



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

JAQUELINE BIZI

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

Araçatuba

2023

JAQUELINE BIZI

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

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

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

Araçatuba

2023

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JAQUELINE BIZI

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

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

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

Araçatuba, 20 de janeiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JAQUELINE BIZI

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

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

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

Araçatuba, 20 de janeiro de 2023.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Leishmaniose visceral

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

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

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

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

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

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

1.2.2 Leishmaniose visceral felina

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3 Diagnóstico leishmaniose visceral felina

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

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

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

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

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

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

1.2.4 Proteínas salivares e estudos de exposição

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 CAPÍTULO 1 - EXPOSIÇÃO AO *LUTZOMYIA SPP.* E INFECÇÃO POR *LEISHMANIA SPP.* EM FELINOS DOMÉSTICOS DE ÁREA ENDÊMICA

Jaqueline Bizi^a, Natielle Rodrigues Wajima^a Isadora Oliveira^a Laís Tiemi Tubone^a
Letícia Rodrigues Santana^a Matheus Fujimura Soares^a Sidnei Ferro Costa^a, Marilene
Oliveira dos Santos^a, Gabriela Lovizutto Venturin^a Thaise Yumie Tomokane^b Márcia
Dalastra Laurenti^b Valéria Marçal Felix de Lima^{a*}

^aDepartment of Clinical Medicine, Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba.

^bDepartment of Patology, University of São Paulo (USP), University of Sao Paulo Medical School (FM-USP), São Paulo

*Corresponding Author:

Department of Clinical, Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba.

793 Clóvis Pestana St. - Jardim Dona Amélia - CEP 16050-680 - São Paulo, Brazil

Phone: +55-18-36361422

Email: Valéria Marçal Felix de Lima: valeria.lima@unesp.br

2.1 Resumo

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

2.2 Resumo do autor

Sabemos sobre a suscetibilidade dos felinos à infecção por *Leishmania spp.* A literatura sobre o tema destaca evidências de que a espécie pode ser sentinela da doença em localidades endêmicas, de forma similar ao que ocorre com cães. Sinais clínicos comuns incluem: linfadenomegalia, esplenomegalia, perda de peso, anorexia, bem como lesões cutâneas e oculares. A testagem é recomendada em animais com sinais clínicos, ou nos assintomáticos de áreas endêmicas doadores de sangue, animais utilizados na reprodução ou que serão submetidos à tratamento imunossupressor. No entanto, muitas lacunas precisam ser abordadas, já que a doença subclínica é provavelmente tão significativa em gatos quanto o é em cães. Identificamos a ocorrência de LVF em gatos por métodos sorológico e molecular, mesmo em assintomáticos. Presumimos também, pela presença de positividade contra os antígenos salivares, que os gatos podem ser relevantes para a epidemiologia da leishmaniose. Esse é o primeiro trabalho que avalia a exposição da espécie ao principal vetor da doença no Brasil e sua correlação com a ocorrência de leishmaniose. Identificamos que a espécie tem sido exposta ao vetor relacionado na transmissão da leishmaniose no sudeste do Brasil. Todavia, mesmo com a exposição, não notamos uma tendência de que os animais mais expostos ao vetor também apresentem maior probabilidade de ocorrência de infecção. Mesmo assim, saber que os animais apresentam atratividade ao vetor enfatiza a importância do emprego de práticas profiláticas, tal qual as medidas já utilizadas para cães, especialmente em animais portadores de retrovírus.

2.3 Introdução¹

A leishmaniose visceral (LV) é uma importante zoonose de distribuição mundial, potencialmente fatal e faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas [1]. O protozoário intracelular *Leishmania infantum* (sinônimo *Leishmania chagasi*) é o principal agente etiológico da doença nas Américas [2].

A transmissão do parasita ocorre por meio de um vetor flebotomíneo que, em países do velho mundo, é representado pelo gênero *Phlebotomus* e em países do

1 PLOS Neglected Tropical Diseases – ANEXO E

novo mundo, como o Brasil, pelo gênero *Lutzomyia* [3]. Os cães constituem principal reservatório do ciclo urbano da doença, pois observa-se associação entre altos índices de cães positivos e o aumento do risco da infecção em humanos [4].

Entretanto, casos em felinos domésticos, inicialmente considerados hospedeiros acidentais tem sido cada vez mais frequentes [5,6,7,8,9,10]. Apesar disso, sabe-se que o gato é frequentemente assintomático e a soroconversão que realizam é reduzida, corroborando para um subdiagnóstico da enfermidade [11,12].

Coinfecções são descritas na literatura [10], todavia a associação mais evidenciada entre LVF (leishmaniose visceral felina) é com o retrovírus da FIV (imunodeficiência viral felina) [10,11,13]. Considerando-se que os gatos também são um potencial reservatório para o parasita, se faz necessária maior investigação acerca do seu papel na manutenção do ciclo biológico da *Leishmania* [14]. Durante o repasto sanguíneo, os componentes imunogênicos presentes na saliva são capazes de desencadear uma resposta imune humoral no hospedeiro, que desenvolverá anticorpos anti-saliva [15]. A quantificação de IgG específica anti-saliva de flebotômíneos, tem se mostrado um bom marcador para verificar a exposição de uma população ao vetor [16].

A exposição pode refletir, em teoria, um maior risco de infecção, dado maior probabilidade de contato com o vetor infectado por *Leishmania spp.* Dessa forma, seu uso é capaz de auxiliar no monitoramento de áreas de risco e no planejamento de estratégias de controle de vetores [17].

O sonicado de glândula salivar (SGS) tem sido utilizado como principal antígeno para avaliação sorológica da exposição de uma população aos flebotomos. O antígeno bruto representa de forma fidedigna os componentes salivares da espécie avaliada [18]. Todavia, sua produção para uso em larga é trabalhosa e demorada, além de exigir a manutenção de uma população de flebotômíneos, um profissional habilitado para a dissecação das glândulas salivares destes e também o tempo demandado para a obtenção desse material [19]. Proteínas recombinantes podem contornar a limitação na obtenção do macerado de glândula salivar [17].

O maxadilan (MAX) presente na glândula salivar do *Lutzomyia longipalpis*, é um peptídeo com potente ação vasodilatadora e propriedades diretamente relacionadas à imunomodulação. O antígeno MAX recombinante é obtido com o processo de clonagem e purificação através da *Escherichia coli*, e apresenta as mesmas propriedades da substância originalmente presente na proteína salivar [20].

Anticorpos anti-MAX já foram descritos anteriormente em estudos relacionados a leishmaniose humana como marcadores de exposição [21].

Na atualidade, particularidades de limitação de espaço e comportamento mais independente fizeram do felino doméstico uma espécie bastante popular. Conscientes dessa proximidade com o ser humano, e sabendo que os relatos de infecção por LVF são cada vez mais comuns, principalmente em regiões endêmicas, buscamos entender a exposição ao *L. longipalpis*, através da pesquisa de anticorpos anti-saliva do vetor, bem como sua relação com a positividade para LV. Além disso, considerando-se que estudos que utilizam o antígeno bruto salivar são limitados, pela dificuldade na obtenção desse extrato, avaliamos também o MAX como possível substituto para o SGS na avaliação sorológica de exposição.

Até o momento, esse é o primeiro estudo que avalia a exposição ao vetor *L. longipalpis* na espécie felina em uma região endêmica para LV, e sua relação com a positividade para *Leishmania spp.* Adicionalmente, este também é o primeiro trabalho a avaliar a resposta de sorológica ao antígeno recombinante MAX em gatos.

2.4 Métodos

2.4.1 Triagem dos gatos e coleta de amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal (COBEA), com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (processo número 00323-2020).

O estudo foi conduzido no município de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil, uma área endêmica para leishmaniose visceral (LV). O total de 283 amostras sanguíneas e de medula óssea de gatos com idade superior a 6 meses, de ambos os sexos, foram colhidas de abril a novembro de 2020, a partir do cadastro de que seriam esterilizados cirurgicamente. Para a determinação do n amostral foi estimada uma frequência de exposição dentro de uma população de 50%, ou seja, um animal possui a mesma probabilidade de ser ou não exposto ao vetor. O último levantamento em relação a população de gatos no município de Araçatuba foi de 3.127 animais [22].

O intervalo de confiança aplicado foi de 95%. Os mesmos parâmetros foram usados para definir o grupo controle, entretanto, a frequência de exposição utilizada foi de 1%. O cálculo do tamanho amostral foi executado pelo programa estatístico online Calculadora OpenEpi versão 3: calculadora de código aberto -SSP disponível em: www.openepi.com/samplesize/SSpropor.htm.

As colheitas foram realizadas mediante consentimento esclarecido por parte dos responsáveis. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico, utilizando cloridrato de tiletamina e zolazepam 5mg/kg (Telazol ®), acepromazina 0,01mg/kg e morfina 0,3 mg/kg, por via intramuscular, além de bloqueio regional (peridural sacrococcígea ou intratesticular) com lidocaína 2mg/kg. O sangue periférico (2-3mL) foi obtido por punção venosa da jugular e armazenado em tubo com ativador de coágulo para a obtenção do soro. O aspirado de medula óssea (1-2mL) foi obtido a partir da punção da porção crânio-lateral da tuberosidade maior do úmero ou crista ilíaca, e armazenada em tubo com EDTA; o material foi conservado a -20°C até o processamento. Em sequência as colheitas, os gatos foram castrados e liberados aos responsáveis.

Como grupo controle, foram utilizados 21 felinos provenientes da cidade de São Vicente, litoral do estado de São Paulo, que não é endêmica para leishmaniose visceral. As colheitas ocorreram em animais que participaram do programa de esterilização cirúrgica realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de São Vicente (CCZSV), mediante a autorização prévia do tutor, seguindo-se a mesma padronização.

2.4.2 ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

A pesquisa para anticorpos anti-*Leishmania* foi feita por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizada após a padronização, onde foram testadas diluições para o anticorpo e para a soro, sendo escolhida a que apresentou melhor desempenho. O protocolo foi realizado seguindo as seguintes modificações [23]; Placas (Greiner Bio-One Microlon® 600, Alemanha) foram revestidas com 50 µL/poço de 20 µg/mL de extrato do antígeno bruto, obtido a partir da cultura de promastigotas de *L. infantum* MHOM/BR 00/MERO2 [22] em tampão carbonato/bicarbonato (0,05 M, pH 9,6). Após incubação em 4 °C durante a noite, as placas foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,0) e 0,05% Tween® 20 (tampão de

lavagem) e bloqueadas com 100 µL/poço de PBS contendo 10% de soro fetal bovino por uma hora à temperatura ambiente e lavadas três vezes novamente. As amostras de soro (50 µL) foram diluídas na titulação de 1:100 em PBS contendo 10% de soro fetal bovino e 0,05% de Tween 20® e adicionadas a cada poço, em duplicata, depois incubadas durante três horas à temperatura ambiente, o controle positivo utilizado foi proveniente de um animal sintomático, positivo no exame parasitológico de punção de linfonodo (método ouro) e proveniente de Andradina-SP; o controle negativo foi um animal de área não endêmica (São Vicente-SP). Após três lavagens, 50µL/poço de conjugado anti-IgG felino (Anti-cat IgG Peroxidase Conjugate SAB3700059 Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1:500 foram adicionados e incubados durante uma hora à temperatura ambiente. Após três lavagens, 50 µL poço de solução de substrato foram acrescidos, contendo 0,4 mg/mL de O-fenilenodiamina (Sigma) e 1,6 l/mL de H₂O₂ em tampão fosfato-citrato (pH 5,0).

A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de HCl 16%. A densidade óptica (D.O.) foi mensurada usando um leitor Spectra Count™ (Packard Bio Science Company, USA) em um comprimento de onda de 490 nm. O ponto de corte foi estabelecido por meio da análise de especificidade e sensibilidade avaliada pela curva ROC (receiver operating characteristic) dos indivíduos de área não endêmica e endêmica que obtiveram os títulos mais altos dentro do grupo avaliado. Foram considerados positivos animais com D.O. acima de 0,372.

2.4.3 ELISA para pesquisa de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia spp.*

Para determinação da presença de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia spp.* por ELISA utilizou-se metodologia previamente descrita [24]. Como antígeno, foram utilizadas glândulas salivares de *Lutzomyia spp.* da geração F1 obtidas a partir de flebotomíneos capturados no município de Cametá-PA, Brasil, submetidas à lise, conforme descrito anteriormente [25]. Microplacas foram cobertas com 100 µL de lisado de glândula salivar a 600ng/mL em tampão carbonato bicarbonato (0,01M pH 9), e incubadas por toda a noite a 4°C. Após lavagem, as placas foram bloqueadas com 150 µL de PBS e 10% de leite Molico® e incubadas a 37°C, durante uma hora. Foram adicionados 100 µL de soro diluído a 1:100 em PBS-T, e as placas foram incubadas por 60 minutos, a 37°C. Em seguida, adicionaram-se em cada poço 100 µL de conjugado anti-IgG felino (Anti-cat IgG Peroxidase Conjugate SAB3700059

Sigma, St. Louis, USA), diluído na concentração de 1:500 e as placas incubadas durante 45 minutos, a 37°C. Depois do período de incubação, foram adicionados a cada poço 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB Substrate Reagent Set no 555214 - BD®) durante 30 minutos.

A reação foi interrompida utilizando-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico 2N. Entre cada uma das etapas foram realizadas três lavagens com tampão fosfato salina 0,05M acrescido de Tween (PBS-T 0,05%). A densidade óptica foi avaliada em duplicata, em espectrofotômetro a 450nm. A determinação do ponto de corte também foi realizada utilizando-se a média das densidades ópticas de indivíduos sorologicamente negativos e de área não endêmica para LV, acrescida de dois desvios padrões. Em todas as placas foi incluída, como controle positivo das reações, uma amostra de um felino sororreagente, proveniente de área endêmica para LV. Animais com D.O. acima de 0,494 foram considerados positivos.

2.4.4 ELISA para pesquisa de anticorpos anti-maxadilan.

O peptídeo recombinante produzido em *Escherichia coli*, MAX, foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ethan A. Lerner, da Harvard Medical School, Boston, MA, USA. O protocolo foi realizado de forma equivalente à reação anterior [23], com algumas adaptações. Resumidamente, a placa de microtitulação foi sensibilizada com 50µL de 2µg/mL do MAX. Após incubação em 4 °C durante a noite, as placas foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,0) e 0,05% Tween® 20 (tampão de lavagem) e bloqueadas com 100 µL/poço de PBS contendo 10% de soro fetal bovino por uma hora à temperatura ambiente e lavadas três vezes novamente. Em seguida, 50µL da amostra de soro diluída em PBS-T (1:50) foi adicionado ao poço. Após a incubação por duas horas a 37°C a placa foi lavada por três vezes em tampão lavagem. Foram adicionados 50µL do conjugado anti-IgG felina (1:500) (Anti-cat IgG Peroxidase Conjugate SAB3700059 Sigma, St. Louis, USA) e incubados durante uma hora à temperatura ambiente. Os demais passos foram executados com a mesma metodologia descrita no item 2.5.2. O ponto de corte foi determinado utilizando-se a média das densidades ópticas de indivíduos negativos na sorologia e de área não endêmica para LV, acrescida de dois desvios padrões. Foram considerados positivos animais com D.O. maior que 0,237.

2.4.5 Extração do DNA e qPCR de *Leishmania spp.*

O DNA da medula óssea foi extraído usando o protocolo fenol-clorofórmio [26] e analisado pelo espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop™, Thermo Fisher, MA, USA) para avaliação de pureza (260/280) e quantificação; posteriormente foi armazenado a -20°C, até a análise.

O gene β -actina foi utilizada como controle de referência para a avaliação da qualidade do DNA. Para a quantificação da carga parasitária de *L. infantum*, o qPCR foi realizado empregando iniciadores direcionados ao DNA circular do cinetoplasto do parasita (kDNA) (frente: 5'-GTGGGGGGAGGGGCGTTCT-3' e reverso: 5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'). A reação de qPCR foi padronizada com 10 ng de DNA genômico purificado, 4 μ L de 5x HOT FIREPol® Evagreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), 0,5 μ L de cada primer e 13 μ L de H₂O ultrapura - em um volume final de reação de 20 μ L. Também geramos uma curva padrão linear com 6 faixas logares de pontos de concentração, usando DNA extraído de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR 00/MER02).

As reações ocorreram em sistema Mastercycler® RealPlex2 (Eppendorf, CT, USA), nas seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 12 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15s), anelamento (65°C por 20 segundos) e extensão (72°C por 20 segundos). Após essas etapas, foi determinada uma curva de dissociação do fragmento amplificado (95°C por 15 s, depois 60°C a 95°C em 15 s/°C). A carga de DNA parasitária foi determinada e foram consideradas positivas se apresentassem um ciclo de limiar e temperatura de fusão correspondentes à curva padrão. A eficiência das reações variou de 0,81 a 0,87 e o r^2 entre 0,85 a 0,99.

2.4.6 Imunocromatografia para vírus da leucemia felina (FeLV) e para o vírus de imunodeficiência felina (FIV)

Os animais triados como positivos para *Leishmania spp.* no ELISA ou no qPCR foram também avaliados quanto à coinfeção para retrovírus. Para isso as amostras de soro foram testadas para presença do antígeno FELV p27 e Anticorpos IgG contra FIV, por meio de testes rápidos realizados com o kit de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA)(Teste Combo de Anticorpo SNAP®

FIV/Antígeno FeLV: Laboratórios IDEXX, Westbrook, ME, EUA). O teste foi executado e interpretado seguindo-se as orientações do fabricante.

2.5 Análise estatística

Inicialmente, avaliou-se que os dados não apresentavam distribuição normal, pelo teste de Shapiro-Wilk. A correlação entre a exposição aos antígenos salivares (MAX ou SGS) e o título de anticorpos anti-*Leishmania*, foi realizada com o teste de correlação de Spearman. Esse mesmo teste foi empregado para avaliar a correlação entre os dois antígenos salivares. O coeficiente r foi classificado da seguinte forma: entre 0 e 0,3 sem correlação, entre 0,31 e 0,5 correlação fraca; entre 0,51 e 0,7 correlação moderada e entre 0,71 e 0,9 correlação forte e $> 0,9$ muito forte [27].

Para verificar a associação entre os animais positivos para *Leishmania spp.* no qPCR e/ou no ELISA e a positividade para anticorpos anti-saliva total ou anti-MAX utilizou-se teste Qui-quadrado e Razão de Prevalência (RP) para identificação da natureza da associação, sendo: $0 < RP < 1$ a prevalência do desfecho é menor em expostos do que em não expostos, $RP = 1$ o desfecho é igual entre expostos e não expostos, $RP > 1$ a ocorrência do desfecho é maior em expostos do que não expostos. O software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, CA, USA) foi utilizado para análise dos dados. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

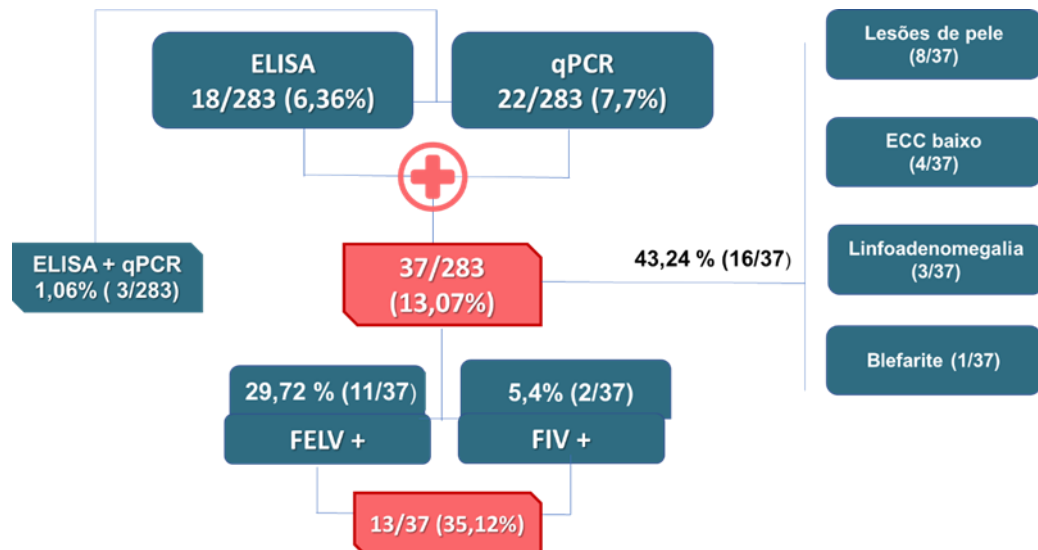
2.6 Resultados

2.6.1 Positividade para *Leishmania spp.*

Dos 283 gatos da área endêmica, 56,89% eram fêmeas (161/283) e 43,11% machos (122/283). Desses animais, 28,98% (82/283) viviam em abrigos, 14,49% (41/283) foram capturados por cuidadores de condições desconhecidas e 56,53% (160/283) eram domiciliados. De todos os animais da área endêmica 13,07% (37/283) apresentaram positividade para *Leishmania spp.* no ELISA ou no qPCR. A presença de anticorpos anti-*Leishmania* foi observada em 6,36% (18/283) dos animais, enquanto 7,7% (22/283) foram positivos no qPCR. Apenas 1,06% (3/283)

dos animais foram positivos em ambos os testes. Apesar dos animais serem considerados aptos para o procedimento foi observado em alguns dos animais positivos, escore corporal abaixo do ideal (4/37), linfadenomegalia (3/37), lesões de pele (8/37) e blefarite (1/37). Dos animais positivos, 35% (13/37) foram também positivos no snap combo (IDEXX®) para retrovíruses, sendo 29,72 % (11/37) positivos para o vírus da leucemia felina e 5,4% (2/37) para o vírus da imunodeficiência felina (fig 1).

Fig 1. Distribuição dos gatos positivos para leishmaniose visceral de acordo com o método diagnóstico (ELISA ou qPCR), positividade para retrovíruses e sinais clínicos.



Fonte: Elaborado pela autora.

2.6.2 Positividade para Anticorpos anti-SGS

A presença de anticorpos anti-SGS foi identificada em 22,62% (64/283) dos gatos da área endêmica. Desses animais, 85,94% (55/64) eram *Leishmania spp.* negativos e 14,06% (9/64) positivos para o protozoário em pelo menos um dos testes diagnósticos utilizados. Dos animais negativos para anticorpos anti-saliva (77,38%), 9,89% (28/283) eram positivos para *Leishmania spp.* Dentre os gatos avaliados, apenas 3,18% dos animais tiveram positividade ao ELISA para anticorpos anti-SGS e anti-*Leishmania* concomitantemente (Fig 2 A).

Em relação à presença de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-SGS, houve correlação positiva fraca ($r=0,4092$, $p<0,0001$) (Fig 3 A). No entanto, não houve diferença significativa para a presença de anticorpos anti-SGS em relação à positividade para *Leishmania spp* ($p=0,7898$). (Tabela 1).

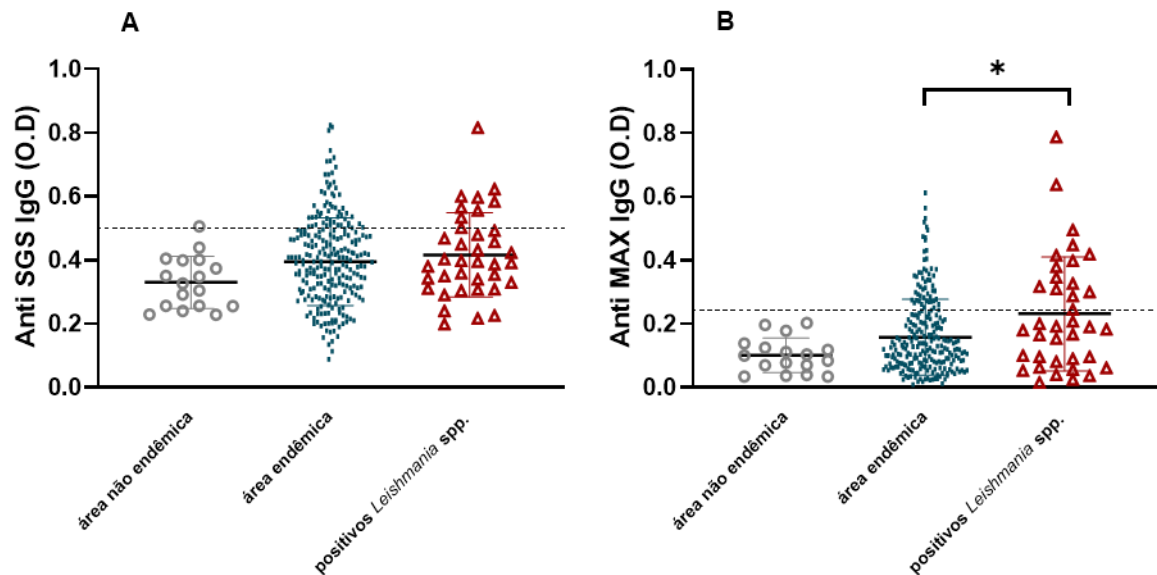
2.6.3 Positividade para Anticorpos anti-MAX

A reatividade frente ao antígeno salivar recombinante MAX foi observada em 24,03% (68/283) dos gatos sendo 22,06% (15/68) positivos para LV. Dos animais positivos para *Leishmania spp.*, 59,46% (22/37) não foram positivos para a presença de MAX, e 7,77% (15/283) de todos os animais foram positivos para *Leishmania spp.* e anticorpos anti-MAX. Não se observou positividade para MAX em gatos da área não endêmica (Fig 2.B). Não foi observada correlação entre a presença de anticorpos anti-MAX e anti-*Leishmania* ($r= 0,1703$, $p= 0,0041$) (Fig 3.B).

Observamos que a ocorrência de LVF foi mais observada em animais negativos para MAX (RP de 0,86, $p=0,0117$) (Tabela 2).

Em relação a aplicabilidade do MAX como substituto ao SGS observamos correlação fraca entre a soroconversão para os dois antígenos ($r=0,1365$ $p=0,0216$) (Fig 4.).

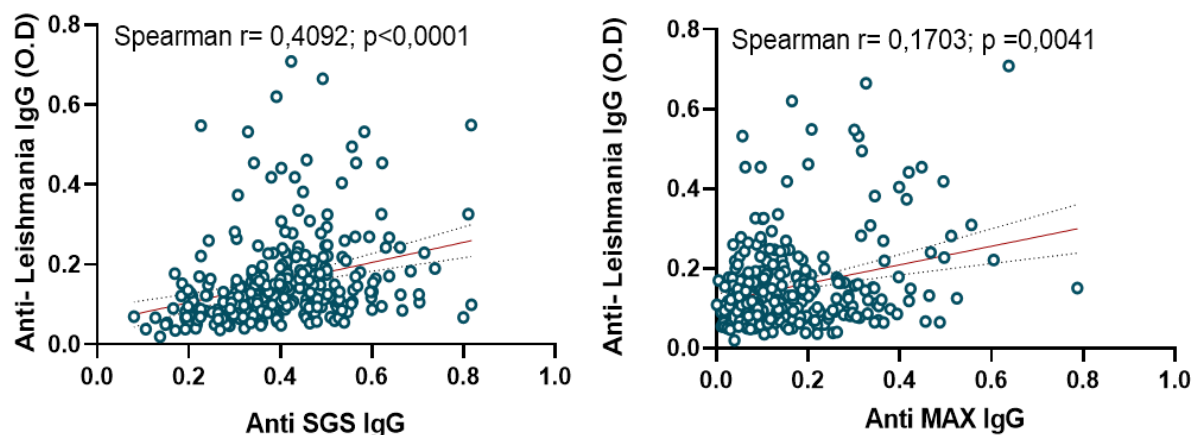
Fig 2. Avaliação da exposição de gatos de área endêmica e não endêmica aos antígenos salivares total (2A) e recombinante (2B) do *Lutzomia longipalpis*.



Legenda: Não houve diferença significativa entre animais positivos e negativos para leishmaniose em relação à positividade para SGS ($p = 0,7898$), enquanto que para MAX houve diferença significativa ($p = 0,0117$); Teste qui-quadrado estatisticamente significativo quando $p < 0.05$. Linha tracejada representa o cut-off de cada antígeno.

Fonte: Elaborado pela autora.

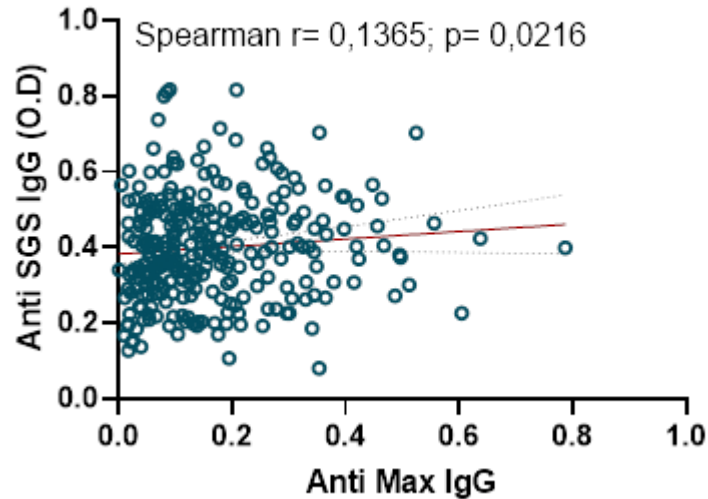
Fig 3. Correlação entre títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anticorpos anti-SGS (2A) e anti-MAX (2B) em felinos de área endêmica para LV.



Legenda: Coeficientes de correlação e os valores p da análise de Spearman estão indicados.

Fonte: Elaborado pela autora.

Fig 4. Correlação entre títulos de anticorpos anti-SGS e anticorpos anti-MAX em felinos de área endêmica para LV.



Legenda: Coeficientes de correlação e os valores p da análise de Spearman estão indicados.

Fonte: Elaborado pela autora.

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

Variáveis	Anticorpos e/ou DNA para <i>Leishmania spp.</i>		Teste Qui-Quadrado			Correlação de Spearman		
	Testados, n (%)	Positivos, n (%)	95% IC	Valor de P	RP	r	95% IC	Valor de P
Ac Anti-SGS	283			0,7898 ($\chi^2 = 0,07108$, df = 1)	0,9854	0,41	0,3042 - 0,5045	<0,0001
Positivos	55 (22,36%)	9 (16,36%)	0,8585 - 1,084					
Negativos	191 (77,64%)	28 (14,66%)	0,9223 - 1,165					

Abreviaturas: Ac, anticorpos; IC, intervalo de confiança; RP, razão de prevalência

Fonte: Elaborado pela autora.

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

Variáveis	Anticorpos e/ou DNA para <i>Leishmania spp.</i>		Teste Qui-Quadrado			Correlação de Spearman		
	Testados, n (%)	Positivos, n (%)	95% IC	Valor de P	RP	r	95% IC	Valor de P
Ac Anti-MAX	283			0,0117 ($\chi^2 = 6.358, df = 1$)	0,8683	0,17	0,0513 - 0,2845	0,0041
Positivos	53 (21,54%)	15 (28,3%)	0,7398 - 0,9731					
Negativos	193 (78,46%)	22 (11,39%)	1,028 - 1,352					

Abreviaturas: Ac, anticorpos; IC, intervalo de confiança; RP, razão de prevalência

Fonte: Elaborado pela autora.

2.7 Discussão

A soropositividade de para a presença de anticorpos anti-*Leishmania spp.* em felinos na área endêmica (6,36%), foi mais baixa que a de estudos anteriores realizados na mesma região, onde a positividade ao teste ELISA foi estimada em 11,5% (23/200), [28], 25,4% (14/55) [11], 23% (26/113) [29] e 12,91% 39/302 [30]. Alguns fatos podem justificar a redução na soroprevalência. Primeiramente, os animais utilizados foram triados de modo a selecionar gatos sem manifestações de doença sistêmica, o que pode ter limitado a inclusão de animais positivos. Um dos trabalhos citados [11] considerou como critério de inclusão, a presença de sinais clínicos, por exemplo, lesões dermatológicas, favorecendo a identificação de positivos. Outro dado relevante é que todos trabalhos supracitados retratam um cenário de mais de uma década.

Consideramos que houveram mudanças relevantes na relação da espécie felina com o ser humano. A verticalização urbana, mudança no estilo de vida da população e a demanda por animais de companhia com hábitos mais independentes e adaptados a espaços menores, aproximaram o gato do homem, com mais atenção

à saúde e a cuidados básicos [30], fator que pode ser um dos pontos chave para uma menor suscetibilidade à exposição a LVF.

Em uma população canina de 1396 cães da mesma localidade, foi identificada a prevalência de 8,1% de positividade na sorologia, nesse estudo, os autores também identificaram uma redução comparativamente à trabalhos realizados na região para cães [32]. Essa redução, compartilhada também em nosso levantamento, sinaliza que pode existir uma tendência de redução de prevalência de LV para a localidade, tanto para cães como para gatos. Tal tendência pode estar relacionada com período cíclico da enfermidade, todavia não podemos desconsiderar tal observação também possa estar vinculada com a eficiência do programa de controle da LV.

A coinfeção por retrovíroses foi observada em 35% dos gatos positivos para *Leishmania spp.* O vírus da Leucemia Felina foi diagnosticado em 29,72 % enquanto 5,4% foram positivos para o vírus da imunodeficiência felina. Na mesma região, já foi indicada a propensão de animais positivos para LVF estarem coinfectados com FIV, embora o mesmo não tenha sido observado para FELV [10]. Outros autores também mencionaram essa mesma tendência de coinfeção por FIV em animais positivos para LVF [10,11,13, 33]. Nossos resultados diferem do que foi observado anteriormente, pois FELV foi observado aproximadamente cinco vezes mais do que FIV. Dessa forma, consideramos que em regiões endêmicas, a positividade para retrovíroses, especialmente FELV, seja considerada como um critério importante para investigação quanto a possível coinfeção por LVF, uma vez que testes rápidos para FIV/FELV são mais comumente solicitados na rotina clínica.

No diagnóstico molecular, observamos uma prevalência de 7,7% em amostras de aspirado de medula óssea. Recentemente, em região endêmica da Espanha, foram observados valores similares à qPCR (5,6%), utilizando-se sangue total de gatos [34]. Em cães, a medula óssea resulta em amostra mais sensível para realização da qPCR do que o sangue total [35], o que também já foi observado para felinos [33] em população testada usando-se as duas amostras biológicas comparativamente. Há grandes flutuações nos estudos em relação a positividade à PCR ou qPCR, variando entre 0,43% e 30%, e na sorologia, considerando-se outras metodologias além do ELISA, entre 0,9% a 28,5%, por diversos países que apresentam ocorrência da doença [14].

Para a triagem dos positivos, foram utilizados testes paralelos, um molecular (qPCR) e um sorológico (ELISA). Consideramos que o emprego de mais de um teste de diagnóstico necessário pois apenas 8,11% (3/37) dos animais positivos para *Leishmania* compartilharam positividade em ambos testes, ou seja, utilizando mais de um método de diagnóstico, aumenta-se a sensibilidade diagnóstica. Além dos métodos apresentarem diferentes desempenhos, de acordo com sua especificidade e sensibilidade, sua performance é também determinada pela fase da doença [5], o qPCR identifica indivíduos que atuam como reservatório para *Leishmania* enquanto o ELISA mensura a IgG produzida pelo contato entre parasito e hospedeiro, o que não necessariamente confirma que o mesmo esteja atuando como reservatório.

Ao observarmos nossos resultados da exposição da população ao vetor *L. longipalpis*, analisada através dos resultados para o ELISA do SGS observamos uma exposição de 22,62% (64/283) dos gatos, todavia, não observamos diferença significativa em animais expostos ou não expostos quanto à positividade para *Leishmania spp.*, tanto por meio do diagnóstico sorológico como o molecular. Analisando mais precisamente os títulos obtidos no ELISA anti-*Leishmania* e anti-SGS, observamos uma correlação positiva, porém fraca, entre anticorpos anti-*Leishmania* e anti-SGS. Consideramos que a positividade para LV somada a positividade para anticorpos anti-SGS indique que o animal tenha sido recentemente exposto ao vetor infectado.

A presença de soroconversão anti-SGS no grupo positivo e não positivo para *Leishmania* sugere risco similar de infecção por LV nos felinos expostos ao vetor *L. longipalpis*. Em contradição, em uma região endêmica para LV de Portugal de 350 felinos 47,7% foram expostos a espécie *P. perniciosus*, principal vetor na região, e mostraram correlação positiva entre a IgG específica para o SGS e ao maior risco de infecção por *Leishmania* nesses animais [36], sugerindo que possivelmente que o comportamento das diferentes espécies de flebótomos diferem nas duas áreas estudadas.

Características inerentes a população dos gatos utilizada no presente estudo também podem refletir nas observações quanto a exposição. Considerando o fato que a maior parte dos animais eram domiciliados e com um responsável que optou pela esterilização cirúrgica, concluímos que eram animais com melhores condições acerca de cuidados com sua saúde. Talvez, se a população de gatos utilizada

consistisse em indivíduos errantes ou exclusivamente de abrigos, poderíamos observar um maior contato com o vetor e, até mesmo, da prevalência de LVF.

A infectividade de gatos positivos para LVF ao *L. longipalpis* foi comprovada em estudos de xenodiagnóstico [37]. Todavia, em condições não controladas existem preferências do vetor quanto ao potencial hospedeiro escolhido para o repasto sanguíneo. Um estudo conduzido em cães, na mesma região endêmica, demonstrou que a maior proporção de cães soropositivos para o antígeno salivar (88%) concentrou-se no grupo de animais LV positivos, mas assintomáticos, ou em animais do grupo controle negativos para LV (75%). Neste estudo, os animais positivos e sintomáticos apresentaram prevalência mais baixa de exposição (60%), evidenciando uma preferência do vetor por indivíduos assintomáticos [38]. Dessa forma, se há preferências de repasto dentro de uma mesma espécie, em gatos é possível que exista menor atração para o repasto das fêmeas do flebótomo comparativamente a cães.

Esse é o primeiro estudo que avalia a exposição à saliva do *L. longipalpis* em gatos, dessa forma há limitações na comparação da prevalência observada, dado a ausência de trabalhos que permitam a contrapor nossos resultados e metodologia. Foram realizadas diversas padronizações para a avaliação da exposição anti-SGS, sendo escolhida a que apresentou melhor performance. Contudo, particularidades da espécie do vetor e da resposta ao antígeno no hospedeiro felino precisam ser mais bem exploradas. Tais como a sazonalidade do *L. longipalpis*, que é uma variável de difícil padronização e que podem impactar a soroconversão do hospedeiro. Identificar também a ciclicidade da resposta imunológica humoral que provocam em gatos pode trazer grandes esclarecimentos para a temática.

Observamos em nosso trabalho uma ausência de correlação entre o SGS e o MAX, o que nos faz considerar que essa molécula não seja um bom marcador de exposição para estudos dessa natureza. Barral e colaboradores [39] observaram resultado similar em uma avaliação de indivíduos de uma área endêmica para LV, com baixa performance da proteína recombinante como alternativa ao SGS. No entanto esse é o primeiro estudo a utilizar a proteína recombinante como marcador de exposição em felinos. Em humanos, a associação de duas proteínas recombinantes (rLJM17+rLJM11) apresentaram efetividade em substituir o SGS para avaliação do contato com o *L. longipalpis* [40]. Sugerimos que em estudos de exposição, gatos sejam avaliados com outras proteínas recombinantes em

detrimento ao MAX, já que para esse propósito não consideramos essa molécula uma boa alternativa.

Todavia, ressaltamos que o MAX pode interferir em vias imunomoduladoras no hospedeiro. Esse peptídeo já foi previamente estudado por propriedades que interferem diretamente no tipo de resposta imune [16,21,41]. Observamos menor ocorrência de LVF em animais positivos para MAX, presumindo-se que o contato com essa substância possa ter algum papel relacionado a proteção contra o parasito.

Concluimos que felinos são expostos ao *L. longipalpis* sem associação dessa exposição com a infecção por LVF. Sugerimos que estudos de exposição sejam conduzidos com outras proteínas recombinantes. Animais assintomáticos para LVF, mas residentes em áreas endêmica e positivos para retrovírus, especialmente FELV, devem ser alvo de monitoramento mais cauteloso e estratégias de prevenção para LV.

2.8 Referências

1. Cotton JA. The Expanding World of Human Leishmaniasis. Trends in Parasitology. 2017 May;33(5):341–4.
2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. Bañuls A-L, editor. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016 Mar 3;10(3):e0004349.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.
4. Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. Epidemiology and Infection. 2006 Jul 7;135(2):195–201

5. Pennisi MG, Persichetti MF. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*. 2018 Feb;251:131–7.
6. Attipa C, Papasouliotis K, Solano-Gallego L, Baneth G, Nachum-Biala Y, Sarvani E, *et al.* Prevalence study and risk factor analysis of selected bacterial, protozoal and viral, including vector-borne, pathogens in cats from Cyprus. *Parasites & Vectors*. 2017 Mar 13;10(1).
7. Can H, Döşkaya M, Özdemir HGökhan, Şahar EA, Karakavuk M, Pektaş B, *et al.* Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. *Experimental Parasitology*. 2016 Aug;167:109–14
8. Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalis D, Mylonakis M, Koutinas AF, *et al.* Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Veterinary Parasitology*. 2014 May;202(3-4):217–25.
9. Bresciani KDS, Serrano ACM, Matos LVS de, Savani ESMM, D'Auria SRN, Perri SHV, *et al.* Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2010;19(02):127–9.
10. Sobrinho LSV, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, de Lima VMF, *et al.* Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2012 Jun;187(1-2):302–6.
11. Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, *et al.* *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2011 May;178(1-2):22–8.

12. Pennisi M-G, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, *et al.* LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 2015 Jun 4;8(1).
13. Priolo V, Martínez-Orellana P, Pennisi MG, Raya-Bermúdez AI, Jurado-Tarifa E, Masucci M, Donato G, Bruno F, Castelli G, Solano-Gallego L. *Leishmania infantum* Specific Humoral and Cellular Immune Responses in Cats and Dogs: A Comparative Cross-Sectional Study. *Vet Sci*. 2022 Sep 7;9(9):482. doi: 10.3390/vetsci9090482. PMID: 36136697; PMCID: PMC9505219.
14. Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2019;25.
15. Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, *et al.* Discovery of Markers of Exposure Specific to Bites of *Lutzomyia longipalpis*, the Vector of *Leishmania infantum* *chagasi* in Latin America. Milon G, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010 Mar 23;4(3):e638.
16. Velez R, Spitzova T, Domenech E, Willen L, Cairó J, Volf P, *et al.* Seasonal dynamics of canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in an endemic area of *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*. 2018 Oct 11;11(1).
17. Lestonova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. Milon G, editor. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017 Jul 13;11(7):e0005600.
18. Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014 Dec;28:691–703.

19. Prates DB, Santos LD, Miranda JC, Souza APA, Palma MS, Barral-netto M, *et al.* Changes in Amounts of Total Salivary Gland Proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) According to Age and Diet. *Journal of Medical Entomology*. 2008 May 1;45(3):409–13.
20. Gillespie, Mbow, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology*. 2000 Jul;22(7):319–31.
21. Aires J, Casanova C, Vernal S, Nascimento M, Rodrigues S, Lerner EA, *et al.* Maxadilan-simile expression in *Nyssomyia neivai*, a sandfly vector in an endemic region of Brazil, and its immunogenicity in patients with American tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017 Feb;112(2):116–22.
22. Cidadão - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo [Internet]. www.saude.sp.gov.br. Available from: <https://www.saude.sp.gov.br/>
23. Lima VMF de, Biazzono L, Silva AC, Correa APFL, Luvizotto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2005 Dec;25(4):215–8.
24. Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology*. 2005 May;130(5):493–9.
25. Batista LF da S, Matta VLR da, Tomokane TY, Pacheco AD, Silveira FT, Rossi CN, *et al.* Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2016 Jun;49(3):361–4.
26. Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

27. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012;24(3):69-71. PMID:23638278).
28. Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, *et al.* Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 2010 Jun 1;47(3):212.
29. Neto L da S, Sobrinho LSV, Martins CO, Machado RZ, Marcondes M, de Lima VMF. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. *Veterinary Parasitology.* 2011 May;177(3-4):374–7.
30. Sobrinho LSV, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, de Lima VMF, *et al.* Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* 2012 Jun;187(1-2):302–6.
31. Marques SMT, Oliveira MRF de, Gomes MJT de M. Parasitos gastrintestinais em gatos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do sul. *Pubvet.* 2017 Nov;11(11):1132–7.
32. Costa DNCC, Blangiardo M, Rodas LAC, Nunes CM, Hiramoto RM, Tolezano JE, *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. *BMC Veterinary Research.* 2018 Jul 31;14(1).
33. Marcondes M, Hirata KY, Vides JP, Sobrinho LSV, Azevedo JS, Vieira TSWJ, *et al.* Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors.* 2018 Mar 20;11(1).

34. Alcover MM, Basurco A, Fernandez A, Riera C, Fisa R, Gonzalez A, *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. *Parasites & Vectors*. 2021 Mar 25;14(1).
35. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019Sep15];165(1-2):1–18.Availablefrom:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709003124?via%3Dihub>
36. Pereira A, Cristóvão JM, Vilhena H, Martins Â, Cachola P, Henriques J, *et al.* Antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in cats naturally exposed to phlebotomine sand flies is positively associated with *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*. 2019 Mar 26;12(1).
37. Mendonça IL de, Batista JF, Lopes KSP do P, Magalhães Neto F das CR, Alcântara DS, Meriguetti YFFB, *et al.* Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Nov 12];280:109058. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32200198/>
38. Batista LF da S, Matta VLR da, Tomokane TY, Pacheco AD, Silveira FT, Rossi CN, *et al.* Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2016 Jun;49(3):361–4.
39. Barral A, Charlab R, Barral-Netto M, Valenzuela JG, Caldas A, Honda E, *et al.* Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000 Jun 1;62(6):740–5.

40. Souza AP, Andrade BB, Aquino D, Entringer P, Miranda JC, Alcantara R, *et al.* Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. Milon G, editor. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2010 Mar 23;4(3):e649.
41. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection. The Journal of Immunology. 2001 Nov 1;167(9):5226–30.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LIMA, V. M. F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C. ; CORREA, A. P. F. L ; LUVIZZOTO, M. C. R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 215-218, 2005. DOI: 10.1590/S0100-736X2005000400005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VICENTE SOBRINHO, L. S.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A. D.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER, C.; BIONDO, A. W.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 1-2, p. 302-306, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.01.010.

VIDES, J. P.; SCHWARD, T. F.; VICENTE SOBRINHO, L. S.; MARINHO, M.; LAURENTI, M. D.; BIONDO, A. W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 22-28, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.12.042.

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

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

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO GATO E RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Gato:		
Raça:	Sexo:	Idade do animal:

1. Responsável Legal:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:	Cidade: Araçatuba		

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título do projeto de pesquisa: Exposição ao Lutzomia spp. e infecção por Leishamnia spp. em felinos domésticos de área endêmica.	
Pesquisador responsável: Valéria Marçal Felix de Lima	
Cargo/função: Prof. Ass.	Unidade ou Departamento do Solicitante: DCCRA
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o gato sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).	
SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO RISCO MAIOR	
4. Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar):	
- Coleta de sangue periférico e medula óssea, bem como a realização de ensaios	

sorológicos para detecção de IgG anti-saliva e IgG anti-MAX, em resposta a possível exposição ao *Lutzomia longipalpis* (vetor da Leishmaniose Visceral) assim como pesquisa de anticorpos IgG anti-Leishmania e PCR para investigar infecção por *Leishmania infantum*;

5. Procedimentos que serão realizados com os animais:

De cada animal serão coletados 3 ml de sangue por punção da veia cefálica ou jugular divididos em três alíquotas em tubo sem anticoagulante. Será também coletado 3 ml de medula óssea armazenado em tubo com EDTA por meio da punção da região epifisária proximal do úmero ou da crista ilíaca.

Para a coleta desse material, os animais serão submetidos a uma anestesia dissociativa. Dessa forma, animais que não estejam saudáveis não devem participar do projeto, sendo obrigação do tutor certificar-se que a saúde do animal esteja em dia. Sempre que possível, é recomendado que o mesmo solicite exames laboratoriais prévios, como hemograma e avaliação bioquímica com perfil renal e hepático, antes da realização da castração.

É importante salientar que a castração realizada nas fêmeas (ovariosalpingohisterectomia - OSH) e nos machos (orquiectomia) não fazem parte da metodologia do projeto de pesquisa. Como a maioria dos felinos que participam do projeto são animais sem tutela, de ONGS ou abrigos, a castração é oferecida pensando no benefício no controle de natalidade desses animais e, conseqüentemente, na redução da população de gatos errantes no município de Araçatuba-SP. Dessa forma, o pós operatório e quaisquer complicações que o animal possa apresentar são de responsabilidade do tutor, devendo o mesmo garantir que o animal receba os cuidados necessários, incluindo a retirada de pontos.

6. Desconfortos e riscos esperados:

Coleta de sangue e medula: dor local após coleta, claudicação transitória.

Em relação a castração, podem ocorrer durante o procedimento hemorragias ou complicações decorrentes da anestesia. Vale reforçar que todo procedimento anestésico pode acarretar riscos, incluindo o óbito do animal.

Já os riscos referentes ao pós operatório do procedimento de castração em fêmeas ou machos dependem diretamente dos cuidados que cabem ao tutor, como uso de antibioticoterapia e analgesia prescritas, evitar que o animal consiga ter contato com a ferida cirúrgica ou que tenha acesso a rua. Caso não sejam realizadas as medidas recomendadas, tais complicações são inteiramente responsabilidade do tutor.

7. Benefícios que poderão ser obtidos: Clarificação quanto a exposição da espécie felina ao vetor da Leishmaniose Visceral, bem como da sua relação com o risco da infecção por <i>L. infantum</i>. Permitindo dessa forma suporte científico para auxiliar no desenvolvimento de medidas de prevenção adequadas para gatos. Castração do animal, melhorando comportamentos relacionados ao estado reprodutivo, como fugas, auxiliando na prevenção de problemas do trato reprodutivo ou gestação indesejada em fêmeas
8. Benefícios aos animais: Conhecimento, por parte do tutor da positividade para <i>L. infantum</i>; além da contribuição para possíveis medidas de prevenção para controle da doença em gatos. Controle populacional através da esterilização cirúrgica desses animais.

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO REPRESENTANTE LEGAL

1. Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(s) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(s) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).
2. A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.
3. Esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.
5. Esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada.

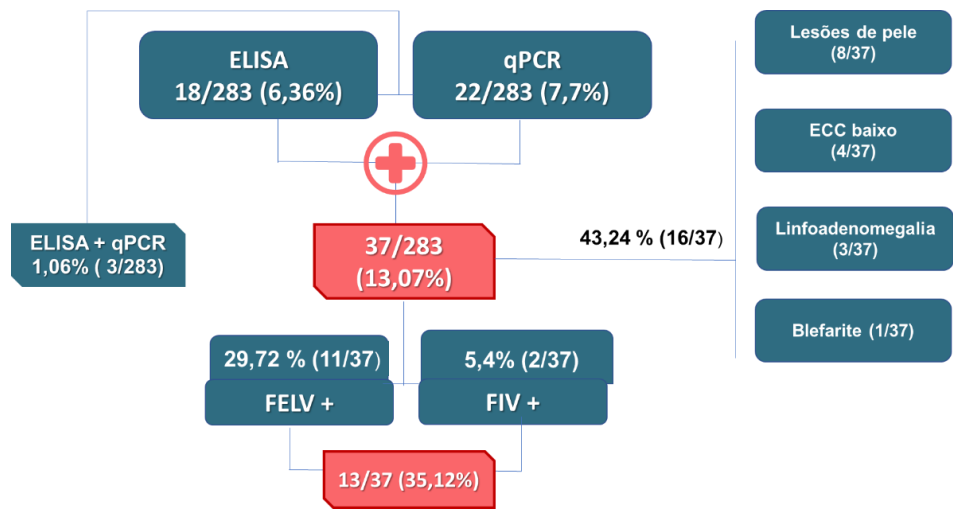
IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 5 do inciso III, consinto em permitir a participação de meu(s) cão(ões), no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Assinatura

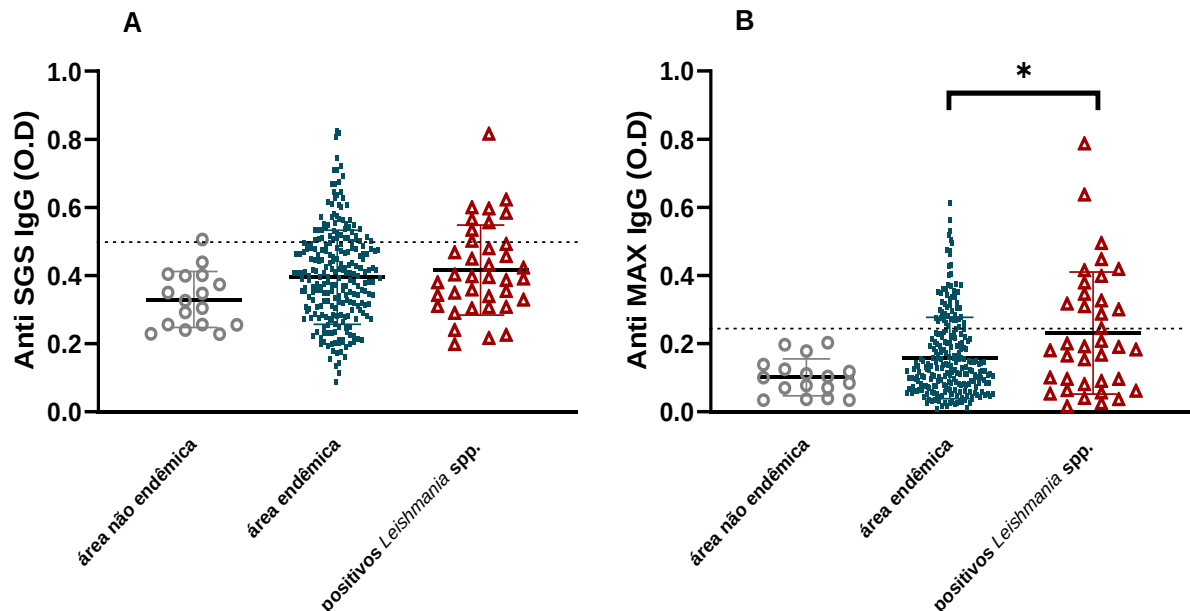
APÊNDICE C – FIGURAS SUPLEMENTARES

Fig 1. Distribuição dos gatos positivos para leishmaniose visceral de acordo com o método diagnóstico (ELISA ou qPCR), positividade para retrovíroses e sinais clínicos.



Fonte: Elaborado pela autora.

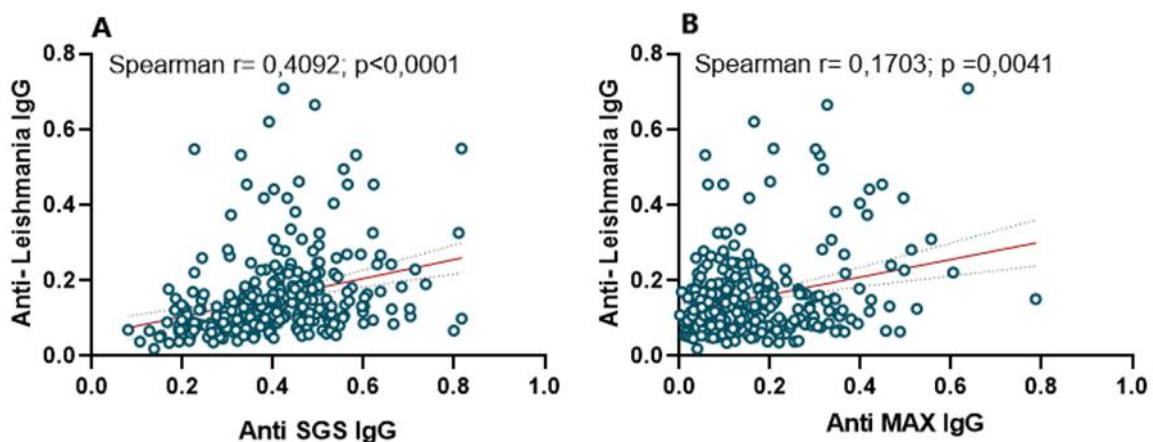
Fig 2. Avaliação da exposição de uma população de área endêmica e não endêmica aos antígenos salivares total (2A) e recombinante (2B) do *Lutzomia longipalpis*.



Não houve diferença estatística entre animais positivos e negativos para *Leishmania* em relação a positividade para SGS ($p = 0,7898$), enquanto para MAX houve diferença estatística ($p = 0,0117$); Teste qui-quadrado estatisticamente significativo quando $p < 0.05$. Linha tracejada representa o cut-off de cada antígeno.

Fonte: Elaborado pela autora.

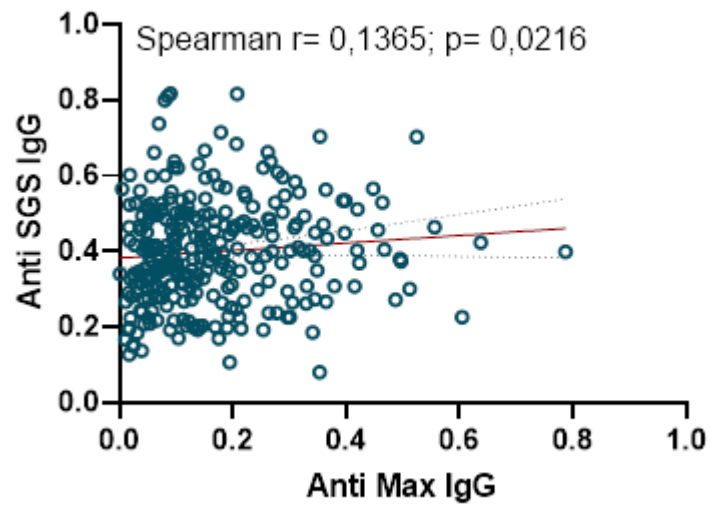
Fig 3. Correlação de entre presença de anticorpos anti-Leishmania spp. e anticorpos Anti-SGS (3A) e Anti-MAX (3B) em felinos de área endêmica para LV.



Coeficientes de correlação e os valores p da análise de Spearman estão indicados.

Fonte: Elaborado pela autora

Fig 4. Correlação de entre presença de anticorpos anti-SGS e anticorpos Anti-MAX em felinos de área endêmica para LV.



Coeficientes de correlação e os valores p da análise de Spearman estão indicados.

Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE D – TABELA RESULTADOS GERAIS POR ANIMAL

Tabela 1. Resultados por animal em avaliação sorológica e molecular para *Leishmania spp.*, avaliação sorológica para antígenos salivares e imunocromatografia para o vírus da FIV e FeLV.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	DNA ng/dL	PCR LEISH	MÉDIA ELISA Leishmania spp.	RESULTADO ELISA LV	MÉDIA ELISA Maxadilan	RESULTADO MAX	MÉDIA ELISA SGS	RESULTADO SGS	FELV	FIV
1	62		0,22		0,19		0,50	POSITIVO		
2	4,3	POSITIVO	0,15		0,09		0,31			
4	4,67	POSITIVO	0,09		0,10		0,22			
5	201,1		0,10		0,08		0,40			
6	37,1		0,09		0,15		0,67	POSITIVO		
7	15,7		0,10		0,05		0,52	POSITIVO		
8	224,8		0,45	POSITIVO	0,45	POSITIVO	0,57	POSITIVO		
9	15,8	POSITIVO	0,62	POSITIVO	0,16		0,39		POSITIVO	
10	108		0,13		0,10		0,36			
11	1377		0,10		0,06		0,30			
12	55,3		0,19		0,10		0,41			
13	96,5		0,22		0,14		0,45	POSITIVO		
14	25,2		0,15		0,10		0,35			
15	11,8		0,25		0,13		0,35			
17	7,5		0,07		0,05		0,51	POSITIVO		
18	7,6		0,15		0,11		0,31			
19	304,8		0,21		0,15		0,41			
20	132,8		0,12		0,07		0,51	POSITIVO		
21	93,3		0,32		0,10		0,50	POSITIVO		
22	1252,9		0,20		0,24		0,47	POSITIVO		
23	96,7		0,12		0,07		0,51	POSITIVO		
24	36,4		0,19		0,11		0,46	POSITIVO		
26	2760,9		0,27		0,15		0,59	POSITIVO		
27	174,4		0,18		0,21		0,68	POSITIVO		
28	698,7		0,17		0,11		0,47	POSITIVO		
29	1517,6		0,09		0,06		0,53	POSITIVO		
30	673,6		0,27		0,10		0,64	POSITIVO		
31	4397		0,09		0,07		0,41			
32	552		0,07		0,02		0,13			
33	1144,5		0,19		0,15		0,50	POSITIVO		
34	18,8		0,11		0,08		0,28			
35	1041		0,25		0,16		0,50	POSITIVO		

36	5033,4		0,17		0,08		0,36	
37	1771,2		0,20		0,04		0,40	
38	1406,2		0,18		0,17		0,57	POSITIVO
39	1366,2		0,29		0,12		0,50	POSITIVO
40	2302,8		0,25		0,12		0,50	POSITIVO
41	96,2	POSITIVO	0,55	POSITIVO	0,21		0,82	POSITIVO POSITIVO
42	16,7	POSITIVO	0,12		0,04		0,24	
43	384,5		0,12		0,07		0,36	
44	3,9	POSITIVO	0,12		0,03		0,34	
46	98,3		0,19		0,09		0,40	
47	145,5		0,08		0,15		0,20	
48	26,1		0,25		0,15		0,44	POSITIVO
49	84,9		0,12		0,04		0,21	
50	124,9		0,46	POSITIVO	0,20		0,46	POSITIVO POSITIVO
51	32,1	POSITIVO	0,18		0,06		0,50	POSITIVO POSITIVO
52	12,2		0,05		0,03		0,15	
53	44,3		0,11		0,05		0,21	
54	30,3		0,17		0,05		0,22	
55	23,9		0,16		0,08		0,35	
56	189,9	POSITIVO	0,11		0,04		0,47	POSITIVO
57	11,6		0,14		0,04		0,32	
58	17,2		0,28		0,05		0,49	POSITIVO
63	711,5		0,11		0,02		0,43	POSITIVO
65	73		0,33		0,09		0,81	POSITIVO
66	140,1		0,22		0,04		0,49	POSITIVO
68	45,5		0,23		0,05		0,41	
69	100,8		0,18		0,03		0,42	
70	192,2	POSITIVO	0,12		0,05		0,39	
71	724,3		0,18		0,04		0,35	
72	46,9		0,15		0,04		0,46	POSITIVO
73	55,2		0,24		0,06		0,66	POSITIVO
74	552,1		0,09		0,01		0,17	
75	41,4		0,05		0,01		0,27	
76	308,8		0,08		0,02		0,22	
77	933		0,49	POSITIVO	0,32	POSITIVO	0,56	POSITIVO
78	153		0,16		0,04		0,34	
79	856,2		0,19		0,11		0,50	POSITIVO
80	122,2		0,53	POSITIVO	0,31	POSITIVO	0,58	POSITIVO
81	197,6	POSITIVO	0,07		0,02		0,29	
82	487,9		0,21		0,05		0,47	POSITIVO
83	486,1		0,26		0,09		0,54	POSITIVO
84	519,6		0,09		0,02		0,33	

85	398,9	0,06	0,02	0,19		
86	623,6	0,09	0,05	0,35		
88	97,1	0,14	0,04	0,56	POSITIVO	
89	655,8	0,09	0,02	0,28		
90	524,4	0,17	0,08	0,48	POSITIVO	
91	576	0,45	POSITIVO	0,10	0,62	POSITIVO
93	846,6	0,09	0,02	0,52	POSITIVO	
94	42,7	0,11	0,03	0,53	POSITIVO	
95	886,4	0,13	0,06	0,37		
96	678	0,15	0,11	0,49	POSITIVO	
97	887,7	0,12	0,05	0,41		
98	487,9	0,14	0,05	0,45	POSITIVO	
99	151,1	0,15	0,07	0,34		
100	413,7	0,13	0,12	0,20		
101	497	0,12	0,06	0,60	POSITIVO	
102	1125,3	0,11	0,09	0,46	POSITIVO	
103	3265	0,13	0,04	0,28		
104	598,4	0,16	0,07	0,34		
105	1544,6	0,11	0,00	0,34		
106	101,9	0,17	0,01	0,56	POSITIVO	
107	394,4	0,16	0,14	0,43	POSITIVO	
108	339,2	0,11	0,27	POSITIVO	0,53	POSITIVO
109	884	0,14	0,05	0,42		
110	272,2	0,28	0,10	0,43	POSITIVO	
111	487,6	0,11	0,05	0,40		
112	360,2	0,33	0,10	0,62	POSITIVO	
113	690,4	0,22	0,11	0,54	POSITIVO	
116	152,4	0,23	0,10	0,44	POSITIVO	
117	107,8	0,18	0,26	POSITIVO	0,49	POSITIVO
118	362	0,12	0,03	0,18		
119	144,2	0,18	0,10	0,34		
120	311,5	0,15	0,06	0,24		
121	359,2	0,24	0,14	0,63	POSITIVO	
122	515,1	0,09	0,10	0,36		
123	3234,2	0,05	0,07	0,36		
124	293,6	0,08	0,24	POSITIVO	0,45	POSITIVO
127	2047,8	0,16	0,30	POSITIVO	0,40	
128	1659,5	0,19	0,19	0,44	POSITIVO	
131	112,9	0,53	POSITIVO	0,06	0,33	
132	1864,5	0,07	0,46	POSITIVO	0,46	POSITIVO
133	133	0,21	0,12	0,54	POSITIVO	
134	793	0,26	0,04	0,24		

135	46,9	POSITIVO	0,09	0,10	0,35	
136	1843,8		0,06	0,07	0,28	
137	660,2		0,09	0,26	POSITIVO	0,39
138	186,4		0,14	0,13		0,38
139	949,3		0,09	0,10		0,37
140	142		0,17	0,08		0,42
141	811,1		0,45	POSITIVO	0,06	0,34
142	519,4		0,26	0,07		0,30
143	320,5		0,09	0,13		0,49
144	288,5		0,11	0,05		0,27
145	2517,3		0,13	0,20		0,31
146	1958,6		0,15	0,05		0,30
147	911,7		0,12	0,26	POSITIVO	0,66
148	910,8		0,14	0,10		0,44
150	1781,2		0,15	0,21		0,47
151	18,9		0,13	0,05		0,30
152	48		0,12	0,19		0,47
153	1734,4		0,11	0,35	POSITIVO	0,35
154	2467,9		0,13	0,16		0,37
156	1324,8		0,16	0,28	POSITIVO	0,61
157	937,1		0,11	0,35	POSITIVO	0,70
158	2288,7		0,06	0,24		0,52
159	3128,5		0,09	0,17		0,39
160	1885,4		0,42	POSITIVO	0,50	POSITIVO
162	1166,5		0,08	0,31	POSITIVO	0,47
163	2329,7		0,16	0,27	POSITIVO	0,40
166	941,3		0,16	0,31	POSITIVO	0,46
167	1495,9		0,17	0,27	POSITIVO	0,64
168	1121,7		0,07	0,08		0,80
169	497,8		0,07	0,14		0,20
170	2574,3		0,10	0,17		0,45
171	435,6		0,05	0,08		0,26
172	1009,4		0,08	0,09		0,47
173	865,5		0,09	0,09		0,36
174	106,3		0,06	0,09		0,31
175	87,3		0,11	0,09		0,56
177	63	POSITIVO	0,09	0,08		0,60
179	12,4		0,07	0,08		0,53
180	103,2		0,12	0,13		0,32
181	149,8		0,18	0,18		0,17
182	14,8		0,08	0,15		0,33
184	52,8		0,15	0,12		

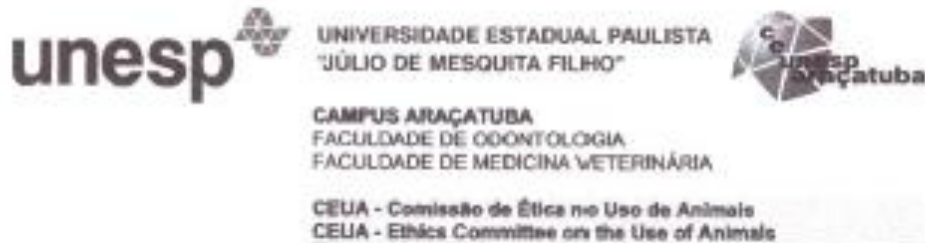
185	122,1					0,20		
186	19,2	0,08		0,07		0,38		
187	18,7	0,05		0,07		0,22		
188	20,9	0,15		0,42	POSITIVO	0,37		
189	28,6					0,44	POSITIVO	
190	68,8	0,11		0,07		0,49	POSITIVO	
191	1493,7	0,05		0,07		0,36		
192	33,6	0,34		0,13		0,44	POSITIVO	
193	1334,2	0,06		0,03		0,33		
195	421,8	0,38	POSITIVO	0,35	POSITIVO	0,45	POSITIVO	POSITIVO
196	97,1	0,12		0,08		0,29		
197	330,2	0,05		0,02		0,20		
198	1247,2					0,46	POSITIVO	
199	57,4	0,10		0,18		0,42		
200	17,4	0,23		0,23		0,38		
201	64	0,28		0,32	POSITIVO	0,41		
202	108,6	0,16		0,02		0,60	POSITIVO	
203	196,6	0,19		0,07		0,74	POSITIVO	
204	871,6	0,14		0,06		0,31		
205	35,4	0,05		0,02		0,15		
206	41,4	0,05		0,03		0,29		
207	24,2	0,10		0,09		0,82	POSITIVO	
208	198	POSITIVO	0,10	0,38	POSITIVO	0,31		POSITIVO
209	174,9	0,10		0,27	POSITIVO	0,47	POSITIVO	
210	166,6	0,40	POSITIVO	0,40	POSITIVO	0,53	POSITIVO	
211	27,1	0,06		0,13		0,27		
212	99,1	0,22		0,60	POSITIVO	0,23		
213	2023,5	0,27		0,36	POSITIVO	0,56	POSITIVO	
214	201,6	0,17		0,19		0,35		
215	333,5	0,10		0,22		0,55	POSITIVO	
216	16,4	0,06		0,10		0,28		
219	80,1	0,12		0,33	POSITIVO	0,31		
220	38,3	0,37	POSITIVO	0,42	POSITIVO	0,31		POSITIVO
221	566,4	0,07		0,14		0,19		
222	57,7	POSITIVO	0,42	POSITIVO	0,15	0,43	POSITIVO	
223	47,1	0,06		0,11		0,27		
224	18,1	0,06		0,49	POSITIVO	0,27		
225	98,3	0,09		0,23		0,46	POSITIVO	
226	49,1	0,12		0,42	POSITIVO	0,51	POSITIVO	
227	149,8	0,13		0,17		0,60	POSITIVO	
228	42,2	0,15		0,34	POSITIVO	0,18		
229	47	0,08		0,28	POSITIVO	0,24		

230	47,4		0,08		0,19		0,23	
231	27,8		0,09		0,21		0,35	
232	20,7		0,10		0,06		0,41	
233	28,1				0,23		0,42	
234	33,6	POSITIVO	0,16		0,18		0,35	
235	52,8		0,09		0,33	POSITIVO	0,26	
236	52,6		0,18		0,40	POSITIVO	0,45	POSITIVO
237	57,8		0,08		0,13		0,30	
238	16,8	POSITIVO	0,14		0,19		0,20	
239	72,8		0,10		0,30	POSITIVO	0,29	
240	59,1		0,12		0,36	POSITIVO	0,47	POSITIVO
242	140,4		0,08		0,29	POSITIVO	0,55	POSITIVO
243	24,6		0,15		0,34	POSITIVO	0,39	
244	15,6		0,04		0,12		0,21	
245	26,7		0,09		0,39	POSITIVO	0,53	POSITIVO
247	66,2		0,09		0,30	POSITIVO	0,23	
248	20,2	POSITIVO	0,07		0,18		0,39	
250	29,4		0,06		0,10		0,39	
251	58,4		0,08		0,20		0,25	
252	60,1		0,07		0,24	POSITIVO	0,30	
253	35,1		0,07		0,35	POSITIVO	0,08	
254	19,1		0,14		0,21		0,41	
255	39,9		0,13		0,52	POSITIVO	0,70	POSITIVO
256	48,6		0,06		0,22		0,48	POSITIVO
257	230,5		0,12		0,26	POSITIVO	0,24	
258	21,2		0,44	POSITIVO	0,42	POSITIVO	0,40	
259	77,2		0,10		0,15		0,35	
260	68,8		0,11		0,14		0,48	POSITIVO
262	12		0,06		0,15		0,54	POSITIVO
263	57,9	POSITIVO	0,08		0,25	POSITIVO	0,36	
264	71,2		0,10		0,14		0,38	
265	54,8		0,08		0,09		0,19	
266	29,9		0,24		0,47	POSITIVO	0,40	
267	112,3		0,13		0,46	POSITIVO	0,53	POSITIVO
268	36,2		0,20		0,19		0,36	
269	44,2	POSITIVO	0,16		0,19		0,30	
270	110,6		0,14		0,32	POSITIVO	0,40	
272	68,9		0,10		0,13		0,20	
274	65,1		0,04		0,10		0,17	
275	94,7	POSITIVO	0,13		0,29	POSITIVO	0,60	POSITIVO POSITIVO
276	63,3		0,16		0,27	POSITIVO	0,48	POSITIVO
277	1035,8		0,10		0,22		0,55	POSITIVO

278	77,8		0,02		0,04		0,14	
279	71,2		0,04		0,19		0,11	
280	52,8		0,06		0,36	POSITIVO	0,27	
281	19,3		0,04		0,25	POSITIVO	0,19	
282	90,2		0,28		0,51	POSITIVO	0,30	
283	38,6		0,09		0,14		0,29	
285	89,4		0,05		0,17		0,28	
286	63		0,07		0,11		0,32	
288	51,2		0,06		0,11		0,39	
290	76,9		0,08		0,31	POSITIVO	0,26	
291	47,3		0,06		0,11		0,22	
292	118,2		0,04		0,22		0,27	
294	227,7		0,10		0,14		0,32	
295	806,6		0,13		0,20		0,46	POSITIVO
296	55,2		0,04		0,26	POSITIVO	0,32	
297	398,9		0,07		0,34	POSITIVO	0,27	
298	195,8		0,07		0,21		0,23	
302	31,9	POSITIVO	0,15		0,79	POSITIVO	0,40	
303	92		0,10		0,25	POSITIVO	0,62	POSITIVO
305	804		0,31		0,56	POSITIVO	0,46	POSITIVO
306	944		0,23		0,50	POSITIVO	0,37	
307	214,5		0,13		0,29	POSITIVO	0,37	
310	26		0,15		0,19		0,57	POSITIVO
311	239,2		0,07		0,12		0,34	
312	144,8		0,08		0,18		0,37	
313	1243,1		0,31		0,34	POSITIVO	0,40	
314	132,8		0,05		0,16		0,40	
317	19	POSITIVO	0,09		0,17		0,48	POSITIVO POSITIVO
319	36		0,22		0,37	POSITIVO	0,43	POSITIVO
321	385,1		0,07		0,22		0,19	
322	144		0,16		0,21		0,25	
326	37,1		0,05		0,05		0,33	
328	69,1		0,67	POSITIVO	0,33	POSITIVO	0,49	POSITIVO POSITIVO
329	177,3		0,71	POSITIVO	0,64	POSITIVO	0,42	POSITIVO
333	144,8		0,23		0,18		0,71	POSITIVO
336	19,5		0,18		0,14		0,34	
337	345,8		0,13		0,29	POSITIVO	0,50	POSITIVO
338	228,7		0,12		0,13		0,41	
339	859,2		0,13		0,12		0,33	
340	291,7		0,06		0,18		0,26	

Fonte: Elaborado pela autora.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Exposição ao *Lutzomia* spp. e infecção por *Leishmania* spp. em felinos domésticos de área endêmica", Processo FOA nº 00323-2020, sob responsabilidade de Valéria Marçal Félix de Lima apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 28 de Julho de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Agosto de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Exposure to *Lutzomia* spp. and infection by *Leishmania* spp. in domestic cats in an endemic area", Protocol FOA nº 00323-2020, under the supervision of Valéria Marçal Félix de Lima presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 02, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 28, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 28, 2022.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B – NORMAS PARA SUBMISSÃO PLOS NEGLECTED

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

Submission Guidelines

About the Journal

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Related information for authors

- [PLOS Writing Center](#)
- [Submission system](#)
- [Journal scope and publication criteria](#)
- [Getting started guide](#)
- [Guidelines for other article types](#)
- [Guidelines for revisions](#)
- [Publication fees](#)

Style and Format

- ❗ When you first submit to the journal, providing you include all the necessary information needed for editorial assessment and review, we will not ask you to make any formatting changes. During resubmission, we may ask you to meet formatting requirements.

File format Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. [Read the LaTeX guidelines.](#)

Length Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.

Headings Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout and spacing Manuscript text should be double-spaced.

Do not format text in multiple columns.

Page and line numbers Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).

Tables Insert tables immediately after the first paragraph in which they are cited.

Supporting Information Upload Supporting Information (SI) files separately.

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types

Other Article Types

You may be eligible for APC
support

Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.
Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.
Reference style	PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references . See reference formatting examples and additional instructions below.
Equations	We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable. Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., "a ² + b ² = c ² "), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., ×, ≥, or ±) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values. Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.
Nomenclature	Use correct and established nomenclature wherever possible. <i>Units of measurement</i> Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units. <i>Drugs</i> Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN). <i>Species names</i> Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>). <i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i> Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC). <i>Allergens</i> The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site .

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service".

Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.

About the Journal

Style and Format

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Additional Information

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study Types
Other Article Types
You may be eligible for APC support

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract
- Author Summary
- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Supporting information Captions

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.



Ready to format your provisionally accepted manuscript?

Refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)



Ready to format your provisionally accepted manuscript?

Refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)



Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

Author list



Authorship requirements

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the [authorship policy](#). Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments](#).

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. [Read more about ORCID](#).

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled "current address." At a minimum, the address must include the author's current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

- i** Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

▶ How to select a new corresponding author in Editorial Manager



Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

 [Read the group authorship policy.](#)

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles.](#)

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

PLOS Neglected Tropical Diseases will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*?
- Why will your study inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

The cover letter will only be available to the editor and the journal staff.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

 [Download our sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should be succinct; it must not exceed 250–300 words. Authors should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given.

The Abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance.

Do not include any citations. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150-200 word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the Author Summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Example Author Summaries

[Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats' Indifference toward Sugar](#)

[A Hybrid Photoreceptor Expressing Both Rod and Cone Genes in a Mouse Model of Enhanced S-Cone Syndrome](#)

[Life in Hot Carbon Monoxide: The Complete Genome Sequence of *Carboxydotherrmus hydrogeniformans* Z-2901](#)

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

Introduction

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

The introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the [criteria outlined by the Uniform Requirements](#), as follows:

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to judge its appropriateness for the study and to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as P values, which fail to convey important information about effect size and precision of estimates. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the statistical software package(s) and versions used. Distinguish prespecified from exploratory analyses, including subgroup analyses.

Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information.

We recommend and encourage you to deposit **laboratory protocols** in protocols.io, where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
`http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io/[PROTOCOL DOI]`

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

PLOS ONE offers an option for publishing peer-reviewed Lab Protocol articles, which describe protocols hosted on protocols.io articles. Read more [information on Lab Protocol articles](#).

Results

The Results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#). PLOS does not accept references to "data not shown."

As outlined in the [Uniform Requirements](#), authors that present statistical data in the Results section should do the following:

Give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical significance attached to them, if any. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample."

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

Discussion

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types

Other Article Types

You may be eligible for APC
support

The Discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalizability, clinical relevance, strengths, and limitations of your study.

You may wish to discuss the following points also:

- How do the conclusions affect the existing knowledge in the field?
- How can future research build on these observations and what are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

- i** PLOS Journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)
- Submitted research should not rely upon retracted research. You should avoid citing retracted articles unless you need to discuss retracted work to provide historical context for your submitted research. If it is necessary to discuss retracted work, state the article’s retracted status in your article’s text and reference list.

Ensure that your reference list includes full and current bibliography details for every cited work at the time of your article’s submission (and publication, if accepted). If cited work is corrected, retracted, or marked with an expression of concern before your article is published, and if you feel it is appropriate to cite the work even in light of the post-publication notice, include in your manuscript citations and full references for both the affected article and the post-publication notice. Email the journal office if you have questions.

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

- i** Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company’s technical support.

About the Journal

Style and Format

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Additional Information

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpl9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i>. 2011;10: 1576-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i>. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005. Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "Forthcoming" for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. <i>arXiv:1403.3301v1</i> [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1 Kording KP, Mensh B. Ten simple rules for structuring papers. <i>BioRxiv</i> [Preprint]. 2016 bioRxiv 088278 [posted 2016 Nov 28; revised 2016 Dec 14; revised 2016 Dec 15; cited 2017 Feb 9]: [12 p.]. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/088278v5 doi: 10.1101/088278
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. <i>The New York Times</i> . 2014 Jan 29 [Cited 2014 March 17]. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show72e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. <i>Rear Window</i> [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an "S" and number. For example, "S1 Appendix" and "S2 Appendix," "S1 Table" and "S2 Table," and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

About the Journal

Style and Format

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Additional Information

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

i Read the [supporting information guidelines](#) for more details about submitting supporting information and multimedia files.

Figures and Tables

Figures

You can include figures in the main manuscript file at initial submission. If the manuscript reaches the revise stage, prepare and submit each figure as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.

i Read the [guidelines for figures](#).

Figure captions

Insert figure captions in manuscript text, immediately following the paragraph where the figure is first cited (read order). Don't include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- > A figure label with Arabic numerals, and "Figure" abbreviated to "Fig" (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of "Fig 1" must refer to a figure file named "Fig1.tif").
- > A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

i Read [more about figure captions](#).

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

i Read the [guidelines for tables](#).

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

i Read [our policy on data availability](#).

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

i [See our list of recommended repositories.](#)

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include Dryad and FlowRepository. Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at full submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information

Striking image

You can upload a visually striking image alongside your submission, which we may use to showcase your article through PLOS' online channels. We choose the monthly issue image from the striking images submitted with articles scheduled for publication.

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission

Guidelines for Specific Study Types

Other Article Types

You may be eligible for APC support

Submission Criteria

- Choose an image that represents the article in a striking and eye-catching way.
- It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- Alternatively, you can create or source an image, as long as it adheres to our CC BY license.
- High resolution: between 300-600 dpi
- Single panel
- Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file with the corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

i Striking images should not contain potentially identifying images of people. [Read our policy on identifying information.](#)

[The PLOS licenses and copyright policy](#) also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Include your statement in the Financial Disclosure section of the initial submission form.

The statement should include:

- Specific grant numbers
- Initials of authors who received each award
- URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- Study design
- Data collection and analysis
- Decision to publish
- Preparation of the manuscript

If they had no role in the research, include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

If the study was unfunded, include this sentence as the Financial Disclosure statement: "The author(s) received no specific funding for this work."

i [Read our policy on disclosure of funding sources.](#)

Competing interests

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

i [Read our policy on competing interests.](#)

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

Read our policies on [related manuscripts](#).

About the Journal

Style and Format

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Additional Information

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study Types
Other Article Types
You may be eligible for APC support



Preprints

PLOS encourages authors to post preprints to accelerate the dissemination of research. Posting a manuscript on a preprint server does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting preprints on [bioRxiv](#) or [medRxiv](#) can choose to concurrently submit their manuscripts to relevant PLOS journals through the direct transfer service.

Authors submitting manuscripts in the life and health sciences to *PLOS Neglected Tropical Diseases* may choose to have PLOS forward their submission to bioRxiv or medRxiv, depending on the scope of the paper, for consideration for posting as a preprint.



[Read more about preprints.](#)

[Learn how to post a preprint to bioRxiv or medRxiv at PLOS Neglected Tropical Diseases.](#)

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our [policy on competing interests](#) for more information.

Guidelines for Specific Study Types

Study design, reporting, and analyses are assessed against all relevant research and methodological technique standards held by the community. Guidelines for specific study types are outlined below.

Human and animal research

All research involving humans and animals must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s), and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). It must be stated in the Methods section of the paper whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the paper: (a) why written consent could not be obtained, (b) that the IRB approved the use of oral consent, and (c) how oral consent was documented.

Authors should be able to submit, upon request, a statement from the research ethics committee or institutional review board indicating approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form, and may require submission on particular occasions.

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, [The use of non-human primates in research](#), we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The institution that approved the study must be named, and it must be stated in the paper that the study was conducted adhering to the institution's guidelines for animal husbandry.

Patient privacy and informed consent for publication

Our human participant policy conforms to the [Uniform Requirements](#) of the International Committee of Medical Journal Editors:

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published. Complete anonymity is difficult to achieve, and informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. If data are changed to protect anonymity, authors should provide assurance that alterations of the data do not distort scientific meaning. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

For papers that include identifying information, or potentially identifying information, authors must download the [Consent Form for Publication in a PLOS Journal](#) (below), which the patient, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of the PLOS content license.

Once authors have obtained the signed consent form, it should be filed securely in the patient's case notes and the manuscript submitted to PLOS should include this statement indicating that specific consent for publication was obtained: "The patients in this manuscript have given written informed consent (as outlined in the PLOS consent form) to publication of their case details."

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Additional Information



Download the PLOS consent form (PDF):

› [English](#)

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
 Guidelines for Specific Study Types
 Other Article Types
 You may be eligible for APC support

- [French](#)
- [Portuguese](#)
- [Spanish](#)
- [Chinese](#)

Clinical trials

PLOS follows the [World Health Organization's \(WHO\) definition of a clinical trial](#):

A clinical trial is any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes [...] Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc.

Registering Clinical Trials

All clinical trials submitted to PLOS journals must be entered in a publicly accessible registry approved by the WHO or ICMJE. [See the list of approved registries](#).

PLOS journals consider prospective trial registration (that is, registration before participant enrollment has begun) to be best publication practice, as recommended by the ICMJE. Clinical trials that began to enroll participants before ICMJE recommendations took effect on July 1, 2005 may be retrospectively registered.

More information about trial registration, including the WHO definition of a clinical trial, is in the [ICMJE FAQ](#).

PLOS Neglected Tropical Diseases is unlikely to publish clinical trials that are not prospectively registered. We recognize, however, that in rare cases late registration may occur for exceptional reasons that merit consideration. Authors seeking evaluation by *PLOS Neglected Tropical Diseases* of a non-prospectively registered clinical trial must provide a compelling reason for lack of prospective registration.

In addition, as for all PLOS journals, authors wishing to submit a clinical trial that was not publicly registered before participant enrollment began must register the trial retrospectively in a publicly accessible registry. They must also:

- Register all related clinical trials and confirm they have done so in the Methods section
- Explain in the Methods the specific reasons for failing to register before participant enrollment
- Confirm that future trials will be registered prospectively

PLOS journal editors may decline to further consider any clinical trial for which, in the editor's judgment, absence of prospective registration raises concerns of selective publication or selective reporting of research outcomes.

PLOS supports the public disclosure of all clinical trial results, as mandated, for example, by the 2007 FDA Amendments Act. Prior disclosure of results on a clinical trial registry site will not affect consideration.

Required Documentation

Clinical trial reports must adhere to the relevant reporting guidelines for their study design, such as [CONSORT](#) for randomized controlled trials, [TREND](#) for non-randomized trials, and other specialized guidelines as appropriate.

For all clinical trial submissions, authors must include the following:

- Registration details (reported in the Methods section and in the submission form)
- CONSORT checklist or relevant reporting guideline (uploaded as supporting information)
- CONSORT flow diagram (uploaded as Fig 1)
- Trial protocol (uploaded as supporting information)
- Details of prior approval for human subjects research by an institutional review board (IRB) or equivalent ethics committee(s)

The submission will not be considered if documentation is not provided. The checklist, flow diagram, and protocol will be published with the article if the manuscript is accepted.

The manuscript file must include the following information:

- An explanation of any deviation from the trial protocol
- Description of informed consent obtained from participants
- Any information on statistical methods or participants not indicated in the CONSORT documentation

About the Journal
 Style and Format
 Manuscript Organization
 Parts of a Submission
 Additional Information

Systematic reviews and meta-analyses

Submissions with systematic reviews and meta-analyses are considered research articles. Submit these manuscripts with the "Research Article" type in the submission system.

27/11/2022 12:54

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

Requested at Submission
Guidelines for Specific Study
Types
Other Article Types
You may be eligible for APC
support

Reports of systematic reviews and meta-analyses must adhere to the [PRISMA Statement](#) or alternative guidelines appropriate to the study design, and include the completed checklist and flow diagram to accompany the main text. Authors must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they accomplished all applicable items.

i Download blank templates of the checklist and flow diagram from the [EQUATOR web site](#).

Abstracts should follow PRISMA for Abstracts, using the PLOS abstract format. Authors must also state within the Methods section of their paper whether a protocol exists for their systematic review, and if so, provide a copy of the protocol as supporting information.

The journal supports the prospective registration of systematic reviews. Authors whose systematic review was prospectively registered (e.g., in a registry such as [PROSPERO](#)) should provide the registry number in their abstract. Registry details and protocols will be made available to editors and reviewers, and included with the paper if the report is ultimately published.

Diagnostic studies

Reports of studies of diagnostic accuracy must adhere to the [STARD requirements](#) or alternative guideline appropriate to the study design (see the [EQUATOR web site](#)) and include a completed checklist as supporting information. Authors must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they addressed all applicable items.

Observational studies

For observational studies, including case control, cohort, and cross-sectional studies, authors must adhere to the [STROBE Statement](#) or alternative guidelines appropriate to the study design (see the [EQUATOR web site](#)) and include a completed checklist as supporting information. Authors must complete the appropriate reporting checklist not only with page references, but also with sufficient text excerpted from the manuscript to explain how they addressed all applicable items.

For observational studies, authors are required to clearly specify (a) What specific hypotheses the researchers intended to test, and the analytical methods by which they planned to test them; (b) What analyses they actually performed; and (c) When reported analyses differ from those that were planned, authors must provide transparent explanations for differences that affect the reliability of the study's results

If a prospective analysis plan (from the study's funding proposal, IRB or other ethics committee submission study protocol, or other planning document written before analyzing the data) was used in designing an observational study, authors must include the relevant prospectively written document with the manuscript submission for access by editors and reviewers and eventual publication alongside the accepted paper. If no prospectively written document exists, authors should explain how and when they determined the analyses being reported.

Microarray experiments

Reports of microarray experiments must conform to the [MIAME guidelines](#), and the data from the experiments must be deposited in a publicly accessible database.

Other Article Types

If you are submitting content other than a research article, [read the guidelines for other article types](#).

You may be eligible for APC support

Many institutional partners globally have publishing agreements with PLOS to allow their corresponding authors to publish with reduced or no APCs. To determine if your corresponding author is eligible, please [visit our institutional partners page](#) to determine what kind of agreement your institution has with PLOS.

If your corresponding author is affiliated with a participating institution, they must follow the instructions below to demonstrate eligibility.

i Read the full instructions for [submitting to a journal with the Flat Fee Agreement](#).

If your corresponding author is not from a participating institution and requires assistance paying publishing fees, please consider [applying for a fee waiver](#) at submission.