-se observar uma reatividade positiva de 18% (9/50) para leishmaniose distribuída em níveis ELISA (NE) superiores ou iguais ao ponto de corte ($NE \geq 1$) e 82% (41/50) foram considerados negativos (**Figura 14**). O maior número de gatos com reatividade positiva foi observado no $NE = 1$ (5/50) e de negativos no $NE = 0$ (41/50) (**Figura 15**).

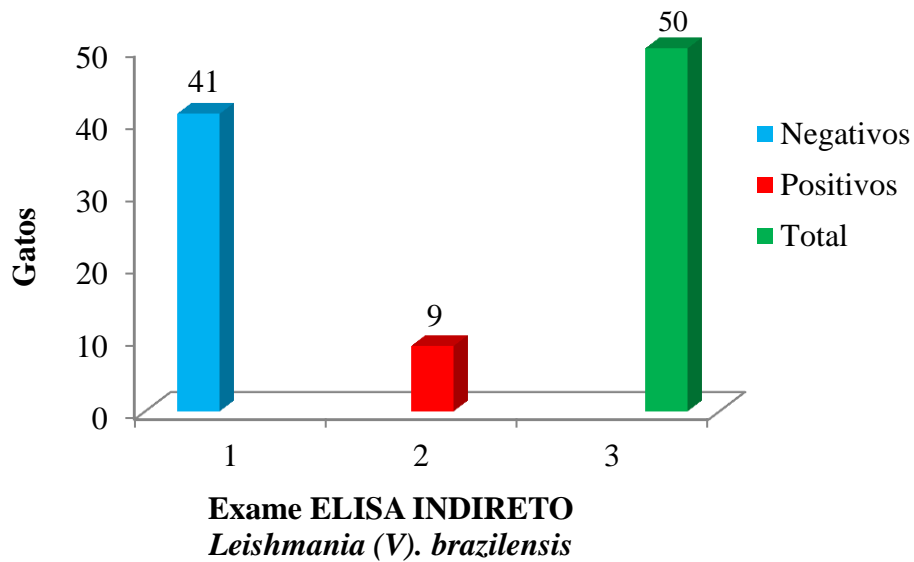


Figura 14. Resultados obtidos ao teste de ELISA Indireto para *L. (V.) braziliensis* em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu, SP, 2013.

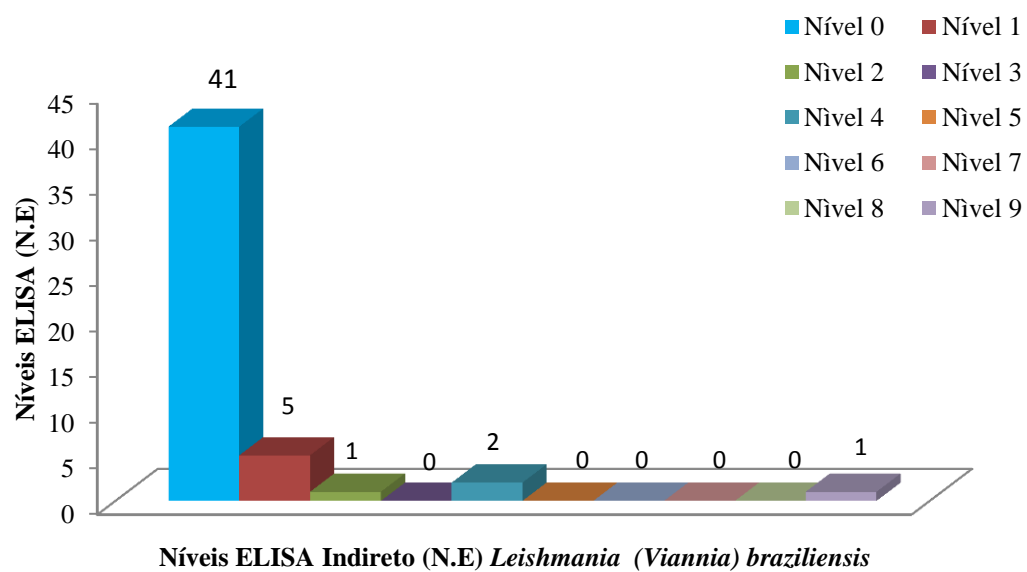


Figura 15. Resultados obtidos aos níveis do teste de ELISA Indireto para *L. (V.) braziliensis* em 50 soros de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP. Botucatu, SP, 2013.

7.7- Comparação dos resultados positivos aos exames sorológicos de ELISA Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* e *L.(V.) braziliensis* realizados em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP

Das 50 amostras de soros de gatos avaliadas, um total de 42 % (21/50) dos animais apresentaram reatividade para *L. infantum* ao exame de ELISA. Entretanto, destes 21 animais, apenas quatro (19%) também foram reagentes à RIFI, para a mesma espécie. Os resultados do ELISA para *L. (V.) braziliensis* apresentaram 18% (9/50) de animais reagentes e nenhum gato foi reagente à RIFI para *L. (V.) braziliensis*. A comparação dos resultados de RIFI e ELISA podem ser visualizados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Comparação dos resultados positivos aos exames sorológicos de ELISA Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* e *L.(V.) braziliensis* realizados em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP. Botucatu, SP, 2013.

Nº Gatos	ELISA <i>L. infantum</i>	ELISA <i>L.(V.) braziliensis</i>	RIFI / Título <i>L. infantum</i>	RIFI <i>L.(V.) braziliensis</i>
2	R	R	NR	NR
5	R	NR	NR	NR
7	R	NR	NR	NR
9	R	NR	NR	NR
11	R	R	NR	NR
12	R	NR	NR	NR
13	R	R	R (640)	NR
14	R	R	R (160)	NR
15	R	R	R (40)	NR
17	R	NR	NR	NR
18	NR	NR	R (40)	NR
20	NR	NR	NR	NR
22	R	NR	NR	NR
23	R	R	NR	NR
25	R	R	NR	NR
26	R	R	NR	NR
31	NR	NR	NR	NR
37	R	NR	NR	NR
39	R	NR	NR	NR
43	R	NR	NR	NR
44	R	NR	NR	NR
45	R	NR	NR	NR
50	R	R	NR	NR

R= Reagente/ NR= Não reagente

Das 50 amostras de soros de gatos avaliadas, um total de 42% (21/50) apresentaram reatividade para *L. infantum* ao exame do ELISA Indireto; entretanto, apenas quatro amostras (8%) foram reagentes à RIFI, para a mesma espécie. Em relação aos resultados do ELISA indireto para *L. (V.) braziliensis*, apenas 18 % (9/50) amostras foram reagentes e nenhum gato foi reagente à prova de RIFI para a mesma espécie.

7.8- Exames Moleculares

7.8.1- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para *L. infantum*

Dos 50 gatos avaliados, nenhum deles apresentaram positividade para *Leishmania infantum* utilizando-se os iniciadores específicos LCS1 e LCS3.

7.8.2- Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para *L. (V.) braziliensis*

Dos 50 gatos avaliados, nenhum deles apresentaram positividade para *Leishmania infantum* utilizando-se os iniciadores específicos B1 e B2.

7.8.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis* a partir do conteúdo Intestinal dos flebotomíneos

Os flebotomíneos fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* e *Brumptomyia* spp. foram negativos ao teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tanto para *Leishmania infantum* como também para *L. (V.) braziliensis*.

7.9 – Comparação dos resultados dos exames moleculares e sorológicos para *L. infantum* realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP

A **Tabela 3.** revela a comparação dos resultados positivos de ELISA e RIFI para *L. infantum* com os resultados obtidos ao exame de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. infantum*, realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP.

Tabela 3. Comparação dos Resultados dos exames moleculares e sorológicos para *L.infantum* realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP . Botucatu-SP, 2013.

Nº Gatos	ELISA <i>L. infantum</i>	RIFI/ Título <i>L. infantum</i>	PCR <i>L. infantum</i>
2	R	NR	NR
5	R	NR	NR
7	R	NR	NR
9	R	NR	NR
11	R	NR	NR
12	R	NR	NR
13	R	R (640)	NR
14	R	R (160)	NR
15	R	R (40)	NR
17	R	NR	NR
18	NR	R (40)	NR
20	NR	NR	NR
22	R	NR	NR
23	R	NR	NR
25	R	NR	NR
26	R	NR	NR
31	NR	NR	NR
37	R	NR	NR
39	R	NR	NR
43	R	NR	NR
44	R	NR	NR
45	R	NR	NR
50	R	NR	NR

R= Reagente/ NR= Não reagente

Das 50 amostras de soros de gatos avaliados, um total de 42% (21/50) das amostras apresentaram reatividade para *L. infantum* ao exame do ELISA indireto; porém, ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), somente 8% (4/50) das amostras foram positivas. Em relação aos resultados obtidos à prova de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum*, nenhuma amostra de sangue foi positiva.

7.10- Comparação entre os resultados dos exames sorológicos das amostras de sangue dos gatos positivos para *L. (V.) braziliensis* com os resultados moleculares de PCR

A **Tabela 4.** revela a comparação dos resultados positivos de ELISA e RIFI para *L.(V.) braziliensis* com os resultados obtidos ao exame de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. (V.) braziliensis*, realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP.

Tabela 4. Comparação dos resultados positivos de ELISA e RIFI para *L.(V.) braziliensis* com os resultados obtidos ao exame de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. (V.) braziliensis*, realizados a partir das amostras de sangue dos 50 gatos capturados no Bosque Municipal de Marília – SP

Nº Gatos	ELISA <i>L.(V.) braziliensis</i>	RIFI <i>L. (V) braziliensis</i>	PCR <i>L.(V.) braziliensis</i>
2	R	NR	N
11	R	NR	N
12	NR	NR	N
13	R	NR	N
14	R	NR	N
15	R	NR	N
17	NR	NR	N
18	NR	NR	N
22	NR	NR	N
23	R	NR	N
25	R	NR	N
26	R	NR	N
37	NR	NR	N
39	NR	NR	N
43	NR	NR	N
44	NR	NR	N
45	NR	NR	N
50	R	NR	N

R= Reagente/ NR= Não reagente

Um total de 18 % (9/50) amostras apresentaram reatividade para *L. (V.) braziliensis* ao teste de ELISA Indireto; entretanto à prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) nenhuma amostra foi reagente. Ao teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. infantum* nenhuma amostra de sangue foi positiva.

7.11 Análise estatística dos resultados

A **Tabela 5** apresenta a prevalência de *L. (V.) braziliensis* ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP, podendo-se observar que 100% das amostras testadas foram negativas para *Leishmania braziliensis*.

Tabela 5. Prevalência de *L. (V.) braziliensis* ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu- SP, 2013.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. (V.) braziliensis</i>		
Amostras Positivas	Frequência	Percentual %
0	50	100 %

A **Tabela 6** apresenta a prevalência de *L. infantum* no teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) dos 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Um total de 8% (4/50) amostras foram reagentes, tendo-se 4% apresentado título 40 e apenas 2% título 160. O maior título obtido (640) foi encontrado em apenas uma amostra (2%).

Tabela 6. Prevalência de *L. infantum* ao teste de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu- SP, 2013.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>L. infantum</i>		
Titulos das amostras positivas	Frequência	Percentual %
0	46	92
40	2	4
160	1	2
640	1	2

A **Tabela 7** apresenta a prevalência de *L. (V.) braziliensis* ao teste de ELISA Indireto em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Um total de 18 % (9/50) foram reagentes. Entretanto, 82% (41/ 50) dos animais foram negativos a este teste.

Tabela 7. Prevalência de *L. (V.) braziliensis* ao teste de ELISA Indireto a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu- SP, 2013.

Exame Elisa Indireto para <i>L. (V.) braziliensis</i>		
Número de amostras	Frequência	Percentual %
41 (N)	41	82
9 (P)	9	18

N= negativo / **P=** positivo

A **Tabela 8** apresenta a prevalência de *L. infantum* ao exame de Elisa Indireto a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Um total de 40 % (20 /50) foram reagentes.

Tabela 8. Prevalência de *L. infantum* ao teste de ELISA Indireto a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu- SP, 2013.

Exame Elisa Indireto para <i>L. infantum</i>		
Número de amostras	Frequência	Percentual %
30 (N)	30	60
20 (P)	20	40

N= negativo / **P**= positivo

A **Tabela 9** apresenta a prevalência de *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum* ao exame de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP.

Tabela 9. Prevalência de *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum* ao exame de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue de 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília- SP. Botucatu- SP, 2013.

Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>		
Total de Amostras positivas	Frequência	Percentual %
0	50	100

A **Tabela 10** apresenta as estatísticas de proporções e seus respectivos intervalos de confiança entre os testes de ELISA Indireto, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. infantum* e *L. (Viannia) braziliensis*. A maior proporção de concordância foi entre os testes de RIFI para *L. infantum* e PCR para *L. infantum* com 0,92 ou 92% de concordância. A menor proporção encontrada foi entre os testes de ELISA para *L. infantum* e PCR para *L. infantum*, com 0,60 ou 60% de concordância entre eles.

Tabela 10- Proporções de concordância e respectivos intervalos de confiança para os testes de ELISA para *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, RIFI para *L. (V.) braziliensis* e *L. infantum* e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. braziliensis* e *L. infantum*, realizado em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília –SP. Botucatu, SP, 2013.

Testes	Proporção
ELISA <i>L. braziliensis</i> x RIFIL.<i>braziliensis</i>	0,82[0,71;0,93]
ELISA <i>L. braziliensis</i> x PCR <i>L. braziliensis</i>	0,82[0,71;0,93]
RIFI <i>L. braziliensis</i> x PCR <i>L. braziliensis</i>	1,00[1,00;1,00]
ELISA <i>L. infantum</i> x RIFI <i>L. infantum</i>	0,68[0,55;0,81]
ELISA <i>L. infantum</i> x PCR <i>L. infantum</i>	0,60[0,46;0,74]
RIFI <i>L. infantum</i> x PCR <i>L. infantum</i>	0,92[0,84;0,99]

A **Tabela 11** demonstra a estatística descritiva relativa das variáveis média das amostras subtraído o branco (DO-Blk) e as amostras testes em relação ao controle positivo (A/P) do Teste de Elisa Indireto, tendo-se obtido 0,03 como o menor valor da amostra, e o maior valor 2,02. O coeficiente de variação destes resultados foi de 163,72 das amostras subtraído o branco (DO-BLK) e 305,14 o coeficiente das amostras teste em relação ao controle positivo (A/P).

Tabela 11- Estatística descritiva relativas às variáveis média das amostras subtraído o branco (DO-Blk) e amostra teste em relação ao controle positivo (A/P). Botucatu, SP, 2013.

	DO - Blk	A/P
Média	0,17	0,12
DP	0,28	0,37
Mediana	0,11	0,05
Mínimo	0,03	-0,06
Máximo	2,02	2,56
Coeficiente de variação	163,72	305,14

Na **Tabela 12**, avaliou-se o número de percentual de ocorrências de amostras positivas ao exame de ELISA Indireto dos soros dos 50 gatos de Marília- SP e a variável Nível ELISA (NE). Um total de 41 gatos foram negativos ao nível 0 (zero) para *L. (V.) braziliensis*. O nível com maior número de gatos positivos foi o nível 1 com 5 animais positivos, e o menor número de gatos positivos foram os níveis 2 e 9, com apenas um animal positivo em cada um.

Tabela 12- Número e percentual de ocorrências da variável NE ao exame de ELISA Indireto para *L. (V.) braziliensis*, realizado em 50 amostras de sangue de gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília-SP. Botucatu-SP, 2013.

NE	N ^o	%
0	41	82,0
1	5	10,0
2	1	2,0
4	2	4,0
9	1	2,0

*D*iscussão

8 . DISCUSSÃO

Os resultados do teste de Elisa Indireto para *L. infantum*, neste estudo, demonstraram uma reatividade de 42% (21/50), muito superior aos resultados encontrados por Cardoso et al. (2010), em Portugal, relatando-se uma soroprevalência pelo teste de ELISA em felinos de 2,8% (9/316) e superior também aos resultados descritos por Coelho et al. (2011) no município de Andradina –SP, tendo-se encontrado 4,2 % (3/70) animais positivos ao teste de ELISA, e negativos pelo IFAT sem Co-infecção com *Toxoplasma gondii*.

As altas titulações ao teste de ELISA encontradas nesta pesquisa foram similares aos resultados descritos por Vides et al. (2011), no município de Araçatuba- SP, obtendo-se uma porcentagem de 51,9% (14/27) felinos reagentes. É importante salientar também que, neste trabalho, dentre os 50 animais capturados, nenhum apresentava lesões características de leishmaniose, como descamação em pavilhão auricular, focinho ou lesões interdigitais, o que reforça a necessidade contínua da vigilância epidemiológica destes animais que circulavam livremente pelo Bosque Municipal de Marília.

Em relação aos resultados do exame de RIFI para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, todos os felinos desta pesquisa foram negativos. Baixas prevalências foram descritas por Cardia et al. (2013), onde de um total de 386 felinos avaliados, apenas dois foram reagentes à RIFI para *Leishmania* spp. De acordo com Ajdar et al.(1996) as infecções humanas por *L. (V.) braziliensis* apresentam um padrão de resposta imune predominantemente celular, determinando assim fraca resposta humoral e baixa quantidade de anticorpos séricos detectáveis pelos métodos tradicionais.

Existem poucos relatos que descrevem a sorologia em felinos para *L. (V.) braziliensis*. Passos et al. (1996) relataram um caso de leishmaniose tegumentar (LT) por *L.(V.) braziliensis* em gato diagnosticado em Belo Horizonte, que apresentava lesões na região interdigital. Ainda no Rio de Janeiro, a partir de um caso canino de LT na localidade de Santa Rita de Cássia, município de Barra Mansa, foi realizado um inquérito sorológico de cães e gatos. Entre os felinos, 2,4% apresentaram sororreatividade ao ELISA, e 4,8% apresentaram resultados indeterminados. (FIGUEIREDO et al., 2009).

Os relatos citados anteriormente apresentaram baixos resultados ao ELISA, para as espécies causadoras de LT em felinos. Contudo, neste trabalho, os resultados ao teste de ELISA para *L. (V.) braziliensis* apresentaram

maior reatividade, tendo-se um total de 18% (9/50) de animais reagentes para *Leishmania braziliensis*. Deve ser ressaltado que o teste de Elisa é mais sensível que a RIFI.

Segundo o Ministério da Saúde (2011), a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI possui sensibilidade variável de 80% a 95% (Brazil, 2011). Resultados sorológicos positivos a este teste, porém com títulos baixos, como pudemos observar em dois gatos nesta pesquisa, os quais apresentaram título 40, que é o ponto de corte pela técnica de RIFI, é prudente que se faça também outros testes diagnósticos, como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) e *L. (V.) braziliensis* para confirmação diagnóstica, tendo em vista a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* (LUCIANO et al., 2009). Tendo em vista que todas as amostras ao teste de PCR para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* terem sido negativas, poderiam ser realizados testes para *Trypanosoma cruzi*, como a RIFI e a PCR.

Pela literatura, podemos verificar na pesquisa realizada por Rossi (2007), de 200 gatos encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba – SP – Brasil, avaliados pela técnica de RIFI para *L. infantum*, apenas um animal (0,5%) foi positivo, apresentando título 640. A prevalência sorológica deste estudo, foi semelhante a pesquisa de Vides et al. (2011) em Araçatuba – SP – Brasil, em que, a partir de 55 gatos procedentes de dois grandes abrigos do município, seis animais (22,2%) foram positivos à RIFI para *L. infantum*. Soroprevalências variadas foram descritas por Ayllon et al., (2008) na Espanha, relatando-se entre 1,7 e 60% em felinos.

Em relação ao teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os 50 gatos desta pesquisa foram negativos para *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis*. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que um grande número de gatos entraram em contato com *L. infantum*, e foram capazes de produzir anticorpos, os quais foram detectáveis tanto ao teste de ELISA, com 21 animais (21/50) positivos, como também quanto ao teste de RIFI, com quatro animais (4/50) positivos, sendo que, destes quatro animais, dois deles apresentaram títulos altos (160 e 640) e os outros dois animais título 40. Apesar dos animais apresentarem positividade aos testes sorológicos, mas negativos ao exame molecular de PCR tanto para *L. infantum*, quanto para *Leishmania braziliensis*, os mesmos entraram em contato com o agente, foram

capazes de produzir anticorpos, porém não houve a detecção do DNA de *Leishmania*.

Outro fator a ser levado em consideração, é que os felinos avaliados podem ter sido negativos no exame de PCR, pelo fato de que eles não estavam na fase aguda da doença.

A distribuição e ecologia das espécies de flebotomíneos é fundamental para a vigilância epidemiológica das leishmanioses. A pesquisa e divulgação do encontro destes insetos colaboram para a determinação do risco de transmissão das mesmas (CUTOLO e VON ZUBEN, 2008).

Entre o período de julho a dezembro de 2012, foram utilizadas armadilhas do tipo CDC, capturando-se um total de dez exemplares de flebotomíneos no Bosque Municipal de Marília- SP, entre eles tendo-se encontrado espécies de *Lutzomyia longipalpis* e *Brumptomyia* spp. Flebotomíneos do gênero *Brumptomyia* não apresentam importância epidemiológica na transmissão das leishmanioses em humanos, tendo em vista seus hábitos serem zoofílicos restritos, realizando repasto sanguíneo em tatus (Dasipodidae: Edentata) (FORATTINI, 1973), o que é um indicativo da presença destes mamíferos na área. Entretanto, ainda que não seja importante na transmissão das leishmanioses para humanos, seu hábito alimentar em tatus é um fator a ser pesquisado, tendo em vista que tatus representam importância epidemiológica no ciclo das leishmanioses como importantes reservatórios silvestres de leishmanias e outros tripanossomatídeos.

No ponto 5 de coleta, onde se localiza a praça de alimentação de Bosque, observaram-se restos de alimentos e lixo, que proporcionam um ambiente favorável ao ciclo reprodutivo do mosquito. Outro fato que deve ser levado em consideração é a grande quantidade de matéria orgânica existente no local, também influenciando na manutenção dos flebotomíneos no bosque. Todos estes fatores contribuem para a permanência e multiplicação de flebotomíneos, tendo-se portanto encontrado duas fêmeas de *Lu. longipalpis* durante as coletas.

Já nos ponto 2, onde se localiza a entrada do Bosque Municipal, existe uma grande concentração de gatos que circundam o local frequentemente, sendo que, neste ponto, encontrou-se um macho da espécie *Lu. longipalpis*. Existem muitos relatos que descrevem a manutenção de flebotomíneos em aves silvestres e galinhas, comprovando assim a presença da espécie *Lu.*

longipalpis no ambiente dos viveiros de passáros, localizado no ponto 4. De Oliveira et al.(2008) relataram em Campo Grande- Mato Grosso do Sul que, das espécimes de fêmeas de *Lu. longipalpis* capturadas e analisadas pelo teste de ELISA , 8,9% reagiram para o sangue de aves. O teste de Elisa de captura na pesquisa, não pôde ser realizado, pois, as fêmeas capturadas não se alimentaram de sangue.

Em uma área não endêmica para as leishmanioses, no Distrito de Rubião Junior, em Botucatu- SP, Cutolo et al. (2013) relataram capturas de 216 exemplares de flebotomíneos, no período de 2001 a 2005. As espécies encontradas foram *Pintomyia monticola* e *Brumptomyia guimaraesi*, sendo esta espécie a mais abundante, com 56 (25,93%) exemplares, *Pintomyia fischeri* com 12 (12,96%) e *Psathyromyia pascalei* com 18 (8,33%) exemplares. Outros espécimes foram encontrados, resultando num total de 58 (26,85%). No Bosque de Marília, também foram capturados exemplares de *Brumptomyia* spp. em menor quantidade, sendo quatro fêmeas e um macho.

Os testes entomológicos, como o exame de cultura do conteúdo intestinal dos flebotomíneos, geralmente são realizados posteriormente ao exame parasitológico direto, caso este seja positivo. No presente estudo, o exame parasitológico dos seis exemplares fêmeas foram todos negativos, portanto, a cultura em meio LIT não foi realizada . A proporção da infectividade das fêmeas dos flebotomíneos são relativamente baixas quando comparadas a uma grande população de mosquitos. Baixas taxas de infecção natural de flebotomíneos têm sido descritas (KATO et al., 2005).

A técnica de PCR é capaz de detectar a presença de um único parasita no tubo digestório de flebotomíneos e tem sido utilizada com sucesso nos estudos de competência vetorial dos flebotomíneos, em áreas onde as taxas de infecção desses insetos são baixas. Nesta pesquisa, os resultados do PCR do conteúdo intestinal dos flebotomíneos para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* foram todos negativos. Apesar da sensibilidade e especificidade da PCR, os resultados negativos podem ser devido a substâncias interferentes presentes no conteúdo digestório desses insetos, que diminuem a sensibilidade da PCR (ARANSAY et al., 2000).

A primeira captura do inseto na zona urbana de Marília foi feita em 1999 pelo fato da cidade estar a uma distância de 160 km de Araçatuba, local com transmissão da doença confirmada na época. As capturas passaram a ser

realizadas anualmente, a partir de 2003, mas não houve resultados positivos de capturas de flebotomíneos durante todo esse tempo. Os mosquitos foram encontrados, no entanto, durante as capturas pontuais, feitas em locais suspeitos diante de algum cão infectado ou casos humanos da doença. A presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* foi confirmada pela primeira vez em meados de 2010, após anos de pesquisa, por equipes da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias), na zona leste da cidade, e no distrito de Padre Nóbrega, no início de 2011 (DOENÇA, 2011).

Devido ao caso autóctone de leishmaniose visceral humana diagnosticada em uma criança que habitava no Bairro Santa Antonieta da cidade de Marília- SP, em outubro de 2011, a SUCEN tem realizado desde junho de 2012 a colocação mensal de 26 armadilhas estrategicamente distribuídas em encostas na cidade, tendo-se já registrado a presença de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* em quatro regiões da cidade que cercam todo o perímetro urbano. Este trabalho iniciou-se a partir de junho de 2013 em parceria com o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (RIBEIRO, 2013).

Portanto, em consequência destes fatos, a pesquisa entomológica realizada no Bosque Municipal de Marília, tornou-se essencial para a criação de medidas de controle vetorial para as leishmanioses, bem como o monitoramento sorológico de animais errantes que circulavam não somente pelo Bosque Municipal de Marília, mas por toda cidade, por meio de inquéritos soropidemiológicos com o objetivo de avaliar o ciclo natural do parasito nestes hospedeiros.

Conclusões

9. CONCLUSÕES

1. *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis* foram detectados sorologicamente nos gatos do presente estudo, os quais circulavam livremente pelo Bosque Municipal de Marília;
2. A detecção de gatos positivos sorologicamente demonstra a necessidade de um monitoramento e de vigilância epidemiológica quanto a presença destes animais no Bosque Municipal de Marília;
3. Neste estudo, apesar de os flebotomíneos capturados não terem-se alimentado, a vigilância entomológica pela captura de flebotomíneos no interior do Bosque é uma medida necessária e que deve ser continuamente realizada.
4. Foram encontrados flebotomíneos da espécie de *Lutzomyia longipalpis*, o que possibilita a existência da Leishmaniose Visceral no ambiente estudado.

R referências *B*ibliográficas

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** ,v.105, n.6, p. 796-799 ,2010.

AFONSO, M.M.S.; DUARTE, R.; MIRANDA,C.J.; CARANHA, L.; RANGEL, E.F. Estudos on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva.) (Diptera: Psychodidae Plebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil) . **J. Trop. Med.**, v. 2012 , p. 5 , 2012.

AJDARY S.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; ESLAMI, M.; KEMP, K.; KHARAZMI, A.;COUTINHO, S.D.Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.173, p. 758-761, 1996.

ALEXANDER, B.; LOZANO, C.; BARKER, D.C.; McCANN, S.H.E.; ADLER, G.H. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta. Trop.**, v.69, p.41-50, 1998.

ARAKI, A.S.; VIGODER, F.M.; BAUZER, L.G.; FERREIRA, G. E.; SOUZA, N.A, et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 365 , 2009.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

ARANSAY, A.; SCOULICS, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 66, p. 1933-1938, 2000.

AYLLON, T.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ- FRANCO F.; SAINZ A. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1149, p. 361- 364, 2008.

BARNES, J.C.; STANLEY, O.; CRAIG, T. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. **J Am Vet Me Assoc**, v. 202 ., p. 416–418, 1993.

BRAY, R.S. The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. **Ecol. Dis.**, v.1, n. 4, p. 257- 267, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 .ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. p. 1-30.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral das Doenças Transmissíveis. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Gerência Técnica Leishmanioses. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. [internet]. Brasil: SVS; 2011 [acesso 30 set 2013].

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual para recomendações de diagnósticos, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*- HIV**. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BRAZIL, R.P.; PONTES, M.C.Q.; PASSOS, W.L.; FUZARI, A.A.; BRAZIL ,B.G. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema: potential area of visceral leishmaniasis transmission in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n.1, p.120-121, 2012

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.8, p.227-234, 1966.

CAMARGO, L.M.A; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 34- 37,2003 .

CARDIA, D. F.; CAMOSSO, L.G.; NETO, L.Da S.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K. D.; Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania spp.* in cats from Brazil. **Vet. Parasitol.**v.197,n-3-4,p.634-637, 2013.

CARDOSO, L., LOPES, A. P., SHERRY, K., SCHALLIG, H., GALLEGO, L. S. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. **Vet. Parasitol.**, v.174,p. 37-42, 2010.

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

COELHO, W. M. D.; AMARANTE, A.F.T.; APOLINÁRIO, J.C.; COELHO, N.M.D.; DE LIMA . V. M. F.; PERRI, S.H. V.; BRESCIANI, K.D.S. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania spp.* infections and risk factors for cats from Brazil. **Parasitol. Res.**,. v. 109, n. 4, p. 1009-1013, 2011.

COLMENARES, M.; PORTÚS, M.; BOTET, J.; DOBANÕ C, GÁLLEGO, M, WOLFF, M.; SEGUÍ, G. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: *Psychodidae*) in Spain by a competitive enzyme-linked-immunosorbent assay biotin / avidin method. **J. Med. Entomol.**, v. 32 , n. 3, p. 229-233, 1995.

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

padronização de uma PCR em tempo real para o diagnóstico e diferenciação de espécies de *leishmania*. 2012. Dissertação (Mestrado) Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2012.

COMBATE ORIENTA POPULAÇÃO SOBRE OS PERIGOS DA DOENÇA. **Correio Mariliense**, Marília, 25 set.2012. Disponível em: <http://www.correiomariliense.com.br/materia.php?materia=28275> > Acesso em: set. 2013

COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; GOMES, A.A.D.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010 .

COSTA DURÃO, J.F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; SIMÕES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). Nota preliminar. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v. 89, n. 511, p. 140-144, 1994.

CUTOLO, A.A.; VON ZUBEN, C.J. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área de cerrado no município de Corumbataí, centro-leste do estado de São Paulo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 45-49, 2008.

CUTOLO, A.A.; GALATI, E.A.B; VON ZUBEN, C.J. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from forest areas in Botucatu municipality, central western São Paulo State, **Brazil. J. Ven. Anim. Toxins Includ. Trop. Dis.**, v. 19 , p.15 , 2013.

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

DA 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 Trop.**, v. 105, n. 1, p. 92-94, 2008.

DA SILVA, S.M.; RABELO, P.F.B.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R.R.; MELO, M.N.; RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M.. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.174, n.1-2, p.150-154, 2010.

DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956.

DE BRUJIN, H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop.**, v. 52 , n.1, p.: 45-58, 1992.

DOENÇA CHEGA NA CIDADE E REGISTRA O PRIMEIRO CASO NA SANTA ANTONIETA. **Correio Mariliense**, Marília, 25 set. 2011. Disponível em: <<http://www.correiomariliense.com.br/materia.php?materia=17507>> Acesso: 30 ago. 2013.

DOMINGOS, M.F.; CARRERI-BRUNO, G.C.; CIARAVALO R.M.C.; GALATI, E.AB.; WANDERLEY, D.M.V.; CORRÊA .F.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão, no município de Pedro de Toledo, região sul do Estado de São Paulo, **Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 5, p. 425- 432, 1998.

DIAKOU, A.; PAPADEOUPULOS, E.; LAZARIDEZ, K. Specific anti-*Leishmania* spp antibodies in stray cats in Greece. **J. Feline Med. Surg.**, v. 11, n.8, p. 728-730, 2009.

DUARTE, I.R.M.; ARRUDA, C.C.P. D, ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; SOUZA, A.I.D.; DOURADO, D. M, et al. Comportamento biológico de *Leishmania (L.) amazonensis* isolados de um gato doméstico (*Felis catus*) do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Patol .Trop.**, v. 39, n. 1, p. 33-40, 2010.

ELKHOURY , A.N.S.M. **Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil**. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas. [internet] 2005 [acesso 14 Ago 2013].

FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I. C. F.; NASCIMENTO, L.D.; DA COSTA , T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMEDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, p.141-145 , 2009.

FORATTINI, O.P. **Entomol. Médica**. São Paulo: Edgard Blücher. v. 4, p. 658, 1973.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.C. Descrição de *Lutzomyia cerradicola*, sp. (Diptera, *Psychodidae*, *Phlebotominae*) do Estado de Mato Grosso do Sul, **Brasil. Rev. Bras. Entomol.**, v.39, p.103-109, 1995.

GALATI, E.A.B. Morfologia e taxonomia, p.23-51. In E.F.Rangel & R. Lainson. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Fiocruz , 2003. 386p.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; COSTA, A.L. Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32, n.1, p.217, 1999.

GREVOT, A.; JAUSSAUD HUNGUES, P.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; OZON, C.; HASS, 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.**, v.12, n. 3, p. 271-275, 2005.

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

HERVAS, J.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; SANCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J. A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. **J. Feline Med., Surg.**, v. 1, n. 2, p. 101-105, 1999.

IVERSSON, L.B.; CAMARGO, M. E.; ROCHA e SILVA, E. O.; CHIEFFE, P.P.; DE BARROS, J.A.C.; Investigação epidemiológica de um caso de Leishmaniose Visceral autóctone da grande São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 13, p. 159- 167, 1979.

KATO, H.; UEZATO, H.; KATAKURA, K.; CALVOPIN , M.; MARCO, J.D.; BARROSO, P.A.; GOMEZ, E.A.; MIMORI, T.; KORENAGA, M.; IWATA, H.; NONAKA, S.; HASHIGUSHI, Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 87-93, 2005.

KILLICK- KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *leishmania* and their phlebotomine vectors. **Bull. Soc. Pathol. Exotique.**, v. 78, n.5, p.747-5, 1985.

KILLICK- KENDRICK, R. Vetores flebotomíneos das leishmanioses: uma revisão. **Med. Vet. Entomol.**,v. 4, p.1-24, 1990.

LAINSON, R.; Shaw,J.J. Leishmaniose tegumentar americana - os neotropicais de *Leishmania* espécies. In: Collier, L.; BALOWS. A.; Sussman , M.; Eds. **Do Topley & Wilson microbiologia Infec es.** 9^a ed. London: Topley & Wilson, 1998. p. 241- 266.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* ea eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana, com especial referência para o Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** .,v.100, p. 811- 827, 2005.

LEGRIFFON, C.M.O.; REINHOLD-CASTRO, K.R.; FENELON, V.C.; NEITZKE-ABREU ,H. C.; TEODORO, U. Sandfly frequency in a clean and well-organized rural environment in the state of Paraná, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 77-82, 2012.

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

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

LONGONI, S.S.; LÓPEZ-CESPEDES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; SAURI-ARCEO, C. H.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; 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. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, p.469-476, 2012.

LOROSA, E.S.; ANDRADE, R E. Identificação de fontes alimentares de mosquitos no município de Nova Iguaçu, RJ, Brasil, pela técnica da reação de precipitina. **Entomol Vector** . , v. 5, p. 85-92, 1998.

LUCIANO, R.M.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). **Braz. J. Vet. Res. Anim . Sci.**, v.46, p.181-187, 2009.

LUVIZOTTO, M.C.R.; BIAZZONO, L.; EUGENIO, F.R.; ANDRADE, A.L. A Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20, 1999, Aguas de Lindóia. Anais...Aguas de Lindoia, 1999.p.24-25.

MACHADO, R.Z et al., Na enzyme- linked Immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 71, n. 1, p. 17- 26, 1997.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne Zoonot.**, Dis., v. 8, p. 555-559, 2008.

MAIA, C., GOMES, J., CRISTÓVÃO, J., NUNES, M., MARTINS, A., REBÊLO, E., CAMPINO, L. Feline *Leishmania infection* in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Vet. Parasitol.**, v.174, p.336-340, 2010.

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

MARCOS, R.; SANTOS M.; MALHÃO, F.; PEREIRA, R.; FERNANDES, A.C.; MONTENEGRO, L. et al. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 38, n. 2, p. 201-205, 2009.

MARODIN, N. B. Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana Distrito Federal. Dissertação (Mestrado) Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária; 2011.

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*. **Vet. Parasitol.**,v. 145, n. 3-4, p.357-60,2007.

MASCARIN,D.L.; DEMATTÊ, M.E.S.P . Flora Arbórea do Bosque Municipal "Rangel Pietraróia ", Marília, estado de São Paulo .**Bol. Geo.**, v.23, n.1, p. 95-104, 2005

MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.; TRAMONTANO, N.C .; RANGEL FILHO, F.B. Leishmaniose Visceral nacidade do Rio de Janeiro- Brasil. **Cad. Saúd. Públ.**, v.1, n. 1, p.5- 17, 1985.

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUEZ, S.S.; ROSELINO, A.M.F. Comparison of the especificity of PCR and the histopathological detection of *leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Braz. Med. Biol. Res.**, v.35, n.4, p.421-424, 2012.

MELLO, G. B. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Bras. Méd.**, v. 54, n. 12, p. 180, 1940.

MICHALSKY, E.M.; FORTES- DIAS, C.L.; PIMENTA, P.F.P.; SECUNDINO N.F.C., DIAS, E.S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual *phlebotomine* sandflies (Diptera: Psychodidae: *Phlebotominae*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L, MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** ,v.44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MONTEIRO, C.C. O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada. Dissertação (Mestrado)- Centro de Pesquisa René Rachou; Belo Horizonte, 2012.

NAUCKE, T. Leishmaniose bei katzen. **Rundschreiben**, n.4, 2000. Disponível em:<<http://members.aol.com/TJNaucke/letter04.html>> Acesso em: 17 jun. 2011.

NETO, F.X.P.; RODRIGUES, A.C.; SILVA, L.L.; PALHETA, A.C.P.; RODRIGUES, L.G.; SILVA, F.A. Manifestações Otorrinolaringológicas Relacionadas à Leishmaniose Tegumentar Americana: Revisão de Literatura. **Arq. Int. Otorrinolaringol.**, v.12, n.4, p.531-537, 2008.

NETO, O.J.S.; DUARTE, S.C.D.; COSTA, H.X.; LINHARES, G.F.C. Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.21, n.3, p. 304-307, 2012.

OLIVEIRA A.G.; MARASSA, A.M.; CONSALES, C.A.; DORVAL, M.E.; FERNANDES, C.E. ; DE OLIVEIRA, G.R.; BRASIL, R.P.; GALATI, E.A. Observações sobre os hábitos alimentares de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em Campo Grande, uma área endêmica de visceral da leishmaniose em Mato Grosso do Sul, Brasil. . **Acta Trop.**, v. 107, n. 3, p. 238-41, 2008.

OLIVEIRA- PEREIRA, Y.N.; MORAES, J.L.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.R. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúd. Públ.**, v.24, n.9, p.2183- 2186, 2008.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Vet. Parasitol.**, v. 75, n. 2-3, p. 273–277, 1998.

PAIVA, R.P.; SECUNDINO, N.F.C., PIMENTA, P.F.P, GALATI, E.A.B.; JUNIOR, H.F.A.; MALAFRANTE, R.S. Padronização de condições de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Díptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase . **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro .v. 23 , n.1, p. 87-94, 2007.

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

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

PASSOS, V.M.A.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19-20, 1996.

PENNISI, M.G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; GIUDICE, S. Case report of Leishmaniasis in four cats. **Vet. Res. Commun.**, v. 28, p. 363–366, 2004.

PINTO, P.L.S. Circulação e caracterização de Trypanosoma cruzi isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. [Tese] – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2000.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Vet. Parasitol.**, v. 26, n. 106, p. 181-191, 2002

QUINNELL, R.J.; DYE, C.; SHAW, J.J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazon Brazil. **Med. Vet. Entomol.**, v. 6, n. 3, p.195-20, 1992.

RIBEIRO, C. Adolfo Lutz e Zoonoses iniciam parceria contra Leishmaniose. **Diário de Marília**, Marília, 23 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.diariodemarilia.com.br/Noticias/123027/Adolfo-Lutz-e-Zoonoses-iniciam-parceria-contr-Leishmaniose>> Acesso em : 28 jul. 2013.

RODRIGUEZ, J.H.; ARÉVALO, J.P.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; FERANDEZ, J.L.; BOISO, A. M.; GOMEZ VILLAMANDOS, J.C. Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proceedings...** Granada: WSAVA,2002. Disponível em <<http://vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2754>> Acesso em: 17 Jun 2011.

ROSSI, C.N. Ocorrência de *Leishmania sp.* em gatos do município de Araçatuba – São Paulo – Brasil. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007. 69p.

ROUGERON, V.; CATZEFLIS, F; HIDE, M.; DE MEEUS, T.; BAÑULS, AL. First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. **Vet. Parasitol.**, v.181, n.2-4, p. 325-328, 2011.

RUFENACHT, S.; SAGER, H.; MULLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M. M.; ROOSIE, P. J. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. **Vet Record.**, v. 156, p. 542-545, 2005.

SABROZA, P.C. Flebotomíneos na cidade do Rio de Janeiro. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 14º Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia 3. João Pessoa. Anais. João Pessoa, 1978.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SAVANI, E.S M.M.; CAMARGO, M.C.G. O; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M. G.; D'ÁURIA, S. R. N.; 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 (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Short communication. **Vet. Parasitol.**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SCHUBACH, A.; FIGUEIREDO, F. B.; PEREIRA, S. A.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, I. B.; ANDRADE, M. V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M. C. A.; American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.**, , v. 9, p. 165-167, 2004.

Serrano ACM , Nunes CM, Savani ESM, Nicoletti SR, Bonello DFL, Vasconcelos RO, et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. **Rev. Clín. Vet.**, v.76, p.36-40, 2008.

SERVICE, M.W.; VOLLE, A.; BIDWELL ,D.E.Theenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haemathophagous insects. **Bull. Entomol. Res.**, v.76 ,p. 321-30, 1986.

SERGENT, E.; SERGENT, E.; LOMBAARD, J.; QUILICHINI, M.La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bull. Soc. Pathol. Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912

SOUZA, A.L .; NUNES, V.L.B .; BORRALHO, V.M.; ISHKAWA,E.A.Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil : A case report . **Venom. Anim. Toxins. Trop. Dis.**, v.15, n.2, p. 359-65.2009.

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. **Vet. Parasitol.**, v. 128, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

SILVA, F.S.; DE CARVALHO, L.P.C.; SOUZA, J.M. Flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) associados a abrigos de animais domésticos em área urbana do nordeste do estado de Maranhão, Brasil. **Ver. Patol. Trop.**,v. 41, n. 3, p. 337-47, 2012.

TELES, C.B.G.; BASANO, S.A, ZAGONEL- OLIVEIRA, M.;CAMPOS, J.J.,; DE OLIVEIRA, A.F.J.; DE FREITAS, R. A.; MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F.A.C.; BARRAL, A.; CAMARGO, L.M.A. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population , in the municipality of Monte Negro, state of Rondônia ,Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.46, n.1, p.60-6, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2012

Disponível em:

<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html> . Acesso em : 8 de maio 2013.

World Health Organization. Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution. 2005. WHO/CTD.

Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva: WHO;2012 .acesso 10 jan 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2001) Action Plan for the Reduction of Reliance on DDT in Disease Vector Control. Document WHO/SDE/WSH/01.5. Geneva: WHO, 2001. 41 p.

VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; 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 leishmaniosis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.178, n.1-2, p.22-28, 2011.

VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniosis and erlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Vet. Res. Commun.**, v.29, n.2, p.319-321, 2005.

VOLLER, A; BIDWELL, D.E; BARTLETT, A. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay, 359-371. In: Rose N.; FRIEDEMANN, H. **Manual of clinical immunology**, South Carolina: American Society for Microbiology. p. 359- 371, 1980.

*T*rabalho *C*ientífico

11. Trabalho Científico

Este trabalho será submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Necessidade de monitoramento e vigilância epidemiológica para *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília- SP”

Pirajá G.V ¹, Da Silva D.B ¹, Langoni H.¹, Alves- Martín M. F ², Rodas L.A.C ³, Lucheis S.B ⁴

ABSTRACT- Pirajá G.V , Rodas L.A.C , Martín M. F.A , Langoni H , Lucheis S.B . 2013 [NEED FOR SURVEILLANCE FOR *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) and *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies and stray cats from the Municipal Grove of Marília -SP.]Necessidade de monitoramento e vigilância epidemiológica para *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em flebotomíneos e gatos errantes no Bosque Municipal de Marília – SP. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública , Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia- FMVZ- Unesp. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P.560, Brasil. Autor para correspondência: gabipiraja@gmail.com. Leishmaniasis represents a great importance in public health due to the zoonotic nature, and currently have been presented a great dissemination in different regions of Brazil, specially in Sao Paulo State. In a not endemic area for leishmaniasis, in october 2012 there was the first autochthonous human case of Visceral Leishmaniasis (VL) in a child from Marília city, State of Sao Paulo, Brazil. Because of the few relates of feline leishmaniasis related in the literature, blood samples were collected from fifty cats habiting the Municipal Grove from Marília-SP, an area with high number of visitors and already detected sandflies. Traps CDC were installed in ten different points of the Municipal Grove from Marília-SP, since July to December/2012. Four specimens of *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) were captured (two males and two females) and four females specimens of the *Brumptomyia* genre. The parasitological analysis of gut contents of two females of *Lu. longipalpis* was negative. The Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for *Leishmania infantum* was performed, resulting in four (8%) reagent animals. All cats were non-reagent to *Leishmania braziliensis* by IFAT. Regarding to Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for *Leishmania infantum*, 42% of the animals (21/50) were reagent. For *L. braziliensis*, 18% of the animals (9/50) were reagent to ELISA test. The Polimerase Chain Reaction (PCR) for *Leishmania infantum* and for *Leishmania braziliensis* from the blood samples and gut contents from two females of *Lu. longipalpis* and from four females of *Brumptomyia* were all negative. The results reveal that, despite not having been detected parasites in sand flies, cats from the Municipal Grove of Marília-SP feature a warning signal for the need for epidemiological surveillance of leishmaniasis in the city, in view of the large number of cats serologically positive, which represents prior contact with the agent, even if they have not shown signs or symptoms of the disease.

Keywords: cat, sandflies, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, diagnosis.

¹ Departamento de Higiene Veterinaria e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia., Universidade Paulista (UNESP) . Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P.560, Brasil. Autor para correspondência: gabipiraja@gmail.com

² Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Paulista (UNESP). Distrito de Rubião Júnior, s/n, Cep: 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³ Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN)- Laboratório de Leishmanioses. R- Minas Gerais nº 135 - VI Mendonça Cep: - 16015-160, Araçatuba - SP.

⁴ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA /SAA) - Polo Regional Centro- Oeste- Sede Bauru. Av. Rodrigues Alves, 40-40. Horto Florestal. CEP: 17030-000. Bauru- SP.

RESUMO.- As leishmanioses assumem grande importância em saúde pública por sua natureza zoonótica e, atualmente, vêm apresentando crescente disseminação nas diferentes regiões do Brasil, em especial no Estado de São Paulo. Em uma área não endêmica para as Leishmanioses, em outubro de 2012 houve o primeiro caso autóctone humano de Leishmaniose Visceral (LV) no município de Marília – SP. Tendo em vista os poucos relatos de leishmaniose felina na literatura, coletaram-se amostras de sangue de 50 gatos para a pesquisa de *Leishmania* spp. no Bosque Municipal de Marília –SP. Armadilhas do tipo CDC luminosas foram instaladas em dez diferentes pontos, de julho a dezembro/2012, tendo-se capturado um total de quatro espécies de *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) sendo dois machos e duas fêmeas e quatro espécies fêmeas do gênero *Brumptomyia* sp. A análise parasitológica do conteúdo intestinal das duas fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* foi negativa. Realizou-se a prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* tendo-se quatro (8%) animais reagentes. Todos os animais foram não reagentes à prova de RIFI para *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*). Em relação ao teste de ELISA indireto para *Leishmania infantum*, 42% dos animais (21/50) foram reagentes. Para *L. braziliensis*, 18% dos animais (9/50) foram reagentes ao teste de ELISA. Os exames de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* a partir das amostras de sangue dos gatos e a partir dos conteúdos intestinais das duas fêmeas *Lu. longipalpis* e das quatro fêmeas do gênero *Brumptomyia* foram todos negativos. Os resultados obtidos revelam que, ainda que não tenham se encontrado parasitas nos flebotomíneos capturados, os gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília estão representando um sinal de alerta para a necessidade da vigilância epidemiológica para as leishmanioses no município, tendo em vista a grande quantidade de gatos sorologicamente positivos, o que demonstra o contato prévio com o agente, ainda que não estivessem clinicamente doentes.

Palavras- chave: gato, flebotomíneos, leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as doenças infecciosas parasitárias de maior incidência no mundo (MEDEIROS et al., 2012). *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) é o agente causador da Leishmaniose Visceral (LV) no Novo Mundo, com áreas endêmicas que se estendem do Sul dos EUA ao norte da Argentina. Não menos importante que a LV, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as principais espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (NETO et al., 2008).

A transmissão das leishmanioses se dá através da picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. (GUSHI, 2008). *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*) tem grande valor na epidemiologia da Leishmaniose Visceral nas Américas.

O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo ou não ser sintomático (DANTAS-TORRES et al., 2006). A infecção natural por leishmanias em um gato doméstico teve sua primeira descrição em 1912, na Argélia, em um animal de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de LV. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasito em medula óssea, sem a identificação da espécie causadora de enfermidade (SERGENT et al., 1912). O Brasil é o detentor do maior número de casos de leishmaniose felina (LF) do mundo, mas sua distribuição no país permanece incerta, sendo relatada em diversos estados brasileiros.

Tendo em vista que o município de Marília apresentou em outubro de 2012 o primeiro caso autóctone humano de leishmaniose visceral, o presente estudo objetivou a pesquisa de leishmaniose visceral e tegumentar em gatos errantes procedentes do Bosque Municipal “Rangel Pietraróia”, localizado na área urbana do município de Marília-SP, bem como a colocação de armadilhas luminosas para captura de flebotomíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da pesquisa

O Bosque Municipal “Rangel Pietraróia”, também conhecido como “Bosque Municipal de Marília”, localiza-se no município de Marília, Estado de São Paulo. Geograficamente situa-se a 22 ° 12’ 16 ” da latitude sul e 49 ° 55’ 96 ” da longitude oeste, na zona urbana da cidade e possuindo uma área total de 20 ha. **(Figura 1)**

Colheita de sangue

Um total de 50 gatos errantes foram capturados no interior do Bosque Municipal de Marília e foram previamente anestesiados com Zoletil (10 mg/kg) pela via intramuscular e mantidos em gaiolas até recuperarem-se da anestesia. As amostras de sangue dos animais foram coletadas uma única vez e, para que não houvesse repetição da amostra, estes foram marcados com esmalte na região da orelha. Nos felinos foi puncionada a veia jugular, sendo que foram coletados 5 mL de sangue e acondicionados em tubos estéreis (BD- Vacutainer) para posterior realização dos testes sorológicos.

Captura dos flebotomíneos

A partir do mês de julho de 2012 foi realizada a captura dos flebotomíneos no Bosque Municipal de Marília. Para isso, foram colocadas armadilhas do tipo CDC luminosas, instaladas em dez pontos estratégicos dentro dos 20 hectares do parque. Tais armadilhas ficavam posicionadas em uma altura de 1,5 metros, colocadas no período crepuscular (a partir das 18 horas até às 7 horas da manhã), por três noites consecutivas, durante os meses de julho a dezembro de 2012.

Dissecação e Identificação dos Flebotomíneos

Os exemplares capturados eram enviados ao Laboratório de Entomologia da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), do município de Araçatuba- SP. Os mesmos foram sacrificados com uso de acetato de etila, em seguida transferidos para uma placa de Petri, onde foram submetidos a triagem sob estereomicroscópio, separando-se os machos das fêmeas. Para tal, os adultos eram clarificados e corados para análise microscópica, e, em seguida, identificados de acordo com a chave de identificação (GALATI, 2003).

Exame parasitológico direto do conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados

Os exemplares das fêmeas foram submetidas à dissecação sob estereomicroscópio, com duas gotas de solução salina fisiológica (NaCl 0,9 %). Após com o auxílio de estilete foi realizada a retirada do tubo digestivo para o exame parasitológico direto de formas promastigotas de *Leishmania* spp. sob aumento de 400 vezes.

Teste do Hábito Alimentar (ELISA) de captura

Inicialmente separa-se a cabeça e a parte do tórax para a identificação da espécie. Em seguida, coloca-se a parte posterior dos flebotomíneos em microtubos de 1,5 mL com tampa, adicionando-se 50 µL de PBS (pH 7.2) e tritura-se com o auxílio de pistilo acoplado ao homogenizador automático. Centrifuga-se a 4.400 rpm por 7,5 minutos. O sobrenadante transfere-se para outro microtubo, sendo essencial manter as amostras na temperatura - 20° C. O antissoro é adicionado, e após 1 hora, é retirado. Realiza-se lavagens com PBS pH 7,2 Tween- 20 (PBS- T) 0,005 % , e bloqueio com leite desnatado Molico 5 %. Deixar por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida. Realiza-se novamente as lavagens. Adiciona-se 50 µL /poço das amostras a serem testadas , que serão acrescidos do controle positivo, negativo e branco, incubando-se a 37 ° C por 1 hora em câmara úmida. Após lavagem por três vezes com PBS-T20 adiciona-se 50 µL /poço de conjugado peroxidase diluído em leite a 2,5 %, e esta placa deverá ser incubada a temperatura ambiente por 1 hora em câmara úmida. Por último, efetua-se a lavagem novamente com PBS-T20 seguido de uma lavagem com água destilada. Posteriormente, adiciona-se 50 µL/ poço de ABTS, e após permanece em câmara escura e a referência será medida, pelo aparecimento da coloração do controle positivo. Em seguida, realiza-se a leitura no leitor de microplacas á 405nm. Esta técnica segue o protocolo da Superintendência de Controle de Endemias- SUCEN, de São Paulo.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Os antígenos utilizados constituíam-se em formas promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, obtidos pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC/FIOCRUZ . As lâminas foram sensibilizadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso. A técnica de RIFI foi realizada segundo Camargo (1966).

Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para *Leishmania infantum (Leishmania chagasi)*

Para o ELISA, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY) foram sensibilizadas com o antígeno solúvel bruto de *Leishmaniose infantum*. Os soros foram diluídos a 1:400 em duplicata , e o conjugado (Cat IgG- heavy and light chain Antibody, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluído a 1:40.000 . A técnica foi realizada de acordo com Lima et al. (2005).

Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Para o ELISA, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY) foram sensibilizadas com o antígeno total parcialmente solúvel de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Os soros foram diluídos a 1:40 em duplicata e o conjugado (Cat IgG- heavy and light chain Antibody, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluído a 1:40.000. A técnica foi realizada de acordo com Figueiredo et al. (2009).

Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum (syn. L.chagasi)*

Utilizou-se 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl), 1,5U de *Taq*-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 10 pmoL de cada oligonucleotídeo, 1,5mM de MgCl₂, 10 mM de DNTPs, 2 µL da amostra testada e 17,5 µL de água ultra pura (MIX-PCR), em cada tubo de reação de 0,2 mL. As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System

9600), constituíram-se de desnaturação inicial em um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto e uma extensão final de 72°C durante 2 minutos. Para amplificação dos produtos da região específica do gene de *Leishmania infantum* foram utilizados os iniciadores descritos por Neto et al. (2012).

LCS1 5'-GCAATGCCAGCTACATATATG-3'
LCS3 5'- CAGCTTTTGGGTGGGTAACA- 3'

Nesta reação, os produtos resultantes apresentam 259 pares de base (pb) de comprimento, que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica do gene 18S rDNA para *Leishmania infantum*.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi realizada com 2µL do DNA extraído, adicionado ao tampão de PCR contendo 200mM de DNTp, 5mL de tampão 10X, 2,5U de Taq DNA Polimerase e 1 pg de cada iniciador B1 e B2 e perfazendo um volume total de 50 µL. Estes iniciadores amplificam especificamente o kDNA do complexo *Leishmania (Viannia) braziliensis* resultando em um produto de 750 pb (DE BRUJIN; BARKER, 1992)

B1 5'GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3'
B2 5'CTA ATT GTG CAC GGG GAG G 3'

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) consistem em um total de 35 ciclos, sendo um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos e 60°C por 1 minuto, seguido por 33 ciclos a 95°C por 30 segundos, e 60°C por 1 minuto; e um ciclo final de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos (Alexander et al., 1998).

Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados, foi realizada com o tamanho dos fragmentos amplificados verificado a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo, esperando-se um padrão visual de 750 pb, que correspondem aos tamanhos esperados para *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Resultados

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania infantum*

Neste estudo, apenas quatro animais dos 50 estudados (8%) foram reagentes à RIFI para *Leishmania infantum*, sendo que dois destes apresentaram títulos 160 e 640 e os outros dois título 40 como pode ser observado na **Tabela 1**. Todos os gatos foram não reagentes para *Leishmania (Viannia) braziliensis* à RIFI.

Teste Imunoenzimático (ELISA Indireto) para *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

O teste de ELISA Indireto para *Leishmania infantum* apresentou 42 % (21/50) de animais reagentes (**Figura 2**). Para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, 18 % (9/50) dos animais apresentaram reatividade.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

a partir do sangue dos felinos

Os resultados da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue dos felinos foram negativos para *Leishmania infantum* e para *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Capturas dos flebotomíneos no Bosque Municipal de Marília-SP

Um total de 10 exemplares foram capturados no Bosque Municipal de Marília- SP, com armadilhas do tipo CDC luminosas. Entre eles, dois (20%) eram de fêmeas da espécie *Lu. longipalpis* e quatro (40%) eram de fêmeas do gênero *Brumptomyia* spp; em relação aos machos, dois (20%) eram da espécie *Lu. longipalpis* e apenas um exemplar (10%) era da espécie *Brumptomyia* spp.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

a partir do conteúdo intestinal dos flebotomíneos

Dos dez espécimes de flebotomíneos capturados no Bosque Municipal de Marília-SP, nenhum deles foi positivo à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum* e para *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Exame parasitológico direto e cultura do conteúdo intestinal dos flebotomíneos capturados

Os exemplares das fêmeas foram submetidas à dissecação sob estereomicroscópio, com duas gotas de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) para a pesquisa de formas flagelares de *Leishmania* spp. As seis fêmeas analisadas (quatro da espécie *Brumptomyia* spp. e duas espécies *Lu. longipalpis*), não apresentaram promastigotas no conteúdo intestinal, sendo portanto todas negativas ao exame parasitológico. Desta maneira, o procedimento de cultura do conteúdo intestinal dos flebotomíneos não foi realizado.

Teste do Hábito Alimentar (ELISA) de captura

As fêmeas dos flebotomíneos capturados não se alimentaram de sangue e, por este motivo, não foi possível realizar este teste.

DISCUSSÃO

Neste estudo, apenas quatro animais dos 50 estudados (8%) foram reagentes à RIFI para *Leishmania infantum*, sendo que dois destes com altos títulos (160 e 640), como podemos verificar na **Tabela 1**. Podemos observar também que dois gatos apresentaram títulos 40, sendo que outras técnicas poderiam ser realizadas para confirmação diagnóstica, como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* tendo em vista a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* (LUCIANO et al., 2009). Tendo em vista que todas as amostras ao teste de PCR para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* terem sido negativas, poderiam ser realizadas provas diagnósticas para *Trypanosoma cruzi*, como a RIFI e a PCR. Quando avaliados ao exame de RIFI para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, todos os felinos desta pesquisa foram negativos. Baixas prevalências foram descritas, onde de um total de 386 felinos avaliados, apenas dois foram reagentes à RIFI para *Leishmania* spp (CARDIA et al., 2013).

Os resultados do teste de Elisa Indireto para *Leishmani infantum* na pesquisa, demonstraram uma reatividade de 42% (21/50), muito superior aos resultados encontrados por Cardoso et al. (2010), em Portugal, relatando-se uma soroprevalência pelo teste de ELISA em felinos de 2,8% (9/316) e superior também aos resultados descritos por Coelho et al. (2011) no município de Andradina -SP, tendo-se encontrado 4,2 % (3/70) animais positivos ao teste de ELISA. Contudo, neste trabalho, os

resultados ao teste de ELISA para *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentaram maior reatividade, tendo-se um total de 18% (9/50) de animais reagentes.

Quatro gatos foram reagentes tanto à técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), como também ao teste de ELISA Indireto para *Leishmania infantum* (**Tabela 2.**) As altas titulações ao teste de ELISA encontradas nesta pesquisa foram similares aos resultados descritos por Vides et al. (2011), no município de Araçatuba- SP, obtendo-se uma porcentagem de 51,9% (14/27) felinos reagentes. É importante salientar também que, neste trabalho, dentre os 50 animais capturados, nenhum apresentava lesões características de leishmaniose, como descamação em pavilhão auricular, focinho ou lesões interdigitais, o que reforça a necessidade contínua da vigilância epidemiológica destes animais que circulavam livremente pelo Bosque Municipal de Marília.

Em relação ao teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os 50 gatos desta pesquisa foram negativos para *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Apesar dos animais apresentarem positividade aos testes sorológicos, mas negativos ao exame molecular de PCR tanto para *Leishmania infantum*, quanto para *Leishmania braziliensis*, os mesmos entraram em contato com o agente, foram capazes de produzir anticorpos, porém não houve a detecção do DNA de *Leishmania* nestes animais.

Devido ao caso autóctone de leishmaniose visceral humana diagnosticada em uma criança que habitava no Bairro Santa Antonieta da cidade de Marília- SP, em outubro de 2011, a SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) tem realizado desde junho de 2012 a colocação mensal de 26 armadilhas estrategicamente distribuídas em encostas na cidade, tendo-se já registrado a presença de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* em quatro regiões da cidade que cercam todo o perímetro urbano (RIBEIRO,2013).

Entre o período de julho a dezembro de 2012, foram utilizadas armadilhas do tipo CDC, capturando-se um total de dez exemplares de flebotomíneos no Bosque Municipal de Marília- SP, entre eles tendo-se encontrado espécies de *Lutzomyia longipalpis* e *Brumptomyia* spp. Flebotomíneos do gênero *Brumptomyia* não apresentam importância epidemiológica na transmissão das leishmanioses em humanos, tendo em vista seus hábitos serem zoofílicos restritos, realizando repasto sanguíneo em tatus (Dasipodidae: Edentata) (FORATTINI, 1973), o que é um indicativo da presença destes mamíferos na área. Entretanto, ainda que não seja importante na transmissão das leishmanioses para humanos, seu hábito alimentar em tatus é um fator a ser pesquisado, tendo em vista que tatus representam importância epidemiológica no ciclo das leishmanioses como importantes reservatórios silvestres de leishmanias e outros tripanossomatídeos. No Bosque existe a praça de alimentação, onde foi observado restos de alimentos e lixo, que proporcionam um ambiente favorável ao ciclo reprodutivo do mosquito. Outro aspecto observado é, a grande quantidade de matéria orgânica existente no local, também influenciando na manutenção dos flebotomíneos no bosque. Portanto, todos estes fatores contribuem para a permanência e multiplicação de flebotomíneos, tendo-se encontrado duas fêmeas de *Lu. longipalpis* durante as coletas.

Os testes entomológicos, como o exame de cultura do conteúdo intestinal dos flebotomíneos, geralmente são realizados posteriormente ao exame parasitológico direto, caso este seja positivo. No presente estudo, o exame parasitológico dos seis exemplares fêmeas foram todos negativos, portanto, a cultura em meio LIT não foi realizada. A proporção da infectividade das fêmeas dos flebotomíneos são relativamente baixas quando comparadas a uma grande população dos mosquitos. Baixas taxas de infecção natural de flebotomíneos têm sido descritas (KATO et al., 2005).

A técnica de PCR é capaz de detectar a presença de um único parasita no tubo digestório de flebotomíneos e tem sido utilizada com sucesso nos estudos de competência vetorial dos flebotomíneos, em áreas onde as taxas de infecção desses insetos são baixas. Nesta pesquisa, os resultados do PCR do conteúdo intestinal dos flebotomíneos para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* foram todos negativos. Apesar da sensibilidade e especificidade da PCR, os resultados negativos podem ser devido a substâncias interferentes presentes no conteúdo digestório desses insetos, que diminuem a sensibilidade da PCR (ARANSAY et al., 2000).

A pesquisa entomológica realizada no Bosque Municipal de Marília, tornou-se essencial para o a criação de medidas de controle vetorial para as leishmanioses, bem como o monitoramento sorológico de animais errantes que circulavam não somente pelo Bosque, mas por toda cidade, através de inquéritos soroepidemiológicos com o objetivo de avaliar o ciclo natural do parasito nestes hospedeiros.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado De São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aransay, A.; Scoulica, E.; Tselentis, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Appl. Environment. Microbiol.**, v: 66, p. 1933-1938, 2000.

Alexander, B.; Lozano, C.; Barker, D.C.; Mccann, S.H.E.; Adler, G.H. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Trop.**, v.69, p.41-50, 1998.

Camargo, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v.8, p. 227-234, 1966.

Cardia, D. F.; Carnossi, L.G.; Neto, L.D.; Langoni, H.; Bresciani, K. D.; Prevalência de *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp. infecção em gatos do Brasil. **Vet. Parasitol.**, Available online 20 July 2013 *In Press*.

Cardoso, L.; Lopes, A.P.; Sherry, K.; Schalling, H.; Solano-Gallego, L. Baixa soroprevalência da infecção por *Leishmania infantum* em gatos do norte de Portugal com base na DAT e ELISA. **Vet Parasitol.**, v. 174, n.1-2, p. 37-42, 2010.

Coelho, W. M. D.; Amarante, A.F.T.; Apolinário, J.C.; Coelho, N.M.D.; De Lima . V. M. F.; Perri, S.H. V.; Bresciani, F. D. B. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. **Parasitol Research**, v. 109, n. 4, p. 1009-1013, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F L C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Rev. Clín. Vet.**, v.11, n.61, p.32-39, 2007.

DE Brujin, H.L.; Brker, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Trop.** v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

Figueiredo, F.B. ; Bonna, I.C.F. ; Lílian, D.N et al. Avaliação sorológica para a detecção do anticorpo anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. , p. 141-145, 2009.

Forattini, O.P. **Entomol. Médica**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 4, n., p. 658, 1973.

Galati, E.A.B.; Nunes, V.L.B.; Cristaldo, G.; Rocha, H.C. Aspectos fazer comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, v.32, n. 2, p.235-61, 2003.

Gushi LT. **Estrutura populacional de *Lutzomyia longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial**. 2008. [Dissertação] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Kato, H.; Uezato, H.; Katakura, K.; Calvopiña, J.; Marco, J.D.; Barroso, P.A.; Gomez, E.A.; Mimori, T.; Korenaga, I.; Iwata, H.; Nonaka, S.; Hashigushi, Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. and Hyg.**, v. 72, p. 87-93, 2005.

Medeiros, A.C.R.; Rodrigues, S.; Roselino, A.M.F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Braz. Med. Biol. Res.**, v.35, n. 4, p. 421-424, 2012.

Neto, F.X.P.; Rodrigues, A.C.; Silva, L.L.; Palheta, A.C.P.; Rodrigues, L.G.; Silva, F.A. Manifestações Otorrinolaringológicas Relacionadas à Leishmaniose Tegumentar Americana: Revisão de Literatura. **Arq. Int. Otorrinolaringol.**, v.12, n.4, p.531-537, 2008.

Neto, O.J.S.; Duarte, S.C., Costa, H.X.; Linhares, G.F.C. Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.21, n. 3, p.304-307, 2012.

Ribeiro, C. Adolfo Lutz e Zoonoses iniciam parceria contra Leishmaniose. **Diário de Marília**, Marília, 23 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.diariodemarilia.com.br/Noticias/123027/Adolfo-Lutz-e-Zoonoses-iniciam-parceria-contr-Leishmaniose>> Acesso em : 28 jul. 2013.

Sergent, E.; Lombaard.; Quilichini M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bull. Soc. Pathol. Exotique**, v.5, n. , p. 93-8, 1912. Lima, V.M.F.; Biazzono, L.; Silva, A.C.; Correa, A.P.F.L.; Luvizotto, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme immunoassay using protein in naturally infected dogs. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 4, n. 25, p. 215- 218, 2005.

Luciano, R.M.; Lucheis, S.B.; Troncarelli, M.Z.; Luciano, D.M.; Langoni, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.46, p.181-187, 2009.

Vides, J.P.; Schwardt, T.F.; 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. **Vet. Parasitol.**, v.178, n.1-2, p.22-28, 2011.

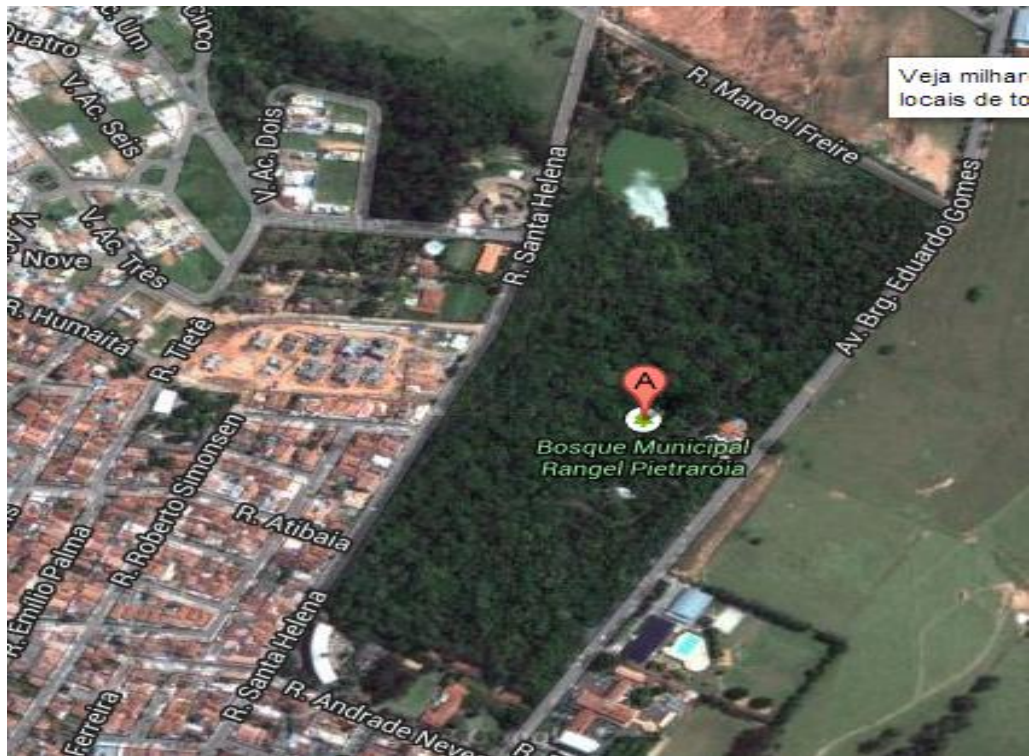


Figura 1. Localização do Bosque Municipal “Rangel Pietraróia” em Marília-SP.

Fonte: *Google maps*

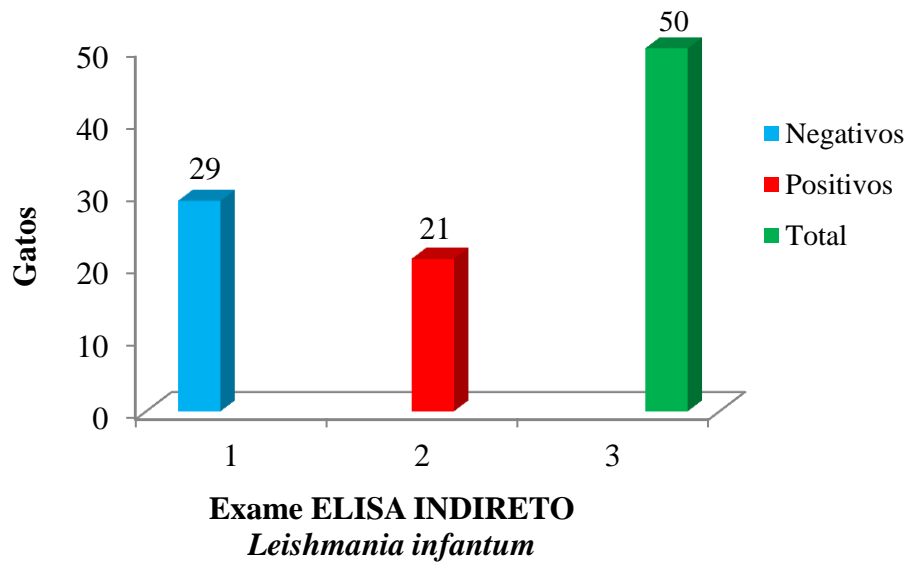


Figura 2. Resultados do teste de ELISA Indireto para *Leishmania infantum* em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal “Rangel Pietraróia” em Marília – SP.

TABELA 1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP “Rangel Pietraróia”.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	
<i>Leishmania infantum</i>	
Titulação	
GATOS	<i>L. infantum</i>
13	1:640
14	1:160
15	1:40
18	1:40
Ponto de Corte 40 (Camargo, 1966)	

TABELA 2. Comparação dos resultados positivos aos exames sorológicos de ELISA Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* e *L.(V.) braziliensis* realizados em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP.

Nº Gatos	ELISA <i>L. infantum</i>	ELISA <i>L.(V.) braziliensis</i>	RIFI / Título <i>L. infantum</i>	RIFI <i>L.(V.) braziliensis</i>
2	R	R	NR	NR
5	R	NR	NR	NR
7	R	NR	NR	NR
9	R	NR	NR	NR
11	NR	R	NR	NR
12	R	NR	NR	NR
13	R	R	R (640)	NR
14	R	R	R (160)	NR
15	R	R	R (40)	NR
17	R	NR	NR	NR
18	R	NR	R (40)	NR
22	R	NR	NR	NR
23	R	R	NR	NR
25	R	R	NR	NR
26	R	R	NR	NR
37	R	NR	NR	NR
39	R	NR	NR	NR
43	R	NR	NR	NR
44	R	NR	NR	NR
45	R	NR	NR	NR
50	R	R	NR	NR

NORMAS PARA OS AUTORES

Pesq. Vet. Bras. 33(7), julho 2013

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação. Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas: a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos

demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura.

Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. 4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

*A***nexos**

12. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo do Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos para *Leishmania infantum* (*Leishmania chagasi*)

Para o teste ELISA, em cada poço da placa de poliestireno serão adicionados 100µL do antígeno solúvel de *Leishmania 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 será removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão SST 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas serão bloqueadas com SST-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com SST-T, para a retirada da solução de bloqueio, serão adicionados 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 SST-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas serão incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com SST-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG total de gato ligado à peroxidase na diluição 1:40000 em PBS-T, será adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, serão adicionados 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação será interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) será determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm . A técnica foi realizada de acordo com Lima et al.(2005).

ANEXO 2 . PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO PARA A RIFI Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO- FMVZ - UNESP-BOTUCATU

Manutenção das promastigotas:

Utiliza-se como antígeno a forma promastigota de *L. major*, ou forma epimastigota de *T. cruzi*, que são mantidos em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio LIT (líquido) e 5 mL de meio NNN (sólido).

O repique para manutenção do antígeno é realizado semanalmente da seguinte maneira: Em da câmara asséptica, retira-se uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes (repique da semana anterior), colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico (aumento de 40X), para avaliação do desenvolvimento das promastigotas. Do tubo que apresenta parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, repica-se uma alíquota de 0,5 mL para três novos tubos contendo meio NNN e LIT, procedendo-se assim uma nova passagem. Estes tubos são mantidos em estufa a 28-30°C, que é temperatura ideal para o desenvolvimento das leishmanias.

Obtenção das promastigotas para a preparação de lâminas: Para a obtenção de uma quantidade viável de promastigotas, é necessário repicar 0,5 ml de uma cultura em meio de LIT e NNN para um tubo de rosca contendo somente 10 ml de LIT. Deve-se proceder dois repiques em LIT, com intervalo de 7 dias para a obtenção de uma maior concentração do agente. Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, centrifugar 10 ml do meio de LIT a 3000 rpm durante 10 minutos. A seguir, desprezar o sobrenadante e acrescentar de 2 a 3 ml de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST), e centrifugar novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Repetir este processo mais 2 vezes. A seguir, quantificar os parasitas em microscópio óptico e, caso a quantidade de promastigotas seja inferior a 20-30 parasitas por campo, recentrifugar e ressuspender a suspensão até se obter a concentração desejada. Caso a quantidade de parasitas seja superior, diluir a suspensão com a SST.

PREPARAÇÃO (SENSIBILIZAÇÃO) DAS LÂMINAS: As lâminas são compostas de duas fileiras de seis orifícios (perfurações). Fixar o antígeno,

colocando 10 μ L da suspensão de promastigotas, que logo em seguida é retirada, por aspiração, restando somente uma fina película em cada orifício. Deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente, e guardá-las em laminário à -20°C, até o momento do uso.

.

SOLUÇÃO TAMPONADA DE FOSFATOS (SST) 0,01 M pH 7,2 – 1 LITRO

NaCl = 8,183g

Na₂HPO₄ = 1,0516g

Na₂HPO₄. H₂O = 0,358g

NaH₂PO₄ = 0,3105 g

Autoclavar quinze minutos a 121°C.

ANEXO 3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Os antígenos utilizados constituíam-se em formas promastigotas de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, obtidos pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC/FIOCRUZ, mantidos em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal- Nicolle (NNN) e em tubos contendo 10 mL de meio Schneider (Sigma®) adicionado de 20% de soro fetal bovino e 5 mL de meio Novy-MacNeal- Nicolle (NNN). Tais cepas foram repicadas semanalmente nos dois tipos de meio de cultura. Para cada parasita, em capela de fluxo laminar, foi retirada uma gota de cada um dos tubos de manutenção mais recentes, repique da semana anterior, colocando-a entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40 vezes, para avaliação do crescimento das formas promastigotas. Do tubo que apresentasse parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, foi repicado 0,5 mL para três novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos foram mantidos em estufa a 25°C. Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foram adicionados de 2 a 3 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por mais três vezes. Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica, utilizando-se como antígeno quando se obtiver de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, em avaliação de 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm. As lâminas de antígeno foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20° C, até o momento do uso, por um período máximo de duas semanas. A técnica de RIFI foi realizada segundo Camargo (1966).

ANEXO 4. Teste Imunoenzimático (ELISA) a partir das amostras de soro dos gatos

Para o teste de ELISA, placas de poliestireno de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, NY) foram sensibilizadas com o antígeno solúvel bruto de *Leishmania infantum*. Os soros foram diluídos a 1:400 em duplicata, e o conjugado (Cat IgG- heavy and light chain Antibody, Bethyl Laboratory Inc., Montgomery, TX) diluído a 1:40.000. A técnica foi realizada de acordo com Lima et al. (2005). Em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *Leishmania 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 SST 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com SST-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com SST-T, para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados 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 SST-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com SST-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG 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 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada 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. A técnica foi realizada de acordo com Lima et al.(2005).

ANEXO 5. Protocolo do Liver Infusion Tryptose (LIT)

Preparo para 500 mL

Na_2HPO_4 s/ H_2O = 4g

NaCl = 2g

Dextrose = 1g

Triptose = 2,5g

Infusão de fígado = 1,5 g

KCl = 0,2 g

Hemoglobina bovina (2,2%) = 11 mL

Soro fetal bovino (11%) = 55 mL

Gentamicina (20 mg) = 1 mL

Modo de preparo:

Diluir os sais em proveta com 200 mL de H_2O Mili-Q e transferir para um kitassato. Lavar a proveta com 89 mL de H_2O Mili-Q e adicionar à mesma.

Montar o filtro no kitassato e autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Diluir a infusão de fígado em 200 mL de H_2O Mili-Q aquecida, acrescentar a dextrose e a triptose e filtrá-los. A hemoglobina bovina deve ser filtrada por último.

Ligar a luz UV durante 30 minutos em capela de fluxo laminar. Após este período, adicionar o soro fetal bovino (previamente filtrado) e a gentamicina no meio de cultura. Homogeneizar bem, cuidadosamente.

Distribuir o meio LIT para tubos grandes rosqueados estéreis, com capacidade de 30 mL.

Manter os tubos em estufa a 37°C durante 48 horas para controle de esterilidade e, após este período, mantê-los em estufa a $28-30^\circ\text{C}$.

SOLUÇÃO TAMPONADA DE FOSFATOS (SST) 0,01 M pH 7,2

Sal = 1 Litro

NaCl = 8,183g

Na_2HPO_4 = 1,0516g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 0,358g

NaH_2PO_4 = 0,3105 g

Autoclavar quinze minutos a 121°C .

ANEXO 6. PREPARO DE MEIO SCHNEIDER – para manutenção de
Leishmania braziliensis

Meio Schneider em pó – SIGMA (Schneider's Insect Medium – S-9895-SIGMA)

- Pesar 24,49g do Schneider em pó em 800 mL de água deionizada autoclavada, em um bequer de 1 litro. Adicionar o Schneider aos poucos e sob agitação em agitador magnético, até que seja dissolvido. Não aquecer a água.

- Adicionar 0,4g de NaHCO₃ e esperar até dissolver. O pH estará em torno de 5,0 (+- 0,2). Ajustar o pH para 9,2 (+- 0,2) com NaOH a 5M. O volume de NaOH a ser utilizado é apenas para ajustar o pH até 9,2.

O NaOH deverá ser preparado da seguinte forma: pesar 20 g de NaOH e completar com 100mL de água deionizada autoclavada. Homogeneizar até completa dissolução.

- Após ajustado o pH, aguardar 10 minutos em agitação.

- Abaixar o pH para 6,7 (+-0,2) com HCl puro.

- Após ajustado o pH, aguardar 10 minutos sob agitação.

- Adicionar aos poucos o CaCl₂ (acrescentar o volume total de 50mL), para que não haja precipitação.

O CaCl₂ deverá ser preparado da seguinte forma: Pesar 0,6g de CaCl₂ e completar com 50mL de água deionizada estéril em um bequer, homogeneizando até completa dissolução.

- Ajustar o pH para 7,1 (+-0,1)

- Adicionar 10mL de gentamicina a 50mg/mL

- Transferir o volume final para uma proveta graduada de 1000mL e completar com água deionizada estéril para 1 litro.

- Filtrar essa solução em membrana de 0,22µm com auxílio de bomba a vácuo.

- Deixar em controle de esterilidade por 4 horas em temperatura ambiente.

- Armazenar em geladeira.

ANEXO 7. MEIO NNN + LIT

Mc Neal, Novy & Nicolle + Liver Infusion Tryptose

REAGENTES:

Agar1,4g
NaCl.....0,6g
H₂O bidestilada.....completar para 100 mL

PREPARO:

1. Adicionar o agar na água previamente aquecida e aquecer até a fusão.
2. Autoclavar a 120°C durante 20 minutos.
3. Resfriar até 48-52°C e em capela adicionar 15% de sangue desfibrinado e inativado a 56°C por 30 minutos.
4. Distribuir 5 mL por tubo e manter inclinado até a polimerização (mais ou menos 20 a 30 minutos)
5. Adicionar o LIT até a metade da altura do agar-sangue.

ÁGAR UTILIZADOS:

Bacto Agar (DIFCO) ou AGAR AGAR (SIGMA-A-7002) ou Blood Agar Base (MERCK-10886)

ANEXO 8. Extração de DNA de amostras de sangue utilizando o kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®)

1-Pipetar 900 μL de tampão RBC (lysis) em microtubo de 1,5mL, livre de RNAses e DNAses. Adicionar 300 μL da amostra

2-Homogeneizar por inversão dos tubos. Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.

3-Centrifugar à 12.000 rpm por 20 segundos ou 1000 rpm por dois segundos. Remover o sobrenadante. Deixar cerca de 50 μL e adicionar 20 μL de proteinase K

4-Homogeneizar os tubos em vórtex rapidamente. Adicionar 500 μL de tampão extração (lysis buffer – “extraction solution”) para suspender as células brancas e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.

5-Permanecer em temperatura ambiente por 10 minutos. Colocar coluna no tubo coletor.

6-Pré-aquecer à 70°C o “ellution buffer”. Transferir o incubado para coluna.

7- Centrifugar à 8.000 rpm por dois minutos ou 1200 rpm por um minuto. Descartar o sobrenadante e voltar o tubo coletor a coluna GFX.

8- Adicionar 500 μL de “wash solution” à coluna GFX. Centrifugar à 12500 rpm por três minutos.

9- Desprezar tubo coletor e colocar coluna GFX em microtubo de 1,5mL livre de RNAses e DNAses.

10- Adicionar 200 μL de “elution buffer” à 70°C diretamente na matriz coluna GFX.

11- Permanecer um minuto à temperatura ambiente.

12- Centrifugar à 12000 rpm por um minuto. Estocar à -20°C.

ANEXO 9. EXTRAÇÃO DO DNA DOS FLEBOTOMÍNEOS COM O KIT DE TECIDOS (QUICK STAR PROTOCOL - QIAGEN)

1-Macerar os flebotomíneos em cadinho de porcelana ($\geq 25\text{mg}$). Colocar o macerado em microtubos de 1.5 ml. Adicionar 180 μL de Buffer ATL, e 20 μL de proteínase K. Passar no Vórtex e incubar a 56 ° C, até a completa diluição. Antes de iniciar o (Passo 2) passar no vórtex por 15 segundos.

2-Adicionar 200 μL de buffer AL, passar no vórtex e incubar a 56 ° C por 10 minutos.

3- Adicionar 200 μL de etanol (96-100 %) e passar no vórtex.

4- Transferir a mistura no Dneasy mini spin 2 ml, centrifugar a $\geq 6000\text{xg}$ (8000rpm) por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e tubo de coleção.

5- Utilizar um novo tubo de coleção de 2 ml. Adicionar 500 μL de Buffer AW1. Centrifugar por 1 minuto a $\geq 6000\text{x g}$. Descartar o sobrenadante e tubo de coleção.

6- Utilizar um novo tubo de coleção de 2 ml. Adicionar 200 μL de Buffer AW2, e centrifugar por 3 minutos a 20.000 x g (14.000 rpm). Descartar o sobrenadante e tubo de coleção.

7- Transferir a mistura junto com a coluna em um novo microtubo de 1.5 ou 2 ml.

8- Adicionar 200 μL de Buffer AE na coluna. Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente (15- 25 ° C). Centrifugar por 1 minuto a $\geq 6000\text{ x g}$.

*A*ppêndices

13. APÊNDICES

Apêndice 1.



Figura 16. Procedimento de Coleta de sangue dos felinos para a pesquisa de *Leishmania* spp. (A) Gato anestesiado, (B) Coleta de sangue para exames laboratoriais para a pesquisa da *Leishmania* spp. Botucatu, SP, 2013.

Apêndice 2. Resultado Total das Capturas de flebotomíneos no período de 6 meses nos 10 pontos distribuídos no Bosque Municipal de Marília-SP.(TABELA 13).

CAPTURAS DOS FLEBOTOMÍNEOS							
Data	Local	Machos	Fêmeas	Espécie	Data de recebimento	Parasitológico	Observações
17.07.12	Ponto 09	0	0		13.08.12		Não é flebotomíneo
17.07.12	Ponto 05	0	1	<i>L.longipalpis</i>	13.08.12	Negativo	Sem sangue
06.08.12	Ponto 03	0	0		20.08.12		Não é flebotomíneo
08.08.12	Ponto 10	0	0		20.08.12		Não é flebotomíneo
17.09.12	Ponto 01	0	0		25.09.12		25 exemplares não flebotomíneos
17.09.12	Ponto 02	2	0	<i>L.longipalpis</i>	25.09.12		
17.09.12	Ponto 02	0	0		25.09.12		18 exemplares - não flebotomíneos
17.09.12	Ponto 03	0	0		25.09.12		15 exemplares - não flebotomíneos
17.09.12	Ponto 04	1	0	<i>L.longipalpis</i>	25.09.12		
17.09.12	Ponto 04	0	0		25.09.12		06 exemplares - não flebotomíneos
17.09.12	Ponto 05	0	0		25.09.12		46 exemplares - não flebotomíneos
17.09.12	Ponto 07	0	0		25.09.12		14 exemplares - não flebotomíneos
17.09.12	Ponto 08	0	0		25.09.12		07 exemplares - não flebotomíneos
30.01.12	Ponto 01	0	0		05.11.12		01 exemplares - não flebotomíneo
31.01.12	Ponto 02	0	0		05.11.12		12 exemplares - não flebotomíneo
31.01.12	Ponto 04	0	0		05.11.12		04 exemplares - não flebotomíneo
05.01.12	Ponto 09	0	0		10.11.12		Não é flebotomíneos
06.01.12	Ponto 06	0	0		10.11.12		Não é flebotomíneos
07.01.12	Ponto 07	0	0		10.11.12		Não é flebotomíneos
03.02.12	Ponto 01	0	1	<i>L.longipalpis</i>	11.12.12	Negativo	Fêmeas mortas/ sem sangue
03.02.12	Ponto 01	0	1	<i>Brumptomyia sp.</i>	11.12.12	Negativo	Fêmeas mortas/ sem sangue
03.02.12	Ponto 01	0	1	<i>Brumptomyia sp.</i>	11.12.12	Negativo	Fêmeas mortas/ sem sangue
04.02.12	Ponto 05	1	0	<i>Brumptomyia sp.</i>	11.12.12		
05.02.12	Ponto 05	0	1	<i>Brumptomyia sp.</i>	11.12.12	Negativo	Fêmeas mortas/ sem sangue
05.02.12	Ponto 01	0	1	<i>Brumptomyia sp.</i>	11.12.12	Negativo	Fêmeas mortas/ sem sangue

Apêndice 3. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* em 50 gatos procedentes do Bosque Municipal de Marília – SP “Rangel Pietraróia” (TABELA 14)

GATO	Resultados -Título*
1	Não reagente
2	Não reagente
3	Não reagente
4	Não reagente
5	Não reagente
6	Não reagente
7	Não reagente
8	Não reagente
9	Não reagente
10	Não reagente
11	Não reagente
12	Não reagente
13	Reagente – 640
14	Reagente – 160
15	Reagente – 40
16	Não reagente
17	Não reagente
18	Reagente – 40
19	Não reagente
20	Não reagente
21	Não reagente
22	Não reagente
23	Não reagente
24	Não reagente
25	Não reagente
26	Não reagente
27	Não reagente
28	Não reagente
29	Não reagente
30	Não reagente
31	Não reagente

32	Não reagente
33	Não reagente
34	Não reagente
35	Não reagente
36	Não reagente
37	Não reagente
38	Não reagente
39	Não reagente
40	Não reagente
41	Não reagente
42	Não reagente
43	Não reagente
44	Não reagente
45	Não reagente
46	Não reagente
47	Não reagente
48	Não reagente
49	Não reagente
50	Não reagente

*Considera-se reagente os títulos maiores ou iguais a 40.

Apêndice 4 . Valores de níveis do Exame de Elisa Indireto nos gatos do Bosque de Marília- SP para *L. infantum* (TABELA 15)

N. do gato	Media DO -			Resultado
	Blk	A/P	NE	
1	0,0175	-0,1440	0	N
2	0,503	4,3170	9	P
3	0,0165	-0,1531	0	N
4	0,0290	-0,0383	0	N
5	0,0495	0,1501	5	P
6	0,0345	0,0123	0	N
7	0,0435	0,0949	4	P
8	0,0180	-0,1393	0	N
9	0,0475	0,1317	5	P
10	0,0395	0,0582	0	N
11	0,0990	0,6050	9	P
12	0,0605	0,2511	7	P
13	0,0790	0,4211	9	P
14	0,0440	0,0995	4	P
15	0,0770	0,4028	9	P
16	0,0315	-0,0153	0	N
17	0,0920	0,5406	9	P
18	0,0330	-0,0015	0	N
20	0,0400	0,0628	2	N
21	0,0200	-0,1210	0	N
22	0,0940	0,5590	9	P
23	0,0630	0,2740	7	P
24	0,0125	-0,1899	0	N
25	0,0490	0,1455	5	P
26	0,0725	0,3614	8	P
27	0,0175	-0,1440	0	N
28	0,0215	-0,0826	0	N
29	0,0135	-0,1807	0	N
30	0,0040	-0,2680	0	N
31	0,0400	0,0628	2	N
32	0,0080	-0,2312	0	N
33	0,0200	-0,1210	0	N
34	0,0200	-0,1210	0	N
35	0,0160	-0,1577	0	N
36	0,0335	0,0031	0	N
37	0,0565	0,2144	7	P
38	0,019	-0,1302	0	N
39	0,0425	0,0858	3	P
40	0,027	-0,0567	0	N
41	0,0185	-0,1348	0	N
42	0,0225	-0,0980	0	N

43	0,0475	0,1317	5	P
44	0,044	0,0995	4	P
45	0,0615	0,2603	7	P
46	0,035	0,0168	0	N
47	0,0275	-0,0521	0	N
48	0,014	-0,1761	0	N
49	0,031	-0,0199	0	N
50	0,049	0,1455	5	P

Apêndice 5. Níveis de Elisa em relação ao valor de Absorbância (D.O) para *L. infantum* (TABELA 16)

Níveis de Elisa (NE)	Valor de Absorbância (D.O)
0	0-0,34
1	0,035-0,046
2	0,047-0,063
3	0,064-0,085
4	0,086-0,114
5	0,115-0,154
6	0,155-0,208
7	0,209-0,282
8	0,283-0,380
9	$\geq 0,513$

D.O= Densidade óptica

Apêndice 6. Valores dos níveis do Exame de Elisa Indireto dos gatos do Bosque de Marília- SP para *L. (V.) braziliensis* (TABELA 17)

N. do gato	Media DO - Blk	A/P	NE	Resultado
1	0,1560	0,0997	0	N
2	2,0215	2,5635	9	P
3	0,0465	-0,0449	0	N
4	0,1250	0,0588	0	N
5	0,1725	0,1215	0	N
6	0,1555	0,0991	0	N
7	0,1585	0,1030	0	N
8	0,0760	-0,0590	0	N
9	0,0780	-0,0033	0	N
10	0,1100	0,0390	0	N
11	0,4265	0,4570	4	P
12	0,0356	-0,0594	0	N
13	0,2110	0,1724	1	P
14	0,2560	0,2318	2	P
15	0,4740	0,5197	4	P
16	0,2060	0,1657	0	N
17	0,1745	0,1241	0	N
18	0,1035	0,0304	0	N
19	0,1760	0,1260	0	N
20	0,0870	0,0086	0	N
21	0,0330	-0,0627	0	N
22	0,1795	0,1308	0	N
23	0,2105	0,1720	1	P
24	0,0795	-0,0013	0	N
25	0,2110	0,1723	1	P
26	0,2085	0,1691	1	P
27	0,0415	-0,0515	0	N
28	0,0580	-0,0283	0	N
29	0,0515	-0,0383	0	N
30	0,0700	-0,0139	0	N
31	0,1720	0,1208	0	N
32	0,0455	-0,0462	0	N
33	0,0870	0,0086	0	N
34	0,1765	0,1268	0	N
35	0,0805	0,0000	0	N
36	0,1145	0,0449	0	N
37	0,0615	-0,0251	0	N
38	0,058	-0,0297	0	N
39	0,1075	0,0357	0	N
40	0,0655	-0,0198	0	N
41	0,049	-0,0416	0	N

42	0,067	-0,0178	0	N
43	0,066	-0,0192	0	N
44	0,1725	0,1215	0	N
45	0,133	0,0693	0	N
46	0,1945	0,1506	0	N
47	0,1645	0,1100	0	N
48	0,107	0,0340	0	N
49	0,042	0,0500	0	N
50	0,244	0,2160	1	P

A/P = Amostras teste em relação ao controle positivo / **N.E**= Níveis

Apêndice 7. Níveis do Elisa em relação ao valor da Absorbância (D.O) para *L. (V.) braziliensis* (TABELA 18)

Níveis de Elisa (NE)	Valor de Absorbância (D.O)
0	0- 0,166
1	0,167- 0,224
2	0,225- 0,302
3	0,303 - 0,408
4	0,409 - 0,551
5	0,552 - 0,744
6	0,745 - 1,004
7	1,005 - 1,355
8	1,344 - 1,830
9	$\geq 2,471$

D.O= Densidade óptica

Apêndice 8. Comparação dos Exames sorológicos Elisa Indireto e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* (TABELA 19)

Nº	ELISA	RIFI
Gatos	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
2	R	NR
5	R	NR
7	R	NR
9	R	NR
11	R	NR
12	R	NR
13	R	R
14	R	R
15	R	R
17	R	NR
20	NR	R
22	R	NR
23	R	NR
25	R	NR
26	R	NR
31	NR	NR
37	R	NR

39	R	NR
43	R	NR
44	R	NR
45	R	NR
50	R	NR

NR= não reagente / R= reagente

Apêndice 10. Comparação dos Exames Sorológicos Elisa Indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. (V.) braziliensis* (TABELA 20)

Nº	ELISA	RIFI
Gatos	<i>L.(V.) braziliensis</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>
2	R	NR
11	R	NR
12	NR	NR
13	R	NR
14	R	NR
15	R	NR
23	R	NR
25	R	NR
26	R	NR
31	NR	NR
37	NR	NR
44	NR	NR
45	NR	NR
50	R	NR

NR= não reagente / R= reagente