

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**Caracterização molecular de *Leishmania infantum* em felinos
domésticos na região Centro-Oeste do Brasil**

Isabel Parizotto Metzdorf

CAMPO GRANDE, MS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**Caracterização molecular de *Leishmania infantum* em felinos
domésticos na região Centro-Oeste do Brasil**

**Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic
cats in the Midwest region of Brazil**

Isabel Parizotto Metzdorf

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2015

Certificado de aprovação

ISABEL PARIZOTTO METZDORF

Caracterização molecular de *Leishmania infantum* em felinos domésticos
na região Centro-Oeste do Brasil

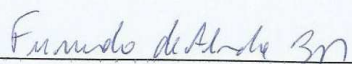
Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats
in the Midwest Region of Brazil

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestra em Ciência Animal.

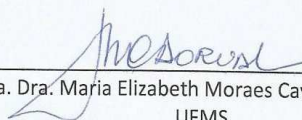
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 28/08/2015

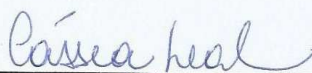
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges
(UFMS) – (Orientador)



Profa. Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavaleiros Dorval
UFMS



Profa. Dra. Cássia Rejane Brito Leal
UFMS

Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou e incentivou meus estudos. Vocês foram fundamentais para conclusão de mais esta etapa na minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por sempre iluminar o meu caminho e que me abençoe com serenidade, coragem e sabedoria. Serenidade para aceitar o que não posso mudar, coragem para mudar o que posso e sabedoria para distinguir umas das outras.

À toda minha família pela compreensão, incentivo e paciência. Em especial àqueles que ajudaram com todo amor e carinho a cuidar da minha filha Bianca para que pudesse escrever esta dissertação.

Ao orientador Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges pelos valiosos conhecimentos em Parasitologia Veterinária, por aceitar me orientar mesmo não sendo sua linha de pesquisa. Obrigada por acreditar na minha capacidade.

Ao coorientador Prof. Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior por todo o apoio durante o trabalho, pelo vasto conhecimento compartilhado, pela grande amizade, longas conversas e principalmente pela paciência.

Aos professores Dr. Carlos Alberto do N. Ramos, Dr^a Veronica Jorge B. Terra, Dr^a Cássia Rejane B. Leal e Dr^a Maria Elizabeth M. C. Dorval pelas importantes contribuições nas correções da dissertação.

Aos professores do curso de graduação e pós graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMS que através dos ensinamentos transmitidos contribuíram para minha formação profissional.

Às técnicas Fernanda Rodas Pires e Rosianne A. S. Tsujisakitsu, e ao residente Antonio F. S. Filho pelo auxílio na realização das PCR.

À Prof^a Dr^a Maria de Fatima Cepa Matos pela receptividade no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da UFMS.

Aos amigos e colegas, graduandos e pós graduandos do Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LADPAR) da FAMEZ pela amizade, colaboração e companheirismo.

Ao coordenador Prof. Dr. Charles Kiefer e ao técnico administrativo Ricardo de Oliveira dos Santos do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pelo auxílio burocrático durante a minha licença maternidade.

Aos servidores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande, por autorizar a coleta das amostras, pela receptividade e solicitude.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

SUMÁRIO

Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
1. Introdução.....	8
2. Revisão de literatura.....	9
2.1 Leishmanioses.....	9
2.2 Leishmaniose visceral.....	10
2.2.1 Transmissão.....	10
2.2.2 Ciclo biológico.....	11
2.2.3 Patogênese e aspectos clínicos em cães.....	12
2.3 Hospedeiros reservatórios e hospedeiros acidentais.....	13
2.4 Leishmaniose felina.....	15
2.4.1 Histórico e distribuição geográfica.....	15
2.4.2 Sinais clínicos.....	19
2.4.3 Diagnóstico.....	20
2.4.4 Relação flebotomíneos e felinos.....	24
3. Considerações Finais.....	25
Referências.....	26
Artigo: Caracterização molecular de <i>Leishmania infantum</i> em felinos domésticos na região Centro-Oeste do Brasil.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
1. Introdução.....	38
2. Material e métodos.....	38
2.1 População de estudo.....	38
2.2 Obtenção das amostras biológicas.....	39
2.3 Processamento das amostras para exame parasitológico.....	39
2.4 Detecção do parasito por método molecular.....	40
2.4.1 Extração de DNA das amostras.....	40
2.4.2 Reação em cadeia da polimerase.....	40
2.4.3 PCR-RFLP.....	41
3. Resultados.....	42
4. Discussão.....	44
5. Conclusão.....	47
Referências	48
Anexo.....	53

Isabel Parizotto Metzdorf. Caracterização molecular de *Leishmania infantum* em felinos domésticos na região Centro-Oeste do Brasil. 2015. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Resumo

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, de caráter zoonótico, que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. Com relação aos hospedeiros reservatórios no ambiente urbano, o papel do cão já está claramente elucidado no ciclo zoonótico da leishmaniose visceral. Porém, devido ao aumento da incidência de casos clínicos de leishmaniose felina, tem sido especulada a potencialidade destes animais como hospedeiros reservatórios de *Leishmania* sp. em áreas endêmicas. O objetivo desta revisão é analisar os principais aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose felina. Gatos podem apresentar parasitismo sanguíneo e/ou cutâneo e em alguns casos persistirem infectados por longos períodos, o que favoreceria a transmissão do parasito ao vetor. No entanto, do ponto de vista epidemiológico, alguns aspectos ainda precisam ser analisados para determinar se estes animais são capazes de manter e difundir a infecção no ambiente natural. É importante incluir esta parasitose no diagnóstico diferencial de distúrbios dermatológicos e/ou sistêmicos em felinos provenientes de áreas endêmicas.

Palavras-chave: leishmaniose; zoonose; reservatório, dermatologia

Isabel Parizotto Metzdorf. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in the Midwest region of Brazil. 2015. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Abstract

Leishmaniasis is a non-contagious, zoonotic infectious disease, that affects humans and several wild and domestic animals. Regarding the reservoir hosts in the urban environment, the role of the dog is already clearly elucidated in the zoonotic cycle of visceral leishmaniasis. However, due to increased incidence of clinical cases of feline leishmaniasis, has been speculated the potential of these animals a reservoir host *Leishmania* sp. in endemic areas. The objective of this review is to analyze the main clinical and epidemiologic aspects of feline leishmaniasis. Cats may have blood and / or skin parasites, and in some cases infected persist for long periods which would favor the transmission of the parasite to the vector. However epidemiologically some aspects still need to be analyzed to determine if these animals are able to maintain and spread the infection in the natural environment. It is important to include this parasitosis the differential diagnosis of skin and / or systemic disorders in cats from endemic areas.

Key-words: leishmaniasis; zoonosis; reservoir; dermatology

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e fazem parte das doenças tropicais negligenciadas. Constituem um sério problema de saúde pública mundial, pois são classificadas como a segunda doença parasitária mais prevalente, e a terceira enfermidade mais importante transmitida por vetores, depois da malária e filariose.

No Brasil, encontra-se em processo de expansão geográfica, sendo considerada endêmica em pelo menos 21 estados brasileiros incluindo o estado de Mato Grosso do Sul. Neste, é registrada em 56 dos 79 municípios e está entre as endemias de maior relevância em saúde pública, com grande dificuldade no seu controle. Este controle é direcionado principalmente para o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, controle dos vetores e eliminação de hospedeiros reservatórios.

Com relação aos hospedeiros reservatórios no ambiente urbano, a importância do cão já está claramente elucidada no ciclo da leishmaniose visceral. No entanto, diante dos relatos da infecção por *Leishmania* sp. em felinos domésticos, tem-se ponderado sobre a relevância do papel dos felinos na epidemiologia das leishmanioses no que diz respeito à manutenção e transmissão do parasito aos vetores. Neste contexto a classificação dos gatos como hospedeiros reservatórios ainda é controversa, sendo considerados até o momento, como hospedeiros acidentais.

Ocorre ainda a hipótese de apresentarem resistência natural à infecção e em alguns casos, as manifestações clínicas serem desencadeadas pela presença de co-infecções como a imunodeficiência viral felina (*Feline Immunodeficiency Vírus – FIV*) e a leucemia viral felina (*Feline Leukaemia Vírus – FeLV*), que acometem os felinos com elevada frequência.

Em razão da escassez de pesquisas que avaliem os aspectos clínico-epidemiológicos da infecção de gatos em áreas endêmicas, justifica-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre o tema.

2. Revisão de literatura

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial da Saúde como uma das mais importantes zoonoses, com transmissão endêmica em 98 países nos cinco continentes. Porém, apenas seis países são responsáveis por mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) no mundo: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia, com aproximadamente 20.000 a 40.000 mortes anuais. A leishmaniose tegumentar (LT) é mais amplamente distribuída, estima-se que os países Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos, respondam por 70 a 75% da incidência global (WHO, 2012).

De acordo com o Sistema Informação de Agravos de Notificação (BRASIL, 2014), no período entre 2007 a 2013 foram confirmados 24.702 casos humanos de LV no Brasil. A região Nordeste registrou 47,0% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,6%), Sudeste (16,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,06%). Atualmente, está distribuída em 21 estados brasileiros, sendo que neste mesmo período no estado de Mato Grosso do Sul foram registrados 1.586 casos com 120 óbitos, representando 74,3% dos casos confirmados para região Centro-Oeste.

A LT apresenta maior expansão geográfica, com casos autóctones registrados em todos os estados brasileiros. No período entre 2007 a 2013, 148.372 casos humanos foram notificados em todo país, com predomínio de casos na região Norte (41,2%), em seguida na região Nordeste (33,2%), região Centro-Oeste (14,8%), região Sudeste (8,2%) e região Sul (1,9%). Diferente da LV, os casos de LT no Mato Grosso do Sul representam apenas 3,4% na região Centro-Oeste enquanto o estado de Mato Grosso contribuiu com 83,7% dos casos confirmados (BRASIL, 2014).

As leishmanioses constituem um complexo de doenças de origem infecciosa, não contagiosas, de carácter zoonótico, que acometem o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos (BRASIL, 2010). São causadas por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, os quais estão agrupados e classificados em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania* e o subgênero *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, a doença pode se apresentar sob aspectos clínicos distintos. As formas cutânea, cutâneo-mucosa e cutânea difusa denominadas leishmaniose tegumentar são causadas por várias espécies de *Leishmania*, sendo as mais importantes: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* (LAINSON; SHAW, 1987; BRASIL, 2010). A forma visceralizante, que afeta órgãos como fígado, baço, linfonodos e intestinos, nomeada leishmaniose visceral, tem como agente etiológico, no Brasil, a espécie *Leishmania infantum* (sinonímia *Leishmania chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006).

2.2 Leishmaniose visceral

2.2.1 Transmissão

A transmissão do parasito ocorre principalmente por meio da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae conhecidos genericamente por flebotomíneos (LAINSON; SHAW, 1987). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (RANGEL; LAINSON, 2009; BRASIL, 2010). Na leishmaniose visceral, duas espécies estão relacionadas à transmissão vetorial da doença sendo elas a *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal transmissora de *L. infantum* no Brasil e *Lu. cruzi* foi incriminada como vetora nos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (GALATI et al., 1997; MISSAWA; MACIEL, 2006). A distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão, podendo ser encontrada nas cinco regiões geográficas: Nordeste, Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul (BRASIL, 2006; SOUZA et al., 2009a).

Poucos casos de transmissão não-vetorial de *Leishmania* têm sido referidos na literatura, contudo, outras possíveis formas como a transmissão congênita (ROSYPAL et al., 2005; SILVA et al., 2009a), venérea (DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2009b) e transfusional (FREITAS et al., 2006) já foram relatadas em cães. Em gatos, até o momento, outras vias de transmissão não foram citadas ou demonstradas por estudos experimentais (PENNISI et al, 2015).

Em humanos foi descrita a transmissão congênita (MEINECKE et al., 1999; MESCOUTO-BORGES et al., 2013), venérea (SYMMERS, 1960), por compartilhamento de agulhas (MORILLAS-MARQUEZ et al., 2002) e através de transplantes de órgãos (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 1999). Estes achados refletem a importância de se avaliar a frequência com que estas outras formas de transmissão ocorrem e sua relevância na epidemiologia da LV (SILVA et al., 2009a; MESCOUTO-BORGES et al., 2013).

2.2.2 Ciclo biológico

Durante seu ciclo biológico, *Leishmania* sp. apresenta-se sob duas formas evolutivas: amastigotas em hospedeiros vertebrados (formas arredondadas e sem flagelo exterior, localizam-se em células do sistema fagocítico mononuclear) e promastigotas (formas alongadas e flageladas, no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados) (LAINSON; SHAW, 1987). A transmissão vetorial ocorre quando fêmeas de flebotomíneos realizam repasto sanguíneo veiculando o agente de hospedeiro reservatório para suscetível (BAÑULS et al., 2007).

Após o repasto sanguíneo realizado pelo vetor, as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele do hospedeiro, e se aderem à superfície dos macrófagos e células de Langerhans passando para o meio intracelular através de fagocitose mediada por receptores, adquirindo a forma amastigota. Nos macrófagos, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo, que os separa do citoplasma celular. Após sucessivas multiplicações, rompem a célula hospedeira. As amastigotas liberadas invadem novas células, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o vetor ingere formas amastigotas de *Leishmania* livres e/ou macrófagos infectados presentes no sangue. No tubo digestório dos insetos, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas que sofrem várias transformações, com migração para porções anteriores do trato digestório (formas metacíclicas infectantes). A fêmea ao fazer um novo repasto sanguíneo no hospedeiro suscetível, inocula as formas promastigotas reiniciando o ciclo (BANETH, 2006).

2.2.3 Patogênese e aspectos clínicos em cães

As manifestações clínicas são extremamente variáveis e estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro, podendo este desenvolver infecção sintomática com quadros graves e letais, permanecer assintomático ou apresentar um ou mais sintomas leves, quando são classificados como oligossintomáticos (NOLI, 1999; BARBIÉRI, 2006; SILVA, 2007). No entanto, o quadro de infecção subclínica não é necessariamente permanente e fatores como condições de imunossupressão ou doenças concomitantes podem promover a progressão da doença (SOLANO-GALLEG0; BANETH, 2008).

A diferença entre a resistência e susceptibilidade do animal frente à infecção vai depender da adequada resposta imune mediada por células. Linfócitos T e suas subpopulações têm um papel crucial nesta resposta (BARBIÉRI, 2006; SARIDOMICHELAKIS, 2009). A resistência à infecção está associada a resposta do tipo Th1, que envolve a produção de citocinas como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), e interleucinas IL-2 e IL-12. Estas citocinas estimulam a imunidade mediada por células que é importante na eliminação da infecção. A principal função das células Th1 é a defesa mediada por fagócitos, especialmente no combate a microorganismos intracelulares. Por outro lado, o predomínio de uma resposta do tipo Th2 induz a produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que promovem a proliferação de células B com produção de imunoglobulinas (BANETH, 2006; BARBIÉRI, 2006; NOLI, 1999). O papel negativo da ativação de células B e super produção de imunoglobulinas é exemplificado pela formação de complexos imunes compostos de IgG/IgM e ou IgA. Imunocomplexos não só diminuem a capacidade fagocítica dos macrófagos, como também agravam a inflamação através da ativação do complemento e têm ação direta na imunopatologia em vários tecidos e órgãos (SARIDOMICHELAKIS, 2009). O papel das citocinas na leishmaniose visceral canina ainda não foi bem definido. Com base nos perfis de citocinas, parece que tanto resposta Th1 quanto Th2 estão presentes, mas a primeira predomina em cães resistentes (SOLANO-GALLEG0 et al., 2000; BARBIÉRI, 2006; SILVA, 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

A diferenciação para subpopulações de células Th1 ou Th2 está relacionada a fatores como: citocinas presentes no ambiente da estimulação, o tipo de célula apresentadora de antígeno, natureza e quantidade do antígeno e fatores genéticos do

hospedeiro. O componente genético é fortemente sugerido nos cães da raça Ibizian Hound, que vivem em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina e que raramente desenvolvem a forma clínica. Essa resistência foi relacionada com uma significativa resposta imune celular contra *L. infantum* (BARBIÉRI, 2006; SOLANO-GALLEGÓ et al., 2000).

As características clínicas da leishmaniose variam amplamente em consequência do tempo de evolução da doença, da patogenicidade do agente, dos diferentes órgãos afetados e da resposta imune do hospedeiro. Os danos causados no organismo podem ser por ação direta do parasito, resultando em lesões inflamatórias em órgãos como pele, fígado, baço, intestino, rins, olhos e ossos, ou ainda por ação indireta pela deposição de imunocomplexos nas articulações, membrana basal dos rins, vasos sanguíneos e olhos (NOLI, 1999; SOLANO-GALLEGÓ; BANETH, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

O amplo espectro de manifestações clínicas em cães inclui frequentemente: emagrecimento progressivo, atrofia muscular, febre intermitente, anorexia, apatia, epistaxe, diarreia, linfadenomegalia, dermatopatias, oftalmopatias e distúrbios da locomoção (CIAMARELLA et al., 1997; NOLI, 1999; BANETH, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007).

2.3 Hospedeiros reservatórios e hospedeiros acidentais

Considera-se que um hospedeiro reservatório pode ser uma espécie ou um complexo de espécies responsáveis pela manutenção a longo prazo de uma população de agentes infecciosos na natureza (ASHFORD, 1996; ROQUE; JANSEN, 2014).

Porém, a mera presença de infecção em uma espécie de mamíferos, mesmo em numerosos indivíduos, não indica necessariamente um hospedeiro reservatório. Para incriminar formalmente um hospedeiro como reservatório é necessário comprovar algumas características: que a população de parasitos depende da presença deste mamífero para sua manutenção a longo prazo na natureza; deve existir a sobreposição da distribuição geográfica e temporal dos reservatórios e vetores; atratividade entre vetor e reservatório no ambiente natural; a sobrevivência do reservatório quando infectado deve ser suficientemente longa para garantir a transmissão do patógeno ao vetor; a prevalência da infecção na população de reservatórios deve ser em níveis

superiores a 20%; o reservatório deve possuir parasitismo cutâneo ou sanguíneo em quantidade suficiente para infectar o vetor; a espécie de parasito encontrada no reservatório e no ser humano deve ser a mesma (CHABLE-SANTOS et al., 1995 ; WHO, 2010).

Hospedeiros acidentais são definidos como animais em que a infecção se desenvolve sob condições incomuns, ou seja, se infectam e podem adoecer dependendo do estado imunológico, porém não desempenham papel significativo na epidemiologia, pois não têm função na manutenção, a longo prazo, do ciclo na natureza. (ABRANCHES, 1989; ASHORD, 2003). As medidas direcionadas para eliminação de hospedeiros acidentais não afetam o controle da doença (QUINNELL; COURTENAY , 2009).

São considerados hospedeiros reservatórios naturais do agente etiológico da LT: roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (SHAW, 1988). Em animais domésticos a infecção já foi relatada em cães (GOMES et al., 2007), gatos (SCHUBACH et al., 2004; SOUZA et al., 2005) e cavalos (VEDOVELLO FILHO et al., 2008). Entretanto, ainda não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como hospedeiros reservatórios das espécies de *Leishmania* dermatrópicas (CASTRO et al., 2007; DANTAS-TORRES, 2007; GRAMICCIA, 2011; MAIA; CAMPINO, 2011), sendo considerados, até o momento, como hospedeiros acidentais dos parasitos (BRASIL, 2010).

Na LV, os hospedeiros reservatórios do agente etiológico no ambiente silvestre são principalmente mamíferos silvestres tais como canídeos, roedores e marsupiais. O fato de estes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é considerado um importante reservatório do agente, devido a aspectos como: susceptibilidade da espécie à infecção, elevada prevalência em áreas endêmicas; grande proporção de animais assintomáticos por longos períodos; presença de parasitismo cutâneo intenso sendo fonte de infecção para flebotomíneos; atratividade para flebotomíneos no ambiente natural; os parasitos isolados desses animais são os mesmos isolados de humanos e a proximidade de convivência com homem (GONTIJO; MELO 2004; BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES, 2007) .

À semelhança dos cães, os felinos também apresentam: susceptibilidade à infecção, parasitismo cutâneo, servem como fonte de alimentação para alguns

flebotomíneos (*Plhebotomus* spp. e *Lutzomyia* spp.) em condições experimentais e convivem próximo aos com humanos. Devido a estes fatores associados ainda à alta densidade populacional desses animais e à urbanização da doença, têm sido especulada a potencialidade dos felinos como reservatórios do parasito em áreas endêmicas (MAIA; CAMPINO, 2011). Embora a presença de felinos infectados sugira a participação destes animais no ciclo de transmissão de *Leishmania* sp., sua relevância ainda não foi esclarecida e continuar a ser investigada. Especula-se que os gatos por si só não seriam responsáveis pela persistência da infecção em áreas endêmicas a menos que cães infectados estejam presentes (PENNISI et al., 2015).

No entanto, é difícil diferenciar entre reservatórios secundários ou hospedeiros acidentais quando as espécies animais incriminadas na transmissão do agente patogênico, no caso *L. infantum*, compartilham a mesma área geográfica como ocorre com cães e gatos. Portanto, pesquisas devem ser realizadas em amostras representativas da população de felinos em áreas endêmicas para se obter uma prevalência precisa da infecção nesta espécie. Simultaneamente, a prevalência da infecção em cães que habitam a mesma região deve ser determinada, utilizando os mesmos métodos de diagnóstico para avaliar a relativa importância destas duas espécies na epidemiologia da infecção por *Leishmania* (MAIA; CAMPINO, 2011).

2.4 Leishmaniose felina (LF)

2.4.1 Histórico e distribuição geográfica

Em 1912 na Argélia, foi observada a presença de formas amastigotas características na medula óssea de um gato que convivia com um cão e uma criança portadores de LV (SERGENT et al., 1912).

Em 1927 foi relatado o diagnóstico da doença em felinos na Argentina (BRUMPT, 1949). Posteriormente, outros casos foram citados em diversos países como Venezuela (BONFANTE-GARRIDO et al., 1991; BONFANTE-GARRIDO et al., 1996), Espanha (HÉRVAS et al., 1999; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; SHERRY et al., 2011), Portugal (COSTA-DURÃO et al., 1994; MAIA et al., 2008), Itália (POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004), França (OZON et al., 1998; GREVOT et al., 2005), Suíça (RUFENACHT et al., 2005), Grécia (DIAKOU et al., 2009), Israel

(NASEREDDIN et al., 2008), Estados Unidos (TRAINOR et al., 2010), Guiana Francesa (ROUGERON et al., 2011) e Iran (DORBADAM et al., 2014).

O Brasil registra o maior número de casos de leishmaniose felina no mundo (DANTAS-TORRES et al., 2006). A enfermidade é citada em diversos estados nos quais a leishmaniose é endêmica (Tabela 1). Inicialmente estas citações eram basicamente relatos de casos esporádicos e posteriormente progrediram para estudos de prevalência e ocorrência de leishmaniose em felinos.

Tabela 1 - Detecção de casos e/ou inquéritos epidemiológicos de *Leishmania* spp. em felinos no Brasil.

Local	Ano	Animais avaliados	Método de diagnóstico	Animais positivos	Espécie de <i>Leishmania</i>	Autor/ano
Pará	1939	Relato de caso	Parasitológico direto Histológico	1	Não identificada	Mello (1940)
Belo Horizonte/ MG	1994	Relato de caso	Parasitológico direto PCR	1	<i>Leishmania</i> (Viannia)	Passos et al. (1996)
Cotia/SP	2000	Relato de caso	Parasitológico direto PCR	1	<i>Leishmania</i> (L.) infantum chagasi	Savani et al. (2004)
Fortaleza/ CE	2001	84	Elisa	9	Não identificada	Simões-mattos et al. (2001)
Rio de Janeiro/RJ	2003	Relatos de casos	Histológico eletroforese de isoenzimas	2	<i>Leishmania</i> (V.) braziliensis	Schubach et al. (2004)
Campo Grande /MS	2003	Relato de caso	Parasitológico direto, Cultura	1	<i>Leishmania</i> (L.) amazonensis	Souza et al. (2005)
Rio de Janeiro/RJ	2007	8	RIFI PCR	2 2	<i>Leishmania</i> chagasi	Silva et al. (2008)

Local	Ano	Animais avaliados	Método de diagnóstico	Animais positivos	Espécie de <i>Leishmania</i>	Autor/ano
Rio de Janeiro/RJ	2008	Relato de caso	Cultura, histológico Elisa e RIFI.	1	Leishmania (V.) braziliensis	Figueiredo et al. (2008)
Araçatuba/SP	2008	Relato de caso	PCR	1	Não identificada	Serrano et al. (2008)
Campo Grande /MS	2008	110	Parasitológico direto RIFI PCR	0 8 3	Leishmania braziliensis	Noé (2008)
Ribas do Rio Pardo/MS	2008	Relato de caso	Parasitológico direto, Cultura, Anticorpos monoclonais	1	Leishmania (L.) amazonensis	Souza et al. (2009)
Araçatuba/SP	2009	113	Elisa-Agt Elisa-FML Elisa-rK39 Concordância entre os testes	26 15 18 3	Não identificada	Neto et al. (2011)
Campo Grande/MS	2009	50	RIFI PCR Cultura	15 0 0	Não identificada	Braga et al. (2014)
Botucatu/SP	2009	50	RIFI PCR Cultura	0 0 2	Não identificada	Braga et al. (2014)
BH /MG	2010	Relato de caso	RIFI, PCR	1	L. infantum	Silva et al. (2010).
Andradina/SP	2010	Relato de caso	Parasitológico direto, Elisa e PCR	1	L. chagasi	Coelho et al. (2010)

Local	Ano	Animais avaliados	Método de diagnóstico	Animais positivos	Espécie de <i>Leishmania</i>	Autor/ano
Araçatuba/ SP	2010	386	RIFI	2	Não identificada	Cardia et al. (2013)
Araçatuba/ SP	2010	283	Parasitológico direto RIFI	2 0	Não identificada	Bresciani et al. (2010)
Araçatuba/ SP	2010	200	Parasitológico direto Elisa	8 23	Não identificada	Costa et al. (2010)
Araçatuba/ SP	2010	302	Parasitológico direto Elisa RIFI	30 39 14	L. chagasi	Sobrinho et al. (2012)
Andradina/ SP	2010	52	Parasitológico direto PCR	2 2	L. chagasi	Coelho et al. (2011)
Araçatuba/ SP	2010	55	Parasitológico direto Elisa RIFI IHQ	10 14 6 9	L.chagasi	Vides et al. (2011)
Birigui/SP	2011	109	Hemocultura RIFI PCR	52 3 17	L. chagasi	Peruca (2011)
Brasília/DF	2011	89	PCR	53	L. infantum	Marodin (2011)
Petrolina/ PE	2013	153	Elisa	6	Não identificada	Silva et al. (2014)

2.4.2 Sinais Clínicos

A apresentação clínica da leishmaniose nos felinos pode variar de acordo com a espécie do parasito envolvido (FIGUEIREDO et al., 2008). Nos relatos de LF causada por *L. infantum* foram observados sinais clínicos, tais como: apatia, emagrecimento, febre, linfadenomegalia, anorexia, diarreia, estomatite crônica, gengivite, hepato/esplenomegalia, alterações oculares como uveíte, iridociclite granulomatosa, panuveíte e úlcera de córnea (HERVÁS et al., 1999; POLI et al., 2002; LEIVA et al., 2005; VIDES et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012; CHATZIZ et al., 2014a). Também, para a mesma espécie de *Leishmania* foram encontradas alterações dermatológicas como: alopecia, descamação cutânea, hiperqueratose, lesões crostosas melicéricas e hemorrágicas, úlceras e nódulos (OZON et al., 1998; POLI et al., 2002; SAVANI et al., 2004; VIDES et al., 2011).

Na LF causada por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, os sinais clínicos descritos são principalmente de distúrbios cutâneos como: lesões nodulares, vegetativas, pápulas e úlceras em plano nasal, orelhas e coxins plantares (SCHUBACH et al., 2004; SOUZA et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2008). Também podem ser observados sintomas semelhantes aos da forma visceral como apatia, emagrecimento e linfadenomegalia (FIGUEIREDO et al., 2008). Além da inespecificidade dos sinais clínicos, os felinos podem ainda manifestar quadros assintomáticos perante infecção por *Leishmania* sp. (MAIA et al., 2008).

Os felinos parecem demonstrar certo grau de resistência natural à enfermidade, por produzirem resposta imunológica predominantemente celular quando infectados pelo parasito (SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Esta imunidade seria efetiva para controlar a infecção, o que poderia promover até mesmo a cura espontânea, como observado em um estudo com animais experimentalmente infectados, no qual dez meses pós-infecção com *L. braziliensis*, todos os animais apresentaram cura clínica, sem detecção do parasito por técnicas parasitológicas (SIMÕES-MATTOS et al., 2005). Porém, a presença de distúrbios imunossupressores pode induzir disfunções imunológicas, com prejuízo desta resposta, contribuir para multiplicação e consequente disseminação do parasito e agravar os sintomas (HERVÁS et al., 1999; MARTÍN-SANCHÉZ et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Dentre as enfermidades com caráter imunossupressor, destacam-se a FIV e a FeLV, retrovíroses de extrema

importância para esta espécie por apresentarem elevada incidência, fácil contágio e disseminação (HERVÁS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2007). Alguns estudos identificaram uma correlação significativa entre FIV/FelV e leishmaniose em gatos (SHERRY et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012).

Como não existem sinais clínicos patognomônicos, a sintomatologia clínica inespecífica, pode ser facilmente confundida com outras enfermidades, principalmente as que cursam com distúrbios dermatológicos, somado à ocorrência de co-infecções imunossupressoras que podem sobrepor os sintomas, torna-se difícil distinguir a LF de outras enfermidades baseado apenas em diagnóstico clínico (POLI et al., 2002; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; GRAMICCIA, 2011; SOBRINHO et al., 2012). Portanto, o diagnóstico deve ser estabelecido com base na associação dos achados clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais (POLI et al., 2002; DANTAS-TORRES et al., 2006; MAIA et al., 2008; GRAMICCIA, 2011).

2.4.3 Diagnóstico

Os principais testes laboratoriais disponíveis incluem os exames sorológicos, que detectam a presença de anticorpos ou de antígenos específicos, as técnicas parasitológicas, cujo objetivo é visualizar o parasito, e os métodos moleculares nos quais o DNA do parasito é amplificado e identificado a partir de diferentes amostras biológicas (POLI et al., 2002; DANTAS-TORRES et al., 2006; GRAMICCIA, 2011).

As técnicas sorológicas mais utilizadas para diagnóstico da leishmaniose em gatos são Reação de Imunofluorescência Indireta- RIFI (POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; COELHO et al., 2010; SOBRINHO et al., 2012) e o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática - ELISA (SOLANO-GALLEGO et al., 2007; NASEREDDIN et al., 2008; COELHO et al., 2010; NETO et al., 2011; SHERRY et al., 2011). A prevalência da infecção em gatos varia de 0 a 68,5% mostrando uma grande variação nos resultados, que pode ser atribuída à metodologia, tamanho da amostragem, ponto de corte adotado e região geográfica estudada (DANTAS-TORRES et al., 2006; NETO et al., 2011; GRAMICCIA, 2011). Cabe ressaltar a necessidade da validação e padronização dos testes sorológicos para diagnóstico em felinos, pois a comparação de resultados de diferentes estudos se torna inviável devido a variações extremas de metodologia. Por exemplo, RIFI é a técnica

sorológica mais utilizada, com intervalos de ponto de corte que vão desde 1:2 até 1:100, esta ampla variação representa um efeito direto sobre as taxas de prevalência estimadas. De acordo com resultados obtidos a partir da utilização de controles positivos oriundos de infecções confirmadas por isolamento do parasito e de controles negativos provenientes de felinos de áreas não endêmicas, a diluição 1:80 seria proposta como ponto de corte para RIFI em soros felinos, porém estudos mais amplos são necessários para confirmar este achado (PENNISI, 2015).

Outro fator importante é a baixa prevalência da infecção em inquéritos sorológicos realizados em áreas endêmicas, de forma que não está esclarecido se as baixas taxas são devido à falhas da técnica na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose com produção de baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* sp. (SIMÕES-MATTOS et al., 2005; MARTIN-SANCHES et al., 2007; SOLANO-GALLEG0 et al., 2007; GRAMICCIA, 2011).

Em estudo experimental, as técnicas sorológicas falharam em detectar anticorpos durante a fase de manifestações clínicas da infecção por *L. braziliensis*. A ausência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de gatos com lesões cutâneas pode induzir a erros no diagnóstico de dermatopatias no caso da sorologia ser utilizada como teste de triagem (SIMÕES-MATTOS et al., 2005). Estes dados sugerem que a sorologia não é provavelmente o melhor método de diagnóstico da LF (MAIA; CAMPINO, 2011), e que sua utilização em inquéritos epidemiológicos em gatos não é adequada (CHATZIZ et al., 2014b).

Os métodos parasitológicos tais como, o exame parasitológico direto (citologia), exame histopatológico e a imunohistoquímica, permitem o diagnóstico definitivo da infecção pela demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* em diversos órgãos e tecidos, tais como linfonodos, medula óssea, fígado, baço e pele (HERVÁS et al., 1999; POLI et al., 2002; SCHUBACH et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008; VIDES et al., 2011). As taxas de infecções observadas quando se utilizou o exame parasitológico direto variaram de 0,3 % a 37% (BRESCIANI et al., 2010; VIDES et al., 2011; SOBRINHO et al., 2012).

Dentre estas técnicas, a citologia destaca-se como um dos melhores métodos parasitológicos a serem empregados no diagnóstico da infecção em gatos, devido à rapidez, praticidade, baixo custo e especificidade na identificação do patógeno (DANTAS-TORRES et al., 2006). Todavia, sua sensibilidade pode ser influenciada

principalmente pela densidade parasitária, pelo tipo de material coletado, experiência técnica do observador e tempo de leitura da lâmina (POLI et al., 2002; VIDES et al., 2011, CHATZIZ et al., 2014a).

Nos felinos com sintomatologia cutânea, os exames citológicos e histopatológicos de nódulos e/ ou úlceras mostram serem excelentes ferramentas no diagnóstico da leishmaniose, pois além de permitirem a visualização do parasito, auxiliam no diagnóstico diferencial de outras dermatopatias que cursam com sinais clínicos semelhantes como infecções fúngicas e neoplasias (PENNISI et al., 2004; TRAINOR et al., 2010; VIDES et al., 2011; MAIA et al., 2015).

A reação de imunohistoquímica comprovou ser mais sensível para a detecção de parasitos em tecidos quando comparada com a avaliação histológica, pois são utilizados anticorpos associados a marcadores para localizar e identificar antígenos em diferentes tecidos, especialmente em órgãos com baixa carga parasitária (NAVARRO et al., 2010; VIDES et al., 2011).

As técnicas moleculares têm sido realizadas para confirmação do diagnóstico em animais suspeitos, identificação de espécies e detecção do parasito em portadores assintomáticos (PASSOS et al., 1996; POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004; TRAINOR et al., 2010; GRAMICCIA, 2011; SOBRINHO et al., 2012). A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) se destaca por sua elevada sensibilidade e especificidade, pois a técnica permite amplificar quantidades mínimas de DNA do parasito através da utilização de sequências iniciadoras específicas (*primers*) (SRIVASTAVA et al., 2011).

Em um estudo de prevalência realizado na Grécia, foram avaliadas, por meio de PCR, amostras de células conjuntivais, sangue, medula óssea e pele de 100 felinos, e a positividade foi de 3,1%, 13%, 16% e 18,2%, respectivamente para as amostras testadas. Em 80,5% dos animais, a PCR foi positiva em apenas um tecido, portanto a avaliação de múltiplos tecidos do mesmo animal eleva a sensibilidade da técnica (CHATZIZ et al., 2014a).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR e o *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) permitem a diferenciação das espécies de *Leishmania* como descrito por Schonian et al. (2003) e Volpini et al. (2004). Resumidamente, o método é baseado na amplificação da região ITS1 (*internal transcribed spacer 1*) que possui de 330 a 350 pb, e em seguida realiza-se a digestão

dos fragmentos amplificados com a enzima de restrição *HAE III*. Posteriormente, é realizada eletroforese dos fragmentos de DNA gerados pela digestão e de acordo com o perfil de bandas no gel de agarose se caracteriza a espécie por meio da comparação com fragmentos de DNA de cepas de referência de *Leishmania* sp.

A eficiência deste método tem sido relatada na identificação e classificação de espécies de *Leishmania*, por ser uma metodologia menos trabalhosa do que a análise isoenzimática, considerada o método padrão, pois evita a necessidade de isolamento do parasito em meios de cultura (SRIVASTAVA et al., 2011).

A técnica da PCR-RFLP já foi utilizada em amostras de cães (ANDRADE et al., 2006), gatos (MARODIN, 2011; DORBADAM et al., 2014) e animais silvestres: macacos-coruja *Aotus azarai azarai* (ACARDI et al., 2013), leão *Panthera leo* (DAHROUG et al., 2011), morcegos (SHAPIRO et al., 2013), cachorro-vinagre *Speothos venaticus* e raposas *Cerdocyon thous* (SOUZA et al., 2010) para a caracterização específica de *Leishmania*. A Secretaria de Vigilância em Saúde recomenda que nas áreas de ocorrência concomitante de LV e LT faz-se necessária a identificação da espécie do parasito em animais domésticos reservatórios e hospedeiros (BRASIL, 2010).

Em felinos, a técnica de PCR tem apresentado níveis de positividade superiores à detecção de anticorpos por testes sorológicos. Cabe ressaltar que não é correto comparar a detecção de anticorpos com a detecção de antígenos, especialmente em uma doença em que a imunidade celular é particularmente importante. Além disso, a presença de anticorpos indica animais que tiveram contato com o parasito, enquanto que a detecção de antígenos permite a identificação dos animais que albergam *Leishmania* sp (MAIA; CAMPINO, 2011).

A técnica de xenodiagnóstico é utilizada para detecção e isolamento de patógenos utilizando seu vetor biológico, com a finalidade de investigar aspectos epidemiológicos como a atratividade, preferência alimentar e a infectividade de reservatórios para flebotomíneos. No entanto, os relatos da utilização deste método em felinos parasitados por *L. infantum* têm sido escassos na literatura (GRAMICCIA, 2011; MAIA; CAMPINO, 2011). Até o momento existem apenas dois relatos, um da Itália (MAROLI et al., 2007) e outro do Brasil (SILVA et al., 2010), referente a dois felinos naturalmente infectados que foram submetidos ao xenodiagnóstico. Foi comprovado que, em condições experimentais, os gatos foram, além de fonte de alimentação para os

vetores, capazes de infectar fêmeas de flebotomíneos, *Phlebotomus perniciosus* e *Lu. longipalpis*, respectivamente em cada relato.

2.4.4 Relação flebotomíneos e felinos

Em um estudo que avaliou a susceptibilidade de felinos à infecção experimental por *L. braziliensis*, um dos agentes de LT, foi comprovado que uma fêmea de *Lutzomyia migonei* foi capaz de se infectar em condições laboratoriais, quando alimentada em um gato parasitado, sugerindo que felinos infectados por *Leishmania* spp., na presença de parasitismo cutâneo, podem infectar flebotomíneos (SIMÕES-MATTOS et al., 2005).

Embora como relatado acima, no xenodiagnóstico, os gatos serviram de fonte de alimentação para os flebotomíneos, as pesquisas que avaliaram hábitos alimentares de *L. longipalpis* em áreas de transmissão de leishmaniose não identificaram a presença de sangue de felinos no conteúdo do tubo digestivo de fêmeas de flebotomíneos. Porém, deve-se considerar que nem todos os estudos realizaram a pesquisa de sangue desta espécie animal, pois anti-soros de gatos não foram utilizado na metodologia (BARATA et al., 2005; CAMARGO-NEVES et al., 2007; MISSAWA et al., 2008).

Macedo-Silva et al. (2014) avaliaram a influência de diferentes fontes de sangue animal (humano, preá, porquinho-da-índia, gamba, cão, sagui, cavalo, galinha, hamster e gato) nas taxas de oviposição de fêmeas de *Lu. longipalpis*, com o intuito de pesquisar quais animais seriam capazes de sustentar todo o ciclo de desenvolvimento do vetor em questão. Os resultados mostraram que as fêmeas de flebotomíneos não se alimentaram de sangue de gatos, e não produziram ovos. Em todas as outras fontes de sangue ocorreram atratividade, respasto sanguíneo e oviposição.

Portanto, são necessárias mais pesquisas para esclarecer o nível de preferência alimentar de flebotomíneos em condições naturais comparando os gatos com outros animais domésticos (MAIA; CAMPINO, 2011), visto que *Lu. longipalpis* apresenta hábito alimentar eclético e oportunista, podendo ajustar seu padrão alimentar de acordo com a disponibilidade de hospedeiros, o que inclui uma ampla variedade de vertebrados (BARATA et al., 2005; MISSAWA et al., 2008).

3. Considerações finais

Dentre as espécies domésticas, os felinos também podem ser acometidos por leishmaniose como demonstrado por estudos experimentais e relatos de infecções naturais. Contudo, ainda não foi estabelecida a relevância do gato na epidemiologia da leishmaniose.

Do ponto de vista epidemiológico, vários aspectos ainda precisam ser analisados para determinar se estes animais são capazes de sustentar e difundir a infecção no ambiente natural. Dentre as questões que precisam ser esclarecidas estão: a prevalência da infecção em gatos em áreas endêmicas, tipo de resposta imunológica predominante, presença de resistência natural e a atratividade sobre flebotomíneos na natureza.

É importante incluir esta parasitose no diagnóstico diferencial de distúrbios dermatológicos e/ou sistêmicos em felinos provenientes de áreas endêmicas.

Referências

- ACARDI, S.A.; RAGO, M.V.; LIOTTA, D.J.; FERNANDEZ-DUQUE, E.; SALOMÓN, O. D. *Leishmania* (*Viannia*) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p.256-259, 2013.
- ABRANCHES, P. Reservoirs of visceral leishmaniasis. In **Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control**. Ed. DT Hart, Plenum Press, New York, p. 61-69. 1989.
- ALBUQUERQUE, A. R.; ARAGÃO, F.R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* na região de metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, ano XII, n. 71, p.78-80, 2007.
- ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 231–238, 2006.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 523-532, 1996.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Canadá. Saunders Elsevier, p.685-698, 2006.
- BAÑULS, A.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *LEISHMANIA* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p.1-109, 2007.
- BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; SILVA, J.C.; PRATA, A.; LOROSA, E.S.; FIÚZA, J.A.; GONÇALVES, C.M.; de PAULA, K.M.; DIAS, E.S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p.421-425, 2005.
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p.329-337, 2006.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.53, 1991.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDILVA, O.; TORREALBA, J.; GARCIA, M.T.; GAROFA, M.M.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVADO, J.; CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *venezuelensis*. **Revista científica**. Facultad de Ciencias Veterinarias, v. 6, n.3, p.187-190, 1996.

BRAGA, A.R.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n.5, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde In: **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**; Brasília; 2006: 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. In: **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**; Brasília; 2010: 180 p.

BRASIL – Ministério da Saúde do Brasil. 2014. Leishmaniose Visceral – Casos confirmados notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), Brasília, DF, Brasil. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>> Acesso em 25 maio 2015.

BRESCIANI, K.D.S.; SERRANO, A.C.M.; DE 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**, v.19, n.2, p.127–129, 2010.

BRUMPT, E. In: **Parasites Animaux, Précis de Parasitologie**: E. Brumpt (Editor), 6ªed. Masson et Cie Boulevard Saint-Germain: Paris; 1949. p. 248-256.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; GOMES, A. C. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 39, 2007.

CARDIA, D. F. F.; CAMOSSI, L. G.; NETO, L. S.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K. D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.634– 637, 2013.

CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the state of Paraná (Brazil). **Experimental Parasitology**, v.117, p.13–21, 2007.

CHABLE-SANTOS, J.B.; WYNSBERGHE, N.R.V.; CANTO-LARA, S.B.; ANDRADE-NARVAEZ, F. J. Isolation of *Leishmania* (L.) *mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 141-145, 1995.

CHATZIS, M.K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A.F.; RALLIS, T.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p.217–225, 2014a.

CHATZIZ, M. K.; LEONTIDES, L.; ATHANASIOU, L. V.; PAPADOPOULOS, E.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; RALLIS, T.; KOUTINAS, A. F.; ANDREADOU, M.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. 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. **Experimental Parasitology**, v.147, p.54-59, 2014b.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONE, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 21, 1997.

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

COELHO, W.M.D.; PEREIRA, V.B.R.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K.D.S. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.281-282, 2011.

COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; GOMES, A.A.D.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Occurrence of leishmaniosis in cats of an endemic area for visceral leishmaniosis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, p. 213–217, 2010.

COSTA-DURÃO, J.F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; SIMÕES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Conselho de Sesimbra): nota preliminar. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**, v.89, p.140-144, 1994.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.117–118, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F.L.C.; FIGUEIREDO, L. A.; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, v.11, p.32-40, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p.139–146, 2007.

DAHROUG, M.A.A.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUSA, V.R.F.; DUTRA, V.; GUIMARÃES, L.D.; SOARES, C.E.; NAKAZATO, L.; SOUZA, R. L. The first case report of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.249-250, 2011.

DIAKOU, A.; PAPADOPOULOS, E.; LAZARIDES, K. Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. **Journal Feline Medicine and Surgery**, v.11, p.728–730, 2009.

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v.42, p.650–658, 2005.

DORBADAM, S. M.; AKHLAGHI, L.; AKHONDI, B.; HAJJARAN, H.; ZAREI, Z.; HADIGHI, R. Evaluation of *Leishmania infantum* in cat by PCR-RFLP in an endemic region of visceral leishmaniasis in meshkin-shahr, Iran. **Journal of Genes, Microbes and Immunity**, p. 1-7, 2014.

FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.F.; NASCIMENTO, L.D.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, T.M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana em felino doméstico no município do Rio de Janeiro, Brasil, Relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v.74, p.58-60, 2008.

FREITAS, E.; MELO, M.N.; COSTA-VAL, A.P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.159-167, 2006.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; REGO, J. R. F.A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Saúde Pública**, p.378-90, 1997.

GOMES, A.H.; FERREIRA, I.M.; LIMA, M.L.; CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.; ARAUJO, M.F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.234–241, 2007.

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

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.23-30, 2011.

GREVOT, A.; JAUSSAUD, P.H.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; OZON, C. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v.12, n.3, p.271-275, 2005.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; YEBRA-BANGO, M.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, E.; SANZ-MORENO, C.; CUERVAS-MONS, V.; L. ALONSO PULPON, L.; RAMOS-MARTINEZ, A.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, J. Visceral leishmaniasis (Kala-azar) in solid organ transplantation: report of five cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p.918–921, 1999.

HERVÁS, J.; CHANCON-MARINQUE, F. L.; SANCHEZ-ISARRIA, M. A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILHO, J. A. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. **Journal Feline Medicine and Surgery**, v.1, n.2, p.101-105, 1999.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. **The leishmaniasis in biology and epidemiology**. Academic Press: London; 1987: p.1-120.

LEIVA, M.; LIORET, A.; PENA, T.; ROURA, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, p.71-75, 2005.

MACEDO-SILVA, V.P.; MARTINS, D.R.A.; QUEIROZ, P.V.S.; PINHEIRO, M.P.G.; FREIRE, C.C.M.; QUEIROZ, J.W.; DUPNIK, K.M.; PEARSON, R.D.; WILSON, M. E.; JERONIMO, S.M.B.; XIMENES, M.F. Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Medical Entomology**, v.51, n.1, p. 237-244, 2014.

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

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in Parasitol**, v. 27, n.8, p.341-344, 2011.

MAIA, C.; SOUSA, C.; RAMOS, C.; CRISTOVÃO, J. M.; FAÍSCA, P.; CAMPINO, L. First case of feline leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* genotype E in a cat with a concurrent nasal squamous cell carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. Open Reports, p. 1-5, 2015.

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

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; MUCCIO, T.D.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sand flies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, p. 357-360, 2007.

MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PEREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.30, n.145, p.267-273, 2007.

MEINECKE, C.K.; SCHOTTELIUS, J.; OSKAM, L.; FLEISCHER, B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala-Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v.104, p.65, 1999.

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

MESCOUTO-BORGES, M. R. M.; MAUES, E.; COSTA, D. L.; PRANCHEVICIUS, M. C. S.; ROMERO, G. A. S. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: report of two brazilian human cases. **The Brazilian Journal of infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 263-266, 2013 .

MISSAWA, N.A.; MACIEL, G.B.M.L. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 39, n.4, p.337-340, 2006.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.41, n.4, p.365-368, 2008.

MORILLAS-MARQUEZ, F.; MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO-SANCHEZ, C.; PINEDA, J. A.; MACIAS, J.; SANJUAN-GARCIA, J. *Leishmania infantum* (Protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. **Experimental Parasitology**, v.100, p.71-74, 2002.

NASEREDDIN, A.; SALANT, H.; ABDEEN, H. Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p.364-369, 2008.

NAVARRO, J. A.; SÁNCHEZ, J.; PENAFIEL-VERDÚ, C.; BUENDÍA, A.J.; ALTIMIRA, J.; VILAFRANCA, M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. **Journal of Comparative Pathology**. v.143, p.297–302, 2010.

NETO, L.S.; SOBRINHO, L.S.V.; MARTINS, C.O.; MACHADO, R.Z.; MARCONDES, M.; DE LIMA, V.M.F. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-*Leishmania* spp. antibodies in *Felis catus*. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.374–377, 2011.

NOÉ, P. Infecção por *Leishmania* sp. em gatos (*Felis domesticus*) na cidade de Campo Grande-MS, Brasil. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 61p. 2008.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**. v 9, p. 16-24, 1999.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIEVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.273-277, 1998.

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

PENNISI, M.G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; LO GIUDICE, S. Case report of Leishmaniasis in Four Cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.363-366, 2004.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. **Veterinary Parasitology**, v.208, p. 35-47. 2015.

PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLEGÓ, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, p.302, 2015.

PERUCA, L.C.B. Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para Leishmaniose canina e humana. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP. 111p. 2011.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.3, p.181-191, 2002.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v, 136, p.1915-1934, 2009.

RANGEL, E.F.; LAISON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.7, p.937-954, 2009.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.3, p.251–262, 2014.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D.S. Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle. **Journal of Parasitology**, v.91, n. 4, p. 970-972, 2005.

ROUGERON, V.; CATZEFLIS, F.; HIDE, M.; DE MEEÛS, T.; BANULS, A.L. First clinical case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a domestic cat from French Guiana. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.325–328, 2011.

RUFENACHT, S.; SAGER, H.; MÜLLER, N.; SCHAEERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M.M.; ROOSJE, P.J. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. **Veterinary Record**, v. 156, p. 542-545, 2005.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p.471-489, 2009.

SAVANI, E.S.M.; OLIVEIRA, M.C.G.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.3, p.229-233, 2004.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania*

in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.47, p.349-358, 2003.

SCHUBACH, T.M.P.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, A.S.; MADEIRA, M.F, SANTOS, I.B.; ANDRADE, M.V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n.3, p.165-167, 2004.

SERGEANT, E.T.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v.5, p.93-98, 1912.

SERRANO, A.C.M.; NUNES, C.M.; SAVANI, E.S.M.; D'AURIA, S.R.N.; BONELLO, F.L.; VASCONCELOS, R.O. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v.76, p.36-40, 2008.

SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.486-490, 1988.

SHAPIRO, J.T.; LIMA JUNIOR, M.S.C.; DORVAL, M.E.; FRANÇA, A.O.; MATOS, M.F.C.; BORDIGNON, M. O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta Tropica**, v. 128, p. 171–174, 2013.

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

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p. 20-31, 2007.

SILVA, A.V.M.; CÂNDIDO, C.D.S.; PEREIRA, D.P.; BRAZIL, R.P.; CABRERA, C.A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.105, p.92-94, 2008.

SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p. 159-162, 2009a.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Veneral transmission of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.55-59, 2009b.

SILVA, S.M.; RABELO, P.F.B.; GONTIJO, N.F.; RIBEIRO, R.R.; MELO, M.N.; RIBEIRO, V.M.; MICHALIK, M. S. M. First report of infection of *Lutzomyia*

longipalpis by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.150–154, 2010.

SILVA, R.C.N.; RAMOS, R.A.N.; PIMENTAL, D.S.; OLIVEIRA, G.M.A.; CARVALHO, G.A.; SANTANA, M.A.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L. C. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 47, n. 1, p. 108-109, 2014.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; RODRIGUES, T.P.; PRATA-JÚNIOR, J.R.C.; TEIXEIRA, M.J.; SILVA, T.F.P.; HOLANDA, C. M.; PEREIRA, B.S.; LOPES, C. A.P.; POMPEU, M.M.L. Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza (Ceará, Brazil). **Ciência Animal**, v.11, supl. 2, p.79-81, 2001.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M. R. F.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA-LIMA, J. W.; BEVILAQUA, C. M.L.; PRATA JUNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F. C.M.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, Z.C.B.; COELHO, I.C.B.; BARRAL, A.; POMPEU, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.3-4, p.199-208, 2005.

SOBRINHO, L.S.V.; ROSSI, C.N.; VIDES, J.P.; BRAGA, E.T.; GOMES, 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**, v.187, p.302-306, 2012.

SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis- a challenging zoonosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v.18, p. 232-241, 2008

SOLANO-GALLEGU, L.; LLULL, J.; Ramos, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.37–45, 2000.

SOLANO-GALLEGU, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional sero survey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal Tropical Medicine e Hygiene**, v.76, p.676–680, 2007.

SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.N.; MARIN, G.R.; NUNES, V.L.B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p.41-45, 2005.

SOUZA, G. D.; SANTOS, E.; ANDRADE Filho, J. D. The first report of the principal vector of visceral leishmaniasis in Americas, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)

(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 104, n. 8, p. 1181-1182, 2009a.

SOUZA, A.I.; NUNES, V.L.B.; BORRALHO, V.M.; ISHIKAWA, E.A.Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, MS State, Brazil: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n.2, p. 359-365, 2009b.

SOUZA N.P.; ALMEIDA A.B.; FREITAS T.P.; PAZ R.C.; DUTRA V.; NAKAZATO L.; SOUSA V.R. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p. 333-335, 2010.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, n.1, p.1-6, 2011.

SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet** 1, p.127-132, 1960.

TRAINOR, K.E.; PORTER, F.; LOGAN, K.S.; HOFFMAN, R. J.; SNOWDEN, K. F. Eight cases of Feline cutaneous leishmaniasis in Texas. **Veterinary Pathology**, v.47, n.6, p.1076-1081, 2010.

VEDOVELLO FILHO, D.; JORGE, F.A.; LONARDONI, M.V.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G. American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Parana state. **Brazilian Zoonoses Public Health**, v. 55, p.149–155, 2008.

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

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR–RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.90, p.31–37, 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update**. May 2012, Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf> Acesso em: 13 maio 2015.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control de las leishmaniasis**. Março 2010. Genebra. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf> Acesso em: 08 abril 2015.

ARTIGO

Caracterização molecular de *Leishmania infantum* em felinos domésticos na região Centro-Oeste do Brasil

Isabel Parizotto Metzdorf^a, Manoel Sebastião da Costa Lima Junior^b, Maria de Fatima Cepa Matos^c, Antonio Francisco de Souza Filho^a, Rosianne A. de Souza Tsujisaki^c, Karina Garcia Franco^c, Fernando de Almeida Borges^a.

^aLaboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil

^bLaboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Centro de Pesquisas Ageu Magalhães (CPqAM) - CEP: 50.740- 465, Recife, PE, Brasil

^cLaboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, 79090-900, Campo Grande, MS, Brasil

Resumo

Os registros de felinos domésticos naturalmente infectados por *Leishmania* sp. em áreas urbanas sugerem a hipótese da participação desses animais na cadeia epidemiológica como possível reservatório do parasito em áreas endêmicas. O objetivo foi detectar a ocorrência da infecção por *Leishmania* em felinos domésticos de área endêmica para leishmaniose visceral, e caracterizar os parasitos circulantes nesses animais. Foram avaliadas amostras de sangue periférico, linfonodo e medula óssea de 100 gatos adultos, de ambos os sexos e faixa etária variável, por meio de exame parasitológico direto e PCR. Foram identificados seis animais positivos por PCR, dos quais, quatro apresentavam formas amastigotas de *Leishmania* ao exame parasitológico direto nos três tecidos analisados. Para a caracterização das espécies de *Leishmania*, as seis amostras positivas na PCR foram submetidas à PCR-RFLP, que permitiu caracterizar o parasito como *Leishmania infantum* (sinonímia: *L. chagasi*), agente etiológico da leishmaniose visceral humana e canina.

Palavras-chave: Protozoário; zoonoses; hospedeiro reservatório; leishmaniose felina; PCR

Abstract

Reports of domestic cats infected with *Leishmania* sp. in urban areas suggest the possibility of their participation in the epidemiological chain as a possible reservoir of the parasite in endemic areas. The aim of this study was the detection of *Leishmania* spp. infection in domestic cats, in an endemic for human and canine visceral leishmaniasis area, followed by the characterisation of the parasite species circulating in cats. Peripheral blood, lymph node and bone marrow tissue were collected from 100 adult animals, both male and female, and were further analysed using cytological and molecular (PCR) detection techniques. Six positive animals were identified by PCR, of which, four had amastigotes of *Leishmania* to cytological examination, the three analyzed tissues. For the characterization of *Leishmania* species, the six positive samples by PCR were subjected to PCR-RFLP, which allowed to characterize the parasite as *Leishmania infantum* (synonym: *L. chagasi*), the etiologic agent of human and canine visceral leishmaniasis.

Keywords: Protozoa; zoonosis; reservoir host; feline leishmaniasis; PCR

1. Introdução

No Brasil, as leishmanioses constituem grave problema de saúde pública devido à elevada incidência e ampla distribuição geográfica. A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor e de um reservatório suscetível. O papel do cão no ciclo zoonótico da leishmaniose visceral (LV) já está elucidado, sendo este um importante reservatório de *Leishmania infantum* (GONTIJO; MELO, 2004; WHO, 2012).

Características semelhantes às dos cães foram observadas em felinos acometidos por leishmaniose, como: susceptibilidade à infecção, parasitismo sanguíneo e cutâneo, fonte de alimentação para alguns flebotomíneos (*Plhebotomus* spp. e *Lutzomyia* spp.) e convívio estreito com humanos (MAIA; CAMPINO, 2011).

O Brasil é o país que registra o maior número de relatos de casos de leishmaniose felina no mundo (DANTAS-TORRES et al., 2006), com citação da enfermidade nos Estados do Pará (MELLO, 1940), Minas Gerais (PASSOS et al., 1996), São Paulo (SAVANI et al., 2004), Rio de Janeiro (SCHUBACH et al., 2004; SILVA et al., 2008), Mato Grosso do Sul (SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2009b) e Pernambuco (SILVA et al., 2014).

Diante dos registros de infecções naturais em felinos domésticos e sua alta densidade populacional em áreas urbanas, levanta-se a hipótese da participação desses animais na cadeia epidemiológica como possível reservatório de *Leishmania* sp. em áreas endêmicas. Do ponto de vista epidemiológico, vários aspectos ainda precisam ser analisados para determinar se gatos são capazes de sustentar e difundir a infecção no ambiente natural (MAIA; CAMPINO, 2011). Dentre as principais questões que precisam ser esclarecidas estão: a prevalência da infecção em gatos em áreas endêmicas e a caracterização da espécie de *Leishmania* presente nesses animais.

O presente trabalho objetivou detectar a infecção natural por *Leishmania* sp. em felinos domésticos na cidade de Campo Grande, MS área endêmica de leishmaniose visceral.

2. Material e métodos

2.1 População de estudo

Foram coletadas amostras de 100 felinos domésticos, adultos, com idades entre um a dez anos, de ambos os sexos (43 machos e 57 fêmeas) e sem raça definida. Destes animais, três animais eram oriundos de clínicas veterinárias e os outros 97 restantes provenientes do

Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Campo Grande-MS, Brasil. Os animais foram avaliados à inspeção visual quanto ao escore corporal, coloração de mucosas, alterações em cavidade nasal, oral, oftálmicas e dermatológicas.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o protocolo nº 546/2013.

2.2 Obtenção das amostras biológicas

As coletas foram realizadas no período de novembro de 2013 a março de 2014.

Os animais eram previamente anestesiados com barbitúrico (tiopental) na dose de 12,5 mg/kg, por via endovenosa. Após este procedimento amostras de sangue periférico, medula óssea e linfonodos poplíteos foram coletadas para diagnóstico parasitológico e molecular.

As amostras de medula óssea foram obtidas por meio de aspiração da tuberosidade da tíbia, com volume da amostra de 3 mL, após minuciosa antisepsia da região. Amostras para teste molecular foram colocadas em tubo com EDTA e mantidas a -20°C até a análise.

A coleta de sangue periférico foi realizada por venopunção de jugular com volume de 3 mL, colocados em tubo com EDTA e mantidos a -20°C até o momento da análise.

Para punção aspirativa de linfonodos poplíteos utilizou-se agulha hipodérmica tamanho 25x7 mm (22G) e seringa de 5 mL. Nas coletas para diagnóstico molecular, as seringas foram previamente preenchidas com 0,5 mL de solução fisiológica estéril. Após a coleta, as amostras foram colocadas em tubos plásticos e mantidas a -20°C até a análise.

2.3 Processamento das amostras para exame parasitológico

O diagnóstico parasitológico foi realizado pela pesquisa direta do parasito em lâminas de esfregaço delgado de sangue periférico, medula óssea e aspirado de linfonodos.

Os esfregaços foram confeccionados em duplicata, secos ao ar, em seguida corados com Diff-Quick (Panótico Rápido®, LABORCLIN, São Paulo, Brasil) e examinados ao microscópio óptico em aumento de 1000x, para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

2.4 Detecção do parasito por método molecular

2.4.1 Extração de DNA das amostras

As extrações de DNA genômico das amostras de sangue periférico e medula óssea foram realizadas com a utilização do kit PureLink®Genomic (Invitrogen/Life Technologies), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para extração de DNA das amostras de linfonodo foi utilizado o seguinte protocolo (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989 – modificado): Foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 min, aproximadamente 500 µL de aspirado de linfonodo juntamente com a solução fisiológica estéril, sendo descartado o sobrenadante por inversão. Ao sedimento foram adicionados 300 µL de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0), 200 µL de SDS 10% e homogeneizado no “vortex”, em seguida acrescentados 20 µL de proteinase K (20 mg/mL - Invitrogen) e incubado a 65°C por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e o conteúdo foi agitado vigorosamente em “vortex” até completa homogeneização. Este produto foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos; a fase aquosa foi pipetada e transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 1mL de etanol 100%, seguido de homogeneização por inversão e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento, acrescentado 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente por 3 minutos a 10.000 rpm. Esta etapa foi repetida mais uma vez e em seguida o tubo foi invertido para secagem do sedimento e adicionados 50 µL de água ultrapura. Posteriormente, o mesmo tubo foi incubado entre 4°C a 8 °C durante a noite para completa solubilização do sedimento. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para serem utilizadas posteriormente nas reações de PCR.

2.4.2 Reação em cadeia da polimerase

Para detecção de DNA de *Leishmania*, todas as amostras foram submetidas à PCR. Foram utilizados dois pares de iniciadores que amplificam o kDNA de *Leishmania* sp., o par de iniciadores descrito por Rodgers et al. (1990): 13A (5'GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3') e 13B (5'ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') e os iniciadores: A 5' (C/G)(C/G)(G/C) CC(C/A) CTA T(T/A)T TAC ACC AAC CCC 3' e B: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3' (DEGRAVE et al., 1994). Ambos os pares de iniciadores amplificam fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) conservados do minicírculo do cinetoplasto.

Condições da PCR: A) Iniciadores 13A e 13B com volume de 25µL: tampão 1X Phoneutria, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ 1,5mM, formamida 4%, iniciadores 0,4 pmol de cada, Taq DNA polimerase Phoneutria 10U, DNA 1µL (30 a 200ng/µL), água 17,25µL e termociclador Biocycler. Os ciclos foram de 95°C - 7min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 55,2°C - 30 seg, 72°C - 1 min e extensão final de 72°C - 10 min. B) Iniciadores A e B com volume de 25µL: tampão 1X Phoneutria, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ 1,2mM, formamida 4%, iniciadores 0,4 pmol de cada, Taq polimerase Phoneutria 10U, DNA 1µL (30 a 200ng/µL), água 17,40µL e termociclador Biocycler. Os ciclos foram de 94°C - 4min, 35 ciclos de: 94°C - 30 seg, 68°C - 30 seg, 72°C - 30 seg e extensão final de 72°C - 10 min.

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose (Amersham Biosciences AB, Uppsala Sweden) a 2% com tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X pH 8,0 a 100V e 400mA por 1h e 30 minutos. Os geis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados em luz ultravioleta.

Foram utilizados controles fornecidos pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil): *Leishmania infantum* (MHOM/BR/74/PP/75), *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8).

2.4.3 PCR-RFLP

As amostras positivas foram submetidas à outra PCR com os pares de oligonucleotídeos LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGAT-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') descrito por El Tai et al. (2000). Estes iniciadores amplificam a região ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) sendo o produto desta amplificação estimado entre 300 a 350 pb. As reações foram realizadas com volume final de 25µL: tampão 1X Invitrogen, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ 1,5 mM, formamida 4%, iniciadores 0,4 pmol, Taq DNA polimerase Phoneutria 10U/µL, DNA 1µL (30 a 200ng/µL), água 17,25µL e termociclador BIO-RAD T100™ ThermalCycler. Os ciclos foram de 95°C - 3min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 55°C - 30 seg, 72°C - 1 min e extensão final de 72°C - 5 min.

Para a caracterização das espécies de *Leishmania* envolvidas, os “amplicons” dessas PCR foram submetidos a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) utilizando a enzima de restrição *Hae III* (SCHONIAN et al., 2003). Condições da RFLP: volume de 25µL, *Hae III* 1µL, tampão M 10x 2 µL, água estéril 5 µL, amplicon 17 µL, seguido de incubação a

37°C durante 3 horas. Em seguida os produtos de PCR-RFLP foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose de alta resolução (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 3% com tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X pH 8,0 a 100 V e 400 mA por 3 horas. Os geis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados em luz ultravioleta.

3. Resultados

Dos animais examinados, 58% (58/100) possuíam algum sinal clínico quando avaliados à inspeção visual, ocasionalmente o mesmo animal apresentava mais de um sinal clínico. As principais alterações observadas foram: emagrecimento 51,7% (30/58), dermatopatias 41,3% (24/58), complexo gengivite-estomatite 17,2% (10/58), ectoparasitos 12,0% (7/58), secreção ocular 10,3% (6/58), icterícia 8,6% (5/58), palidez de mucosas 8,6% (5/58), linfadenomegalia 5,1% (3/58), secreção nasal 5,1% (3/58), uveíte 5,1% (3/58), úlceras de córnea 3,4% (2/58) e diarreia 3,4% (2/58).

Dos 100 animais avaliados, quatro (4%) apresentaram formas amastigostas de *Leishmania* ao exame parasitológico direto nos três tecidos analisados (sangue periférico, medula óssea e linfonodo). A PCR detectou seis animais positivos (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados do exame parasitológico direto e da PCR em amostras de tecidos coletados de felinos de região endêmica para leishmaniose visceral, Campo Grande, MS, 2013 – 2014.

Animal	Parasitológico			PCR		
	Sangue periférico	Medula óssea	Linfonodo	Sangue periférico	Medula óssea	Linfonodo
40	+	+	+	+	+	-
73	-	-	-	-	+	-
88	-	-	-	-	+	-
96	+	+	+	+	+	+
97	+	+	+	+	+	+
98	+	+	+	+	+	+
Total	4	4	4	4	6	3

Nos seis animais infectados, a espécie de *Leishmania* envolvida foi caracterizada como *Leishmania infantum* pela técnica de PCR-RFLP (Figura 1). Nesta técnica, os fragmentos de DNA gerados pela digestão de fragmentos amplificados das amostras positivas foram comparados com os do DNA de cepas de referência de espécies de *Leishmania*.

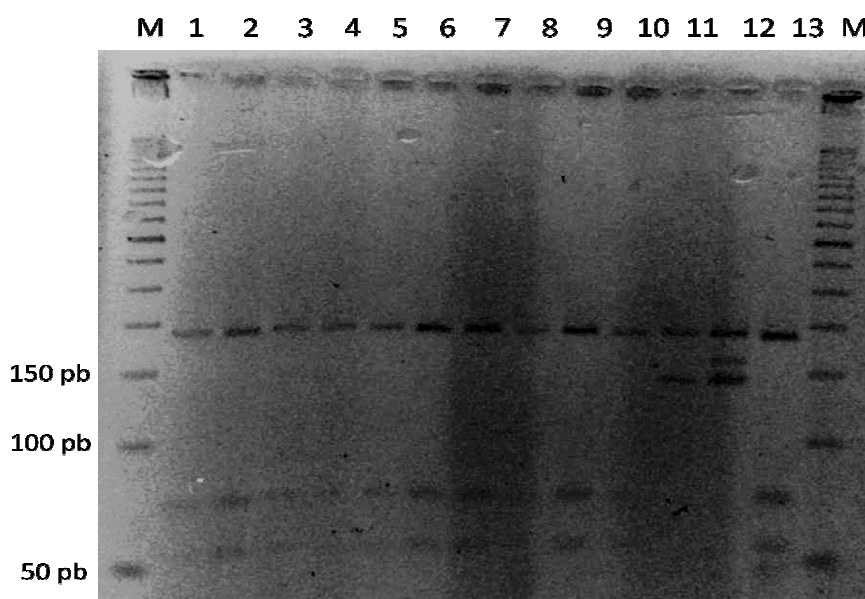


Figura 1 - Resultados da PCR-RFLP para região ITS-1 em gel de agarose de alta resolução 3%. (M) Marcador 50 pb; (1) DNA de sangue periférico do animal 40; (2) DNA de medula óssea do animal 40; (3) DNA de medula óssea do animal 73; (4) DNA de medula óssea do animal 88; (5) DNA de sangue periférico do animal 96; (6) DNA de medula óssea do animal 96; (7) DNA de medula óssea do animal 97; (8) DNA de sangue periférico do animal 98; (9) DNA de medula óssea do animal 98; (10) DNA de linfonodo do animal 98; (11) Controle *L. (Leishmania) amazonensis*; (12) Controle *L. (Viannia) braziliensis*; (13) Controle *L. infantum*; (M) Marcador 50 pb.

Nos animais diagnosticados com *L. infantum*, as alterações clínicas encontradas foram: complexo gengivite-estomatite (4/6), emagrecimento (3/6), secreção mucopurulenta nasal e ocular (1/6), úlceras orais (1/6), prolapso retal com perfuração (1/6), dermatite alérgica à saliva de pulga (1/6), infestação por piolhos (1/6) e alopecia (1/6). Apenas um dos animais infectados não possuía manifestações clínicas à inspeção visual.

4. Discussão

Na população em estudo, a positividade encontrada ao exame parasitológico direto foi de 4%, mesmo resultado obtido por Costa et al. (2010) em Araçatuba e similar ao descrito por Coelho et al. (2011) em Andradina, no qual 3,84% dos gatos investigados estavam infectados por *Leishmania* sp. As taxas de infecção observadas quando se empregou o exame parasitológico direto variaram de 0,3 % a 37% (BRESCIANI et al., 2010; VIDES et al., 2011). Esta ampla variação nos resultados se deve, em parte, por diferenças nas amostragens. Estudo realizado em animais com alterações dermatológicas como o conduzido por Vides et al. (2011) encontraram taxas maiores quando comparado com pesquisas que obtiveram amostras aleatórias, como no presente estudo.

Outros fatores também podem intervir nos resultados, tais como a densidade parasitária, que pode se apresentar baixa em animais assintomáticos e imunocompetentes. Além disso, deve-se considerar também o tipo de material biológico coletado, qualidade do material obtido e experiência técnica do observador. Pesquisas realizadas em amostras de sangue periférico mostraram tendência a apresentar menor quantidade de parasitos quando comparado com aspirados de linfonodo e medula óssea ou impressões de lesões cutâneas (POLI et al., 2002; VIDES et al., 2011., MAIA; CAMPINO, 2011). Neste estudo, não houve influência do tipo de material biológico coletado, pois, nos quatro animais positivos ao exame parasitológico direto foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania* sp nos três tecidos avaliados.

Devido à alta especificidade, rapidez, baixo custo e fácil execução o exame parasitológico direto pode ser adotado como procedimento inicial em animais com suspeita de leishmaniose. Todavia, devido à baixa sensibilidade, na presença de resultados negativos deve-se realizar outros exames utilizando técnicas moleculares (MAIA; CAMPINO, 2011).

Por meio da PCR foram identificados na população em estudo 6% de animais infectados, próximo ao referido por Sherry et al. (2011), que obtiveram 8,7% de positividade em análise de prevalência em Ibiza-Espanha. No entanto, foram superiores aos descritos por Vilhena et al. (2013) que identificaram 0,3% animais positivos nas regiões norte e central de Portugal e de Coelho et al. (2011) que relataram 3,84% de animais parasitados em Andradina-SP, Brasil.

Por outro lado, a frequência encontrada foi muito abaixo dos 25,7% citados no sul da Espanha (MARTIN-SANCHES et al., 2007), 30,4% em Lisboa (MAIA et al., 2008), e 41% na Grécia (CHATZIZ et al., 2014), regiões nas quais a leishmaniose também é endêmica.

Estas variações nas taxas de infecção podem ser devido à metodologia utilizada, área geográfica da pesquisa, população em estudo e tipo de amostra biológica utilizada (PENNISI et al., 2013; MIRÓ et al., 2014).

Diversos fatores podem comprometer a sensibilidade dos ensaios de PCR como: baixa quantidade de DNA na amostra teste, remoção inadequada de inibidores, degradação de DNA e falhas na técnica de extração com baixa recuperação de DNA (LACHAUD et al., 2001; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2014). Algum destes fatores pode ter ocorrido com a amostra de linfonodo do animal 40, na qual se esperava que a PCR fosse positiva já que no exame parasitológico direto foi encontrado o parasito, contudo, apresentou resultado falso-negativo.

Para caracterização da espécie *L. infantum* utilizamos a técnica da PCR-RFLP já descrita em cães (ANDRADE et al., 2006), gatos (DORBADAM et al., 2014) e animais silvestres: leão *Panthera Leo* (DAHROUG et al., 2011), morcegos (SHAPIRO et al., 2013), cachorro-vinagre *Speothos venaticus* e raposas *Cerdocyon thous* (SOUZA et al., 2010). Esta técnica permite a diferenciação das espécies de *Leishmania* como descrito por Schonian et al. (2003) e Volpini et al. (2004). A eficiência deste método na identificação e classificação de espécies de *Leishmania* deve-se por ser uma metodologia menos trabalhosa do que a análise isoenzimática, considerada o método padrão, pois evita a necessidade de isolamento do parasito em meios de cultura (SRIVASTAVA et al., 2011).

Embora a infecção por esta espécie de parasito nos felinos não seja tão frequente como nos cães, a mesma tem sido molecularmente identificada em gatos nos Estados de São Paulo (SAVANI et al., 2004; COELHO et al., 2011; VIDES et al., 2011), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2008) e Minas Gerais (SILVA et al., 2010).

Nos casos de infecção natural em felinos reportados no Brasil, foram identificadas as espécies *L. amazonensis* (SOUZA et al., 2005) e *L. braziliensis* (SCHUBACH et al., 2004) causadoras da leishmaniose tegumentar (LT) e a espécie *L. infantum* (sinonímia: *L. chagasi*) responsável pela LV (SAVANI et al., 2004; SILVA et al., 2008).

No estado do Mato Grosso do Sul, *L. infantum* já foi identificada em humanos (OLIVEIRA et al., 2006a; LIMA JUNIOR et al., 2009) e cães (SAVANI et al., 2005), porém destaca-se o fato de que é a primeira vez que *L. infantum* é caracterizada em felinos domésticos neste estado, em um estudo de ocorrência, enquanto em outros trabalhos, de relatos de casos na mesma região, foi descrita a espécie *L. amazonensis* em felinos (SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

Devido à inexistência de estudos epidemiológicos sobre outros possíveis reservatórios além dos cães no ambiente urbano, ressalta-se a importância de se caracterizar o papel dos felinos na epidemiologia da leishmaniose, pois embora a presença de felinos infectados sugira a participação dos mesmos no ciclo de transmissão de *L. infantum*, a relevância desta participação ainda não foi esclarecida e continua a ser investigada. Especula-se que os gatos por si só não seriam responsáveis pela persistência da infecção em áreas endêmicas, a menos que cães infectados estejam presentes (PENNISI et al., 2015).

Os resultados deste estudo indicam a necessidade de incluir os felinos nas pesquisas de preferência alimentar dos vetores, pois a presença de felinos infectados em áreas endêmicas não pode continuar a ser negligenciada.

No Brasil, duas espécies estão relacionadas à transmissão vetorial de *L. infantum*, *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*. A distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão, sendo encontrada em abundância em Mato Grosso do Sul principalmente no ambiente urbano, no qual apresenta atividade intensa durante todo o ano (OLIVEIRA et al., 2006b; ALMEIDA et al., 2010). Este fato se reflete nas notificações de casos de LV em humanos que ocorrem durante todos os meses do ano sem padrão regular de sazonalidade (BOTELHO; NATAL, 2009).

Em condições experimentais, foi comprovado que um felino naturalmente infectado por *L. infantum* foi capaz de infectar fêmeas de *Lu. longipalpis* quando submetido a xenodiagnóstico (SILVA et al., 2010). No entanto, pesquisas nas quais foram avaliados hábitos alimentares de *Lu. longipalpis* em áreas de transmissão de leishmaniose não identificaram a presença de sangue de felinos no conteúdo do tubo digestivo de fêmeas de flebotomíneos, porém em outros estudos também de hábitos alimentares, não foi pesquisada a presença de sangue desta espécie animal pois anti-soros de gatos não foram utilizados na metodologia (BARATA et al., 2005; CAMARGO-NEVES et al., 2007; MISSAWA et al., 2008).

Macedo-Silva et al. (2014) avaliaram a influência de diferentes fontes de sangue animal (humano, preá, porquinho-da-índia, gamba, cão, sagui, cavalo, galinha, hamster e gato) nas taxas de oviposição de fêmeas de *Lu. longipalpis*, com o intuito de pesquisar quais animais seriam capazes de sustentar todo o ciclo de desenvolvimento do vetor em questão. Os resultados demonstraram que as fêmeas de flebotomíneos não se alimentaram de sangue de gatos, e não produziram ovos. Em todas as outras fontes de sangue ocorreram atratividade, respasto sanguíneo e oviposição.

Portanto, são necessárias mais pesquisas para esclarecer o nível de preferência alimentar de flebotomíneos em condições naturais comparando os gatos com outros animais domésticos (MAIA; CAMPINO, 2011), em razão de *Lu. longipalpis* apresentar hábito alimentar eclético e oportunista, podendo ajustar seu padrão alimentar de acordo com a disponibilidade de hospedeiros, o que inclui uma ampla variedade de vertebrados (BARATA et al., 2005; MISSAWA et al., 2008).

Nos animais infectados, as alterações clínicas observadas: complexo gengivite-estomatite, úlceras orais, emagrecimento, secreção mucopurulenta nasal/ocular e dermatopatias são similares aos descritos na literatura para felinos parasitados com *L. infantum* (POLI et al., 2002; VIDES et al., 2011; CHATZIZ et al., 2014). No entanto, não é possível afirmar que tais alterações sejam decorrentes somente da infecção pelo parasito, uma vez que não foi pesquisada nestes animais a presença de co-infecções que cursam com sinais clínicos semelhantes. Este é um fator que requer atenção por parte dos profissionais veterinários que atuam em áreas endêmicas, pois geralmente não se suspeita de leishmaniose como doença primária nos felinos e o diagnóstico em muitos casos, ocorre acidentalmente ao se realizar exames laboratoriais para outras enfermidades.

Os resultados comprovam a importância de adicionar esta parasitose ao diagnóstico diferencial de patologias dermatológicas e /ou sistêmicas em felinos provenientes de áreas endêmicas.

5. Conclusão

Este estudo caracterizou a infecção por *Leishmania infantum* em felinos de Campo Grande-MS, área endêmica para leishmaniose humana e canina.

REFERÊNCIAS

- Almeida PS, Nascimento JC, Ferreira AD, Minzão LD, Portes F, Miranda AM, et al. Species of phlebotomines (Diptera, *Psychodidae*) collected in urban municipalities with transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev Bras Entomol* 2010; 54: 304-310.
- Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006; 140: 231-238.
- Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W, Silva JC, Prata A, Lorosa ES, et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 421-425.
- Botelho ACA, Natal D. First epidemiological description of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 503-508.
- Bresciani KDS, Serrano ACM, De Matos LVS, Savani ESMM, D'Auria SRN, Perri SHV, et al. Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19 (2): 127-129.
- Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Gomes AC. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. *Boletim Epidemiol Paulista* 2007; 4 (39).
- Chatziz 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. *Vet Parasitol* 2014; 202: 217-225.
- Coelho WMD, Pereira VBR, Langoni H, Bresciani KDS. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 176: 281-282.
- Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Sobrinho LSV, Marcondes M. Occurrence of leishmaniosis in cats of an endemic area for visceral leishmaniosis. *Braz J Vet Anim Sci* 2010; 47: 213-217.
- Dahroug MAA, Almeida ABPF, Sousa VRF, Dutra V, Guimarães LD, Soares CE, et al. The first case report of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in *Panthera leo* in Brazil. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; 249-250.
- Dantas-Torres F, Simões-Mattos L, Brito FLC, Figueiredo LA, Faustino MAG. Leishmaniose felina: revisão de literatura. *Rev Clín Vet* 2006; 11: 32-40.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-469.

Dorbadam SM, Akhlaghi L, Akhondi B, Hajjaran H, Zarei Z, Hadighi R. Evaluation of *Leishmania infantum* in cat by PCR-RFLP in an endemic region of visceral leishmaniasis in meshkin-shahr, Iran. *J Genes Microbes and Immunity* 2014; 1-7.

El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 2000; 94: 575-579.

Gonçalves-de-Albuquerque SC, Pessoa e Silva R, Morais, RCS, Trajano-Silva LAM, Régis-da-Silva CG, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M. Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *The J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2014; 20(16): 1-6.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Brasil Epidemiol* 2004; 7(3): 338-349.

Lachaud LE, Chabbert P, Dubessay J, Reynes J, Lamothe P, Bastien, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR Diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 613–617.

Lima Junior MSC, Andreotti R, Dorval MEC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 52–56.

Macedo-Silva VP, Martins DRA, Queiroz PVS, Pinheiro MPG, Freire CCM, et al. Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomol* 2014; 51(1): 237–244.

Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Dis* 2008; 8: 555-559.

Maia, C. & Campino, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitol* 2011; 27(8): 341-344.

Martin-Sanchez J, Acedo C, Muños-Perez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Marquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* 2007; 30(145): 267-273.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5249-5255.

Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. *Brasil Médico* 1940; 54 (12): 180.

Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(4): 365-368.

Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, et al. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasites and Vectors* 2014; 7: 112.

Oliveira ALL, Paniago AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, et al. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006a; 39: 446-450.

Oliveira AG, Galati EAB, Oliveira O, Oliveira GR, Espíndola IAC, Dorval MEC, et al. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006b; 101: 869-874.

Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felix domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(1):19-20.

Pennisi MG, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, et al. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 638-642.

Pennisi, MG, Cardodo L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 2015; 8: 302.

Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, et al. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol* 2002; 106(3): 181-191.

Rodgers WO, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detections and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71: 267-275.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 1989; 2ª Ed, 1626 pp

Savani ESM, Oliveira MCG, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2004; 120 (3): 229-233.

Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Araujo FS, Ilha IMN, et al. Occurrence of co-infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 739-41..

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47: 349-358.

Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira AS, Madeira MF, Santos IB, Andrade M.V, et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Trans Royal Society of Trop Med and Hyg* 2004; 98(3):165-167.

Shapiro JT, Lima Junior, MSC, Dorval ME, França AO, Matos MFC, Bordignon MO. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trop* 2013; 128: 171–174

Sherry K, Miró G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C, et al. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(3): 239-245.

Silva AVM, Cândido CDS, Pereira DP, Brazil RP, Cabrera, C.A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica* 2008; 105: 92-94.

Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 174: 150–154.

Silva RCN, Ramos RAN, Pimental DS, Oliveira GMA, Carvalho GA, Santana MA, Faustino MAG, Alves LC. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47 (1): 108-109.

Souza AI, Barros EMS, Ishikawa E, Ilha IMN, Marin GR, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 128(1-2): 41-45.

Souza AI, Nunes VLB, Borralho VM, Ishikawa EAY. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, MS State, Brazil: a case report. *J Ven Anim Toxins Trop Diseases* 2009; 15(2):359-365.

Souza NP, Almeida AB, Freitas TP, Paz RC, Dutra V, Nakazato L, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 4: 333-335.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans Royal Society Trop Med and Hyg* 2011;105 (1): 1-6.

Vides JP, Schawardt T F, Sobrinho LSV, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 178: 22–28.

Vilhena H, Martinez-Díaz VL, Cardoso L, Vieira L, Altet L, Francino O, Pastor J, Silvestre-Ferreira AC. 2013. Feline vector-borne pathogens in the north and center of Portugal. *Parasit Vectors* 2013; 6: 99.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR–RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous Leishmaniasis. *Acta Trop* 2004; 90: 31–37.

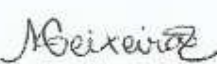
WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update. May 2012, Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf> Acesso em: 13 may. 2015



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 546/2013 do Pesquisador Fernando de Almeida Borges, referente ao projeto de pesquisa "Caracterização molecular de Leishmania e sua distribuição em tecidos de felinos domésticos", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 18 de outubro de 2013.


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 29 de setembro de 2013.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184