



Ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos em área endêmica do estado de São Paulo

[Occurrence of anti-*Leishmania* spp antibodies in felines in an endemic area of the State of São Paulo]

V.M. Camprigher¹, A.M.R.N. Matos¹, F.P. Ferreira¹, P.N. Batina²,
S.C. Costa³, I.T. Navarro³, M.S. Zanutto³

¹Aluno de graduação - Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR

²Médica veterinária - Laboratório Veterinário Laborcare - Bauru, SP

³Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR

V.M. Camprigher1
<https://orcid.org/0000-0001-8333-5807>
A.M.R.N. Matos1
<https://orcid.org/0000-0002-4095-2167>
F.P. Ferreira1
<https://orcid.org/0000-0003-0554-0252>
P.N. Batina2
<https://orcid.org/0000-0002-4374-2886>
S.C. Costa3
<https://orcid.org/0000-0002-3531-3555>
I.T. Navarro3
<https://orcid.org/0000-0001-9518-1083>
M.S. Zanutto3
<https://orcid.org/0000-0003-0880-4524>

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande impacto em saúde pública. A infecção nos gatos tem sido relatada nos países onde a doença é endêmica. Seu papel como reservatório não está satisfatoriamente elucidado, embora a transmissão do parasito de um felino infectado para vetor tenha sido reportada por xenodiagnóstico. O objetivo do trabalho foi avaliar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em animais da espécie felina em área endêmica para LV (Bauru-SP), por meio dos testes sorológicos de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), e associá-los às variáveis: gênero, idade, raça e forma de criação. Foram testados soros de 276 felinos, dos quais 82 foram reagentes pelo método ELISA (29,71%), 17 pelo RIFI (6,15%) e 10 em ambos os testes (3,6%). Houve associação estatística significativa para a variável forma de criação, em que 100% dos animais errantes foram soropositivos a pelo menos um dos testes ($P < 0,005$). Tal associação não foi encontrada para as demais variáveis analisadas ($P > 0,05$). Não houve concordância entre o resultado dos testes, pois o método ELISA é mais sensível que o método RIFI.

Palavras-chave: gato, leishmaniose, sorodiagnóstico, RIFI, ELISA

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis with a great impact on public health. Infection in cats has been reported in countries where the disease is endemic. Its role as reservoir is not satisfactorily elucidated, although transmission of the parasite from an infected feline to vector has been reported by xenodiagnosis. The objective of this study was to evaluate the presence of anti-*Leishmania* spp antibodies in feline animals in an area endemic to LV (Bauru-SP), using the serological tests of Indirect Immunofluorescence Reaction (IFR) and ELISA and variables: gender, age, race and form of creation. Samples of 276 felines were tested, of which 82 were ELISA reagents (29,71%), 17 by IFR (6,15%) and 10 in both tests (3,6%). There was a significant statistical association for the variable form of breeding, where 100% of the wandering animals were seropositive to at least one of the tests ($P < 0,005$). Such association was not found for the other variables analyzed ($P > 0,05$). There was no concordance between the results of the tests, since the ELISA method is more sensitive than the RIFI method.

Keywords: cat, leishmaniasis, serodiagnosis, RIFI, ELISA

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades infecciosas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O Brasil é o país da

América Latina com o maior número de casos anuais registrados, sendo a região Nordeste considerada a principal zona endêmica da leishmaniose visceral nas Américas (Brasil, 2017). Tem sido apontada como doença reemergente em evidente processo de transição epidemiológica, com aumento de casos nas áreas

Recebido em 16 de outubro de 2017

Aceito em 26 de março de 2018

E-mail: val_vet@hotmail.com

endêmicas e a expansão geográfica para estados da região Sul do Brasil, em franco processo de urbanização (Brasil, 2014). No Brasil, nas regiões consideradas endêmicas, a prevalência da leishmaniose felina encontrada variou bastante tanto na RIFI como no ELISA (Costa *et al.*, 2010). Inquéritos epidemiológicos realizados em vários países têm demonstrado taxas preocupantes de infecção nos gatos domésticos (Cardoso *et al.*, 2010; Garrido, 2012; Chatzis *et al.*, 2014).

Os felinos são naturalmente infectados pelas mesmas espécies de *Leishmania* que afetam os cães e os humanos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo (Pennisi e Persichetti, 2018). A transmissão do parasito de um gato infectado para o flebotômíneo já foi confirmada por xenodiagnóstico (Maroli *et al.*, 2007). Estudos apontam a possibilidade de o gato ser considerado reservatório, tendo, assim, papel fundamental na epidemiologia dessa zoonose (Brianti *et al.*, 2017). A justificativa do trabalho é alertar os médicos veterinários para a importância da leishmaniose visceral na espécie felina e para que a insiram na lista de seus diagnósticos diferenciais. O objetivo do trabalho foi avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em felinos de região endêmica (Bauru-SP) pelas técnicas sorológicas de RIFI e ELISA, em 2015.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua), com o protocolo de nº 5912.2016.17, englobando a produção, manutenção e/ou utilização de animais, para fins de pesquisa científica.

O local de estudo foi o município de Bauru, estado de São Paulo, região considerada endêmica para leishmaniose visceral.

Foram disponibilizadas amostras de soros de 276 felinos de Bauru, formadas por 140 fêmeas e 136 machos; entre dois meses e 18 anos de idade, agrupadas em: quatro meses a um ano, dois a sete anos, oito a 13 anos, 14 a 18 anos, e não informada; 55 animais de raça e 221 sem raça definida (SRD); 258 domiciliados (cinco animais residentes em apartamento e 253 em casas térreas) e 18 errantes. A divisão em faixas etárias foi realizada aleatoriamente, em razão da grande

diferença de idade entre os felinos. Não foi realizado cálculo sobre o n amostral (amostra por conveniência), e todos os soros foram obtidos de proprietários, cujo poder aquisitivo permitiu que os felinos passassem por prévio atendimento veterinário.

Tais amostras foram encaminhadas por médicos veterinários da cidade para análise no laboratório veterinário Laborcare. Posteriormente, foram enviadas ao Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina e submetidas aos exames sorológicos de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*. Os gatos foram identificados e rastreados para análise de seus dados cadastrais (gênero, raça, idade e forma de criação) no laboratório.

O antígeno solúvel de *L. amazonensis* foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Szargiki *et al.* (2009), com modificações. Após quatro dias de incubação das formas promastigotas em meio líquido Brain Heart Infusion – BHI (Himedia, Índia) e meio sólido Blood Agar Base – BAB (Himedia, Índia), a 24°C, a cultura foi lavada com salina 0,9% de NaCl e centrifugada durante 10 minutos a 1000 x G, três vezes. O sedimento foi ressuspenso em 10mL de salina a 0,3% de NaCl e submetido a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido por seis ciclos de ultrassom (modelo FB120 – Fisher Scientific, USA) de 0,5 minuto, a 60Hz, a 30% de potência, em banho de gelo. Foi realizada a centrifugação (16.000 x g, 30 minutos, 4°C), o sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada por meio do *kit* Proteica BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, USA), conforme recomendações do fabricante. As alíquotas foram armazenadas em *freezer* a -20°C até o momento da sua utilização.

Para realização da RIFI, utilizaram-se lâminas com antígeno bruto solúvel de *L. amazonensis*. Anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados usando-se as diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Os soros controle positivo e negativo empregados em todas as lâminas eram

Ocorrência de anticorpos...

oriundos de gatos das cidades de Ilha Solteira e Londrina, respectivamente. Para a leitura das lâminas, utilizou-se microscópio de epifluorescência LEICA DMLB, no aumento 400x. Foram considerados positivos os resultados de fluorescência igual ou superior a 1:40 (Guimarães *et al.*, 1974; Marzochi *et al.*, 1980).

O ensaio imunoenzimático indireto (ELISAI) para felinos foi realizado de acordo com técnica descrita previamente por Paranhos-Silva *et al.* (1996), com adaptações. As microplacas foram sensibilizadas com antígeno de *Leishmania amazonensis*, na concentração de 2,5µg/mL, os soros e o conjugado foram diluídos a 1:100 e 1:5.000, respectivamente, em solução de caseína. Todas as placas apresentavam dois controles positivos, quatro controles negativos e um branco. O cálculo do *cut-off* de cada placa foi obtido pela média das absorbâncias dos soros-controle negativos, com exclusão da média do branco, adicionado de três desvios-padrão. Após

determinação do *cut-off* por placa, realizou-se a correção dos pontos de corte, para que a sensibilidade e a especificidade fossem otimizadas; para isso, foi construída a curva *ROC* utilizando-se o MedCalc Statistical Software, no qual se obteve um *cut-off* de 0,247.

Para identificação dos fatores de risco (gênero, raça, idade, forma de criação) associados à variável resposta (resultados dos exames), utilizou-se o modelo de regressão logística e o seu ajuste foi verificado por meio do gráfico de envelope simulado (*half-normal plot*). Ainda foi aplicado o teste de McNemar para verificar a concordância entre os testes RIFI e ELISA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1A, é possível verificar a localização da cidade de Bauru, dentro do estado de São Paulo e, na 1B, a localização dos domicílios de felinos sororreagentes aos testes ELISA e/ou RIFI em Bauru, no ano de 2015.

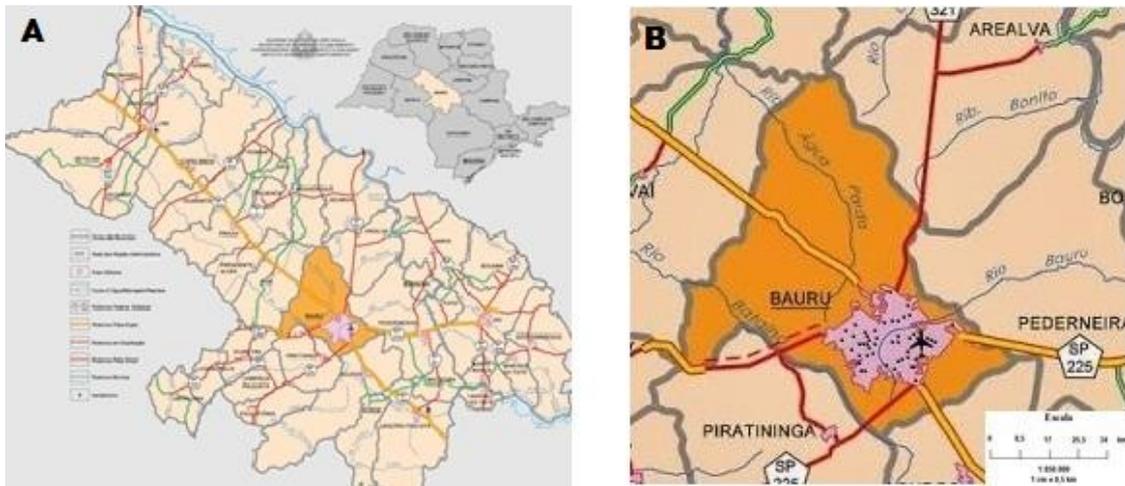


Figura 1A. Microrregião de Bauru, do estado brasileiro de São Paulo. 1B. Domicílio dos felinos sororreagentes aos testes ELISA e/ou RIFI em Bauru (2015).

Fontes: Fig. 1A - Região Administrativa de Bauru (2016). B - DER (Departamento de Estradas de Rodagem), 2006. Modificada pelo autor (2015).

Oitenta e dois animais (29,71%) foram reagentes no ELISA, 17 (6,15%) na RIFI e 10 (3,6%) em ambos os testes (RIFI e ELISA). Pelo método RIFI, foram obtidos títulos de 1:80 em três amostras, uma amostra com título de 1:320 e

outra com título de 1:640. Não houve associação estatística entre soropositividade e gênero, raça e idade ($P>0,05$), entretanto foi encontrada associação com forma de criação dos animais ($P<0,05$). Abaixo, a Tab. 1 com os resultados.

Tabela 1. Resultados da análise para determinação dos fatores de risco para LVF, pelos métodos sorológicos RIFI e ELISA, no município de Bauru, no ano de 2015

Fatores de risco	Total de animais	Testes RIFI/ELISA		
		Positivos (%)	Negativos (%)	
Gênero	Machos	136	58 (42,65)	78 (57,35)
	Fêmeas	140	51 (36,42)	89 (63,58)
Raça definida	Com	55	15 (27,27)	40 (72,73)
	Sem	221	94 (42,53)	127 (57,47)
Idade	4 meses - 1 ano	24	5 (20,83)	19 (79,17)
	2 - 7 anos	92	36 (39,13)	56 (60,87)
	8 - 13 anos	76	30 (39,47)	46 (60,53)
	14 - 18 anos	51	29 (56,86)	22 (43,14)
Forma de criação	Não informada	33	18 (54,55)	15 (45,45)
	Domiciliado	258	91 (35,27)	167 (64,73)
	Errante	18	18 (100)	0

Trabalhos publicados em todo o mundo sugerem que a resposta imune celular da espécie felina é efetiva o suficiente para controlar e conferir certo grau de resistência natural à infecção por *L. infantum*. Assim, a espécie é considerada menos susceptível quando comparada à espécie canina, exceto nos casos em que ocorrem eventos imunossupressores, que propiciam a disseminação e visceralização do parasito (Solano-Gallego *et al.*, 2007). Espera-se, então, que o número de gatos infectados, com altos títulos de anticorpos e sinais clínicos, seja bem menor que o de cães (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

Os métodos sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) (Manual..., 2008). Nos cães, altos títulos de anticorpos indicam infecção ativa e potencial transmissão do protozoário para os vetores (Quinnell *et al.*, 2003). No entanto, estudos demonstraram que tal fato não ocorre nos gatos (Simões-Mattos *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007).

Neste trabalho, 6,15% dos gatos foram reagentes pela técnica de RIFI. Alguns autores encontraram valores maiores (Vita *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Garrido, 2012; Chatzis *et al.*, 2014; Caldart *et al.*, 2016). Entretanto, outros autores encontraram valores menores (Montoya *et al.*, 2018). Pelo método ELISA, 29,71% dos animais foram reagentes. Caldart *et al.* (2016) obtiveram valores maiores de frequência, enquanto outros autores encontraram valores menores (Solano-Gallego *et*

al., 2007; Cardoso *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Chatzis *et al.*, 2014). Observou-se que, assim como no presente trabalho, os autores que realizaram os dois métodos sorológicos obtiveram maior soropositividade no ELISA quando comparado à RIFI (Caldart *et al.*, 2016), visto que o método ELISA é mais sensível que a RIFI.

Alguns trabalhos corroboram a falta de correlação existente entre testes sorológicos entre si e com os testes moleculares ou reações em cadeia de polimerase (PCR) (Can *et al.*, 2016; Montoya *et al.*, 2018). Martín-Sánchez *et al.* (2007) encontraram alta proporção de animais positivos na PCR de sangue (31,6%) e com baixos títulos de anticorpos pela RIFI (20) e baixa positividade na PCR de sangue em animais com altos títulos de anticorpos (160). Simões-Mattos *et al.* (2005) e Can *et al.* (2016) afirmaram que não existe correlação entre infecção e produção de anticorpos nos felinos, pois estes tornam-se soropositivos somente na fase tardia da infecção.

No presente trabalho, foi encontrada falta de correlação entre os métodos sorológicos avaliados ($P < 0,0001$). A porcentagem de felinos soropositivos foi muito maior pela técnica de ELISA que pela RIFI, assim como encontrados por outros autores (Caldart *et al.*, 2016). Abaixo, a Tab. 2 compara o resultado entre os dois métodos sorológicos realizados entre si e isoladamente.

Ocorrência de anticorpos...

Tabela 2. Valores absolutos e relativos dos resultados dos testes sorológicos isoladamente e entre si

Exames	RIFI	ELISA	RIFI e ELISA
Positivo	17 (6,15%)	82 (29,71%)	10 (3,6%)
Negativo	259 (93,85%)	194 (70,29%)	266 (96,4%)
Total	276 (100%)	276 (100%)	276 (100%)

Legenda: RIFI - reação de imunofluorescência indireta; ELISA - ensaio imunoenzimático.

Na espécie canina, as duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2014) para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários; o ELISA para a triagem e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA. Tal procedimento pode ser estendido à espécie felina. Assim, no presente trabalho, foram considerados como infectados somente os gatos reagentes em ambos os testes.

Resultados falso-positivos podem ocorrer por reação cruzada com *Toxoplasma* spp., *Trypanosoma* spp. e *Ehrlichia* spp. (Chatzis *et al.*, 2014; Noé *et al.*, 2015). Os protozoários causadores da doença de Chagas, assim como a *Leishmania* spp., também pertencem à família Trypanosomatidae e compartilham vários antígenos que ocasionam reações cruzadas em diagnósticos sorológicos (Caldart *et al.*, 2016). Contudo, razões técnicas também podem levar a erros. Importante lembrar que procedimentos de coleta, processamento, transporte e/ou armazenamento indevidos podem ocasionar hemólise e consequente coloração avermelhada do soro, interferindo na absorbância de métodos colorimétricos (Bastos *et al.*, 2010), como o ELISA.

No método RIFI, a interpretação pode ser subjetiva. Neste estudo, nas baixas diluições dos soros a serem testados, resíduos de fluoresceína foram confundidos com fluorescência citoplasmática do parasito.

Não existe um método de RIFI padronizado para gatos nem um valor de título de anticorpo aceito universalmente que corresponda à infecção. Os validados em cães são utilizados nos gatos (Can *et al.*, 2016).

A especificidade e a sensibilidade dos exames realizados poderiam aumentar se, em vez de promastigotas, fossem utilizadas as formas amastigotas, pois estas são as formas que parasitam o hospedeiro vertebrado. Embora as

amastigotas possam ser utilizadas como antígenos, as promastigotas representam a forma de antígeno mais frequentemente utilizada (Manual..., 2008).

Não houve associação estatística em relação ao gênero ($P>0,05$), como foi também observado por Garrido (2012). No entanto, Cardoso *et al.* (2010) e Montoya *et al.* (2018) encontraram predomínio de machos felinos sororreagentes. Estes associaram o observado ao comportamento do macho, tanto na disputa por território quanto por fêmeas para acasalamento. Por outro lado, Costa *et al.* (2010) obtiveram predomínio de soropositividade em fêmeas.

Não houve associação estatística entre a soropositividade e a idade dos animais ($P>0,05$) (Tab. 1), como observado por outros autores (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2018); ao contrário de Costa *et al.* (2010) e Cardoso *et al.* (2010), que observaram predomínio em gatos adultos e idosos, respectivamente. Animais idosos adoecem com maior frequência quando comparados aos mais jovens (Garrido, 2012), e proprietários de gatos não visitam clínicos veterinários rotineiramente, quando comparados aos dos cães, pelo menos em países em desenvolvimento, onde a leishmaniose é endêmica (Simões-Mattos *et al.*, 2005). Otranto *et al.* (2017) afirmaram que o maior número de animais idosos soropositivos poderia ser explicado pela exposição cumulativa ocorrida ao longo da vida.

Assim como Garrido (2012), não se observou associação estatística para o fator raça ($P>0,05$). Navarro *et al.* (2010) verificaram que a raça felina Europeu Comum foi mais acometida que as demais. Entretanto, faz-se necessário verificar se realmente há predisposição racial ou se a referida raça é muito comum na localidade estudada. Solano-Gallego *et al.* (2000), em ensaio realizado na ilha de Maiorca (Espanha), observaram que o Ibizian é uma raça canina

geneticamente resistente por apresentar resposta imune do tipo celular.

Em relação à forma de criação, encontrou-se associação estatística entre gatos domiciliados e errantes ($P>0,05$). Dos 18 animais errantes, quatro foram positivos nos dois testes e 14 pelo método ELISA. Contudo, é importante ressaltar que não foram obtidas informações a respeito da quantidade de animais e da frequência com que os gatos domiciliados tinham acesso à rua. Já Cardoso *et al.* (2010) e Garrido (2012), em Portugal, não encontraram tal associação.

Vita *et al.* (2005), em seus estudos, observaram que 85% dos felinos sororreagentes eram errantes ou com acesso ao exterior dos domicílios. Cardoso *et al.* (2010) encontraram diferença significativa, pelo método ELISA, entre gatos de área urbana (0%) e rural (10,5%) de município na região norte de Portugal. Encontraram-se 29,71% pelo mesmo método em área urbana, diferença possivelmente associada a resultados falso-positivos (Chatzis *et al.*, 2014). Entretanto, pelo método RIFI, encontraram-se 6,15% de animais reagentes. Esses dados sugerem uma maior prevalência de leishmaniose felina no município de Bauru como um todo, já que não foram analisadas amostras de soros de gatos domiciliados na zona rural. Noé *et al.* (2015) sugerem que os gatos domésticos podem atuar como elo entre ambientes silvestres e domésticos ao se deslocarem para áreas periurbanas e rurais, o que favorece a disseminação do parasito devido à maior exposição ao vetor. É sabido que o repasto sanguíneo, realizado pela fêmea do flebotômio, pode ocorrer em diferentes espécies (Desjeux, 2004). Barata *et al.* (2005) observaram forte preferência do vetor por sangue de aves domésticas, embora não exista na literatura relato dessa espécie exercendo papel de reservatório para *L. infantum*.

Comportamentos típicos dos felinos podem favorecer a disseminação do parasito nessa espécie, sobretudo no que se refere ao acesso à rua, onde exercem atividade predatória, percorrem grandes distâncias, coabitam com reservatórios silvestres e sinantrópicos, reforçados ainda pelo hábito noturno, similar ao dos flebotômios (Desjeux, 2004).

Novas e continuadas pesquisas devem ser realizadas, a fim de se elucidar o verdadeiro papel do gato na epidemiologia da doença para que medidas cabíveis em saúde pública sejam tomadas com relação à espécie.

CONCLUSÃO

Demonstrou-se a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. nos felinos da cidade de Bauru, estado de São Paulo, área endêmica para LVC. Não houve concordância entre os testes utilizados, já que o ELISA é mais sensível que a RIFI. Não houve associação estatística relacionada à idade, ao gênero e à raça. Porém, não se pode descartar a importância desses fatores de risco, já que o n amostral não representou a população felina da cidade de Bauru e as amostras foram de conveniência. Houve associação estatística relacionada ao modo de criação, em que 100% (18) dos felinos reagentes eram errantes.

REFERÊNCIAS

- BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotômios em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, p.421-425, 2005.
- BASTOS, M.S.; BERNER, A.; RAMOS, E.R.P. Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. In: MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2010, Maringá. *Anais...* Maringá: Cesumar, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar*. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189p.
- 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, 2006. 120p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

- BRIANTI, E.; FALSONE, L.; NAPOLI, E. *et al.* Prevention of feline leishmaniosis with an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar. *Parasitol. Vectors*, v.10, p.334, 2017.
- CALDART, E.T.; FERREIRA, F.P.; MATTOS, A.M.R.N.M. *et al.* Diagnóstico sorológico de *Leishmania spp.* em felinos e reação cruzada/coinfecção com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma spp.* *Rev. Ciênc. Vet. Saúde Pública*, v.3, p.166-169, 2016.
- CAN, H.; DÖŞKAYA, M.; ÖZDEMİR, H.G. *et al.* Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. *Exp. Parasitol.*, v.167, p.109-114, 2016.
- CARDOSO, L.; LOPES, A.P.; SHERRY, K. *et al.* Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infectious in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet. Parasitol.*, v.174, p.37-42, 2010.
- CHATZIS, M.K.; LEONTIDES, L.; ATHANASIOU, L.V. *et al.* Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp. Parasitol.*, v.147, p.54-59, 2014.
- CIDADES: Bauru, São Paulo. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350600>>. Acessado em: 18 maio 2017.
- COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D. *et al.* Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.47, p.213-217, 2010.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.27, p.305-318, 2004.
- GARRIDO, J.M.C.B.G. *Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por Leishmania infantum em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu*. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, PT.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Secretaria de Economia e Planejamento. Instituto Geográfico e Cartográfico. *Região Administrativa de Bauru*, 2016.
- GUIMARÃES, M.C.; GIOVANNINI, V.L.; CAMARGO, M.E. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.16, p.145-148, 1974.
- MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6.ed. Paris: Office International des Epizooties/World Organisation for Animal Health, 2008.
- MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; MUCCIO T. *et al.* Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v.145, p.357-360, 2007.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PEREZ, M. *et al.* Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.*, v.145, p.267-273, 2007.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SABROZA, P.C. *et al.* Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.22, p.149-155, 1980.
- MONTOYA, A.; GARCÍA, M.; GÁLVEZ, R. *et al.* Implications of zoonotic and vector-borne parasites to free-roaming cats in central Spain. *Vet Parasitol.*, v.251, p.125-130, 2018.
- NAVARRO, J.A.; SÁNCHEZ, J.; PEÑAFIEL-VERDÚ, C. *et al.* Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *J. Comp. Pathol.*, v.143, p.297-302, 2010.
- NOÉ, P.; DOMINGOS, S.L.; OSHIRO, E.T. *et al.* Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. *Ciênc. Anim.*, v.25, p.3-14, 2015.
- OTRANTO, D.; NAPOLI, E.; LATROFA, M.S. *et al.* Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. *Vet. Parasitol.*, v.236, p.144-151, 2017.

- PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C. *et al.* A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p.39-44, 1996.
- PENNISI, M.G.; PERSICHETTI, M.F. Feline leishmaniasis: is the cat a small dog? *Vet Parasitol.*, v.251, p.131-137, 2018.
- QUINNELL, R.J.; KENNEDY, L.J.; BARNES, A. *et al.* Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, v.55, p.23-28, 2003.
- SIMÕES-MATTOS, L.S.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J. *et al.* The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet. Parasitol.*, v.127, p.199-208, 2005.
- SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G. *et al.* The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v.90, p.37-45, 2000.
- SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L. *et al.* Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76, p.676-680, 2007.
- SZARGIKI, R.; CASTRO, E.A.; LUZ, E. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.13, p.47-52, 2009.
- VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E. *et al.* Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet. Res. Commun.*, v.29, p.319-321, 2005.