GRAZIELLA ULBRICHT BENVENGA

**Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos
e equinos no Estado de São Paulo**

São Paulo
2013

GRAZIELLA ULBRICHT BENVENGA

Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos
e equinos no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2891
FMVZ

Benvenga, Graziella Ulbricht
Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo /
Graziella Ulbricht Benvenga. -- 2013.
101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. *Leishmania* spp.. 2. Cães. 3. Gatos. 3. Equinos. 4. Suabe conjuntival. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência de Leishmania spp. em Cães, Gatos e Equinos no Estado de São Paulo", protocolado sob o nº 2361, utilizando 200 (duzentos) cães, 108 (cento e oito) gatos e 54 (cinquenta e quatro) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Tricia Maria Ferreira de Souza Oliveira, foi aprovado em reunião de 23/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Occurrence of Leishmania spp. In Dogs, Cats and Horses of São Paulo state", protocol number 2361, utilizing 200 (two hundred) dogs, 108 (one hundred eight) cats and 54 (fifty four) horses, under the responsibility Tricia Maria Ferreira de Souza Oliveira, was approved in the meeting of day 8/23/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 28 de agosto de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BENVENGA, Graziella Ulbricht

Título: Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Marisa**, pelo apoio em todos os momentos, pelo amor incondicional, por ser minha amiga sempre presente, que nunca me deixa desanimar, a quem eu devo minha vida e meu amor verdadeiro.

Ao meu pai **Carlos**, por seu amor, apoio, compreensão, meu amigo e companheiro, exemplo de determinação que sempre tenta clarear meus caminhos, a quem devo muito do que sou e do que sei.

Aos meus irmãos **Daniel** e **Fabiane** pela força, apoio e carinho em todos os momentos, que fazem da minha vida muito mais feliz, completa e divertida.

À **Deus**, pela vida, saúde, força para nunca desistir durante as dificuldades e por permitir que eu tornasse esse sonho realidade.

À minha amada afilhada **Duda**, minha alegria de viver, pelo seu amor verdadeiro e por ser tão especial.

Aos **animais** que a cada dia me ensinam mais sobre a vida, amor verdadeiro, sinceridade e pureza de sentimentos. Em especial às minhas cachorrinhas **Babi** e **Mel**, por tornarem a minha passagem por esta vida muito mais feliz e completa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, pela amizade, apoio, carinho, compreensão e paciência em todos os momentos. Seus valiosos conselhos e ensinamentos foram muito importantes e jamais me esquecerei e terei como retribuir a oportunidade que me deu quando acreditou em mim e me aceitou como sua orientada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Celso Martins Pinto pelo apoio, orientação, carinho e amizade que fizeram toda a diferença durante esta caminhada.

À minha amiga-irmã querida, Renata Savarino Levenhagen pela amizade sincera, carinho, companheirismo, compreensão no período em que estive ausente, e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós Josefina e Orlando, por todo amor e por me ensinarem desde pequena a amar e respeitar os animais.

Aos meus avós Amélia e Giuseppe por todo o amor, apoio e ensinamentos.

À minha tia Rosa Maria Benvenga e à minha prima Erica Cristina Benvenga pelo carinho, apoio, compreensão e hospitalidade.

À minha prima Viviane Benvenga Gallo e ao meu tio Vicente Gallo pela grande ajuda e apoio e carinho.

À amiga Patrícia Filippsen pelo carinho e apoio, por sempre clarear minhas idéias, me ajudar e ainda me fazer acreditar que atualmente ainda existem no mundo pessoas de coração puro e amizades verdadeiras.

À amiga Bianca Munaro pela amizade, carinho e apoio, mesmo durante todo o tempo em que estive ausente.

À amiga Bianca Ferreira pela amizade, carinho e apoio, apesar da imensa distância geográfica.

À amiga Raquel Fraga e Silva Raimondo pela amizade, apoio e conselhos.

À amiga Fernanda Gonsales que desde o primeiro dia de aula me recebeu de braços abertos com muito carinho sem nunca ter me visto antes, pelo apoio e amizade e na ajuda em todos os momentos.

À amiga Ivani Pires Ferreira pelo apoio, carinho, amizade e por sempre me receber com tanta alegria.

À amiga Júlia Benassi pela paciência, ajuda e carinho em todos os momentos, principalmente nos difíceis.

À amiga Vanessa Figueredo Pereira pelo carinho, apoio e ajuda.

Aos novos amigos que tive o prazer de conhecer em Pirassununga, João, Andréia, Victor, Fernanda e Ivo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares e a Prof.^a Dr.^a Lara Borges Keid pelo apoio e carinho.

À Prof.^a Dr.^a Solange Gennari pela oportunidade.

À Prof.^a Dr.^a Wilma Starke Buzetti pelo apoio e carinho e por tornar possível a realização das coletas na cidade de Ilha Solteira.

Ao Prof. Dr. Milton Passipiani, pela imensa colaboração, paciência, empenho e carinho, tão importantes durante as coletas em Ilha Solteira.

A todos os Professores do VPS que tive a oportunidade de conhecer, com os quais aprendi muito, e pude me tornar uma profissional melhor.

Aos queridos colegas do VPS de Pirassununga, Dani, Samantha, Rui, Ni, Ceiza e João pela ajuda, carinho e por terem me acolhido.

Ao querido Danival, do VPS de São Paulo, exemplo de educação e gentileza, sempre disposto a ajudar, pelo carinho e paciência que sempre teve comigo em todos os momentos.

À querida Daura Vaz, chefe administrativa da pós-graduação da FMVZ-USP pelo carinho, atenção e empenho em me ajudar.

À querida Neusa Mahbe, da biblioteca da FMVZ-USP, pelo carinho, ajuda e paciência.

Aos funcionários do VPS de São Paulo.

À CAPES pela oportunidade e por minha bolsa de Mestrado.

À FAPESP pelo apoio através do Auxílio Pesquisa n. 2011/00147-6.

À FCAV, da UNESP, Campos Jaboticabal, pela colaboração.

Aos queridos, Sebastião, Cláudia e Fellipe pela paciência, ajuda e carinho.

À Médica Veterinária, Maria de Fátima Alves Martins e a todos os colegas do Centro de Controle de Zoonoses de Itapequerica da Serra pela ajuda e apoio imprescindíveis para que as coletas fossem realizadas.

À Médica Veterinária, Luciana Guerra Gallo, ao Salles, à Beth e a todos os colegas do Centro de Controle de Zoonoses de Embu das Artes pelo carinho, acolhimento, ajuda e apoio.

Aos proprietários dos animais que permitiram sua participação neste trabalho, pela gentileza e confiança.

À todos os animais que tornaram este trabalho possível.

Ao grande amor da minha vida, por participar da realização deste sonho antes mesmo que ele se tornasse realidade.

À todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

"Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente".

Chico Xavier

RESUMO

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo.** [Occurrence of *Leishmania* spp. in dogs, cats and horses of São Paulo State]. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Cães, gatos e equinos domésticos podem ser importantes reservatórios de agentes infecciosos potencialmente zoonóticos, podendo-se destacar entre eles as leishmanioses. Por esse motivo, torna-se necessário aprimorar o conhecimento sobre essas enfermidades, estudando mais detalhadamente sua ecoepidemiologia, importante fonte de informações para a tomada de decisões com relação ao controle das mesmas. O presente estudo objetivou verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos procedentes de regiões endêmicas e não endêmicas do estado de São Paulo, por meio dos testes diagnósticos Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) e objetivou também comprovar a eficácia da PCR realizada com DNA extraído de amostras de suabe da conjuntiva ocular de gatos e equinos. Foram encontrados cães infectados por *Leishmania* spp. em Itapequerica da Serra, São Lourenço da Serra e São Paulo, com frequências de 3,12% (1/32) (PCR de suabe), 10% (1/10) (PCR de suabe) e 1,72% (02/116) (PCR de suabe) / 6,89% (08/116) (PCR de sangue), respectivamente. As amostras analisadas dos gatos provenientes dos municípios de Pirassununga e São Lourenço da Serra, foram positivas para *Leishmania* spp., com frequências de 28,57% (02/07) (PCR de suabe) / 28,57% (02/07) (RIFI) e 33,33% (1/3) (RIFI) respectivamente. Equinos infectados por *Leishmania* spp. foram verificados nas cidades de Bragança Paulista e Ilha Solteira, com frequências de 100% (14/14) (PCR de sangue) e 90% (36/40) (PCR de suabe)/ 100% (40/40) (PCR de sangue)/ RIFI 2,5% (01/40) respectivamente. Os resultados demonstram a presença de *Leishmania* spp infectando cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo e que o suabe de conjuntiva ocular foi capaz de detectar gatos e equinos infectados. A coleta de amostras da conjuntiva ocular mostrou-se de fácil execução em felinos, mas nem tanto em equinos, quando comparado à coleta de sangue.

Palavras-chave: *Leishmania* spp.. Cães. Gatos. Equinos. Suabe conjuntival.

ABSTRACT

BENVENGA, G.U. **Occurrence of *Leishmania* spp. in dogs, cats and horses of São Paulo State.** [Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo]. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Domestic dogs, cats and horses can be important reservoirs of potential zoonotic agents, as leishmaniasis diseases. Therefore it is necessary improving knowledge on these diseases by studying the ecoepidemiology of leishmaniasis, which is an important source to make decisions on the disease control. The present study aimed to verify the occurrence of *Leishmania* spp. in dogs, cats and horses from endemic and non-endemic regions from São Paulo State using diagnostics tests as Indirect Immunofluorescence Test (RIFI) and Polymerase Chain Reaction (PCR), and to study the efficacy of the PCR protocol on DNA extracted from ocular conjunctival swab samples from cats, dogs and horses. *Leishmania* spp. was found in dogs from Itapecerica da Serra, São Lourenço da Serra and São Paulo with frequencies of 3,12% (1/32) (swab PCR), 10%(1/10) (swab PCR) and 1,72% (02/116) (swab PC)/ 6,89% (08/116) (blood PCR) respectively. The cats samples analyzed from Pirassununga and São Lourenço da Serra were positive for *Leishmania* spp. showing frequencies of 28,57%(02/07) (swab PCR)/ 28,57%(02/07) (RIFI) and 33,33%(1/3) (RIFI) respectively. *Leishmania* spp. infected horses were detected in Bragança Paulista and Ilha Solteira cities with frequencies of 100% (14/14) (blood PCR) and 90% (36/40) (swab PCR)/ 100% (40/40) (blood PCR)/ RIFI 2,5% (01/40) respectively. Results demonstrated the presence of *Leishmania* spp infection in dogs, cats and horses from São Paulo and that is possible detect *Leishmania* spp. DNA in ocular conjunctival swab from infected cats and horses. Colect samples from ocular conjuntiva is more easily made in felines than horses, when compared to blood sample collection.

Keywords: *Leishmania* spp.. Dogs. Cats. Horses. Conjunctival swab.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem de coleta de sangue de animal da espécie canina através de punção da veia jugular – São Paulo – 2013.....	51
Figura 2 -	Imagem de coleta de sangue de animal da espécie felina através de punção da veia jugular – São Paulo – 2013.....	52
Figura 3 –	Imagem de coleta de sangue de animal da espécie equina através de punção da veia jugular – São Paulo – 2013.....	52
Figura 4 -	Imagem de coleta de suabe de conjuntiva ocular direita de animal da espécie canina – São Paulo – 2013.....	53
Figura 5 -	Imagem de coleta de suabe de conjuntiva ocular direita de animal da espécie felina – São Paulo – 2013.....	54
Figura 6 -	Imagem de coleta de suabe de conjuntiva ocular direita de animal da espécie equina – São Paulo – 2013.....	54
Figura 7 -	Figura gráfica ilustrativa representando em porcentagem os animais com resultado positivo nos testes de RIFI e PCR de sangue e de conjuntiva ocular realizados com amostras extraídas de cães das cidades de Embu das Artes, Itapequerica da Serra, São Lourenço da Serra e São Paulo– São Paulo – 2013.....	63
Figura 8 -	Imagem de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos primers 13A e 13B, obtidos pela PCR com o DNA de sangue e de suabe conjuntival de cães, gerando fragmentos de 120pb - São Paulo – 2013.....	63
Figura 9 -	Figura gráfica ilustrativa representando em porcentagem os animais com resultado positivo nos testes de RIFI e PCR de sangue e de conjuntiva ocular realizados com amostras extraídas de gatos das cidades de Embu das Artes, Itapequerica da Serra, São Lourenço da Serra e São Paulo.....	65

Figura 10 -	Imagem de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos primers 13A e 13B, obtidos pela PCR com o DNA de sangue e de suabe conjuntival de gatos, gerando fragmentos de 120pb. - São Paulo – 2013.....	65
Figura 11 -	Figura gráfica ilustrativa representando em porcentagem os animais com resultado positivo nos testes de RIFI e PCR de sangue e de conjuntiva ocular realizados com amostras extraídas de equinos das cidades de Bragança Paulista e Ilha Solteira - São Paulo – 2013.....	67
Figura 12 -	Imagem de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos primers 13A e 13B, obtidos pela PCR com o DNA de sangue e de suabe conjuntival de equinos, gerando fragmentos de 120pb - São Paulo – 2013.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Animais das espécies canina, felina e equina que tiveram amostras coletadas nos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, no estado de São Paulo – São Paulo – 2013.....	50
Tabela 2 -	Diluição de soros das espécies canina, felina e equina e dos respectivos conjugados para realização de RIFI – São Paulo - 2013	55
Tabela 3 -	Animais das espécies canina, felina e equina, com resultado positivo nas reações de PCR e RIFI, para detecção de <i>Leishmania</i> spp. nos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, no estado de São Paulo – São Paulo – 2013.....	61
Tabela 4 -	Amostras conjuntivais oculares (olho direito e esquerdo) de animais das espécies canina, felina e equina com resultado positivo nas reações de PCR para <i>Leishmania</i> spp. nos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, no estado de São Paulo – São Paulo – 2013.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses;

cnPCR: PCR Convencional;

CVE-SP- Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo;

DAT: Teste de aglutinação direta;

DDP: “Dual Path Platform” (Teste Imunocromatográfico Rápido);

EDTA: “Ethylenediaminetetracetic Acid” (Ácido Etilenodiaminotetracético);

ELISA: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio Imunoenzimático);

FeLV: Vírus da Leucemia Felina;

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina;

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana;

IMIQ: Imunoistoquímica;

ITS: “Internal Transcribed Spacer” (Espaço Interno Transcrito);

kDNA: DNA de cinetoplasto;

LC: Leishmaniose Canina;

LE: Leishmaniose Equina;

LF: Leishmaniose Felina;

LH: Leishmaniose Humana;

LT: Leishmaniose Tegumentar;

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana;

LV: Leishmaniose Visceral;

LVC: Leishmaniose Visceral Canina;

LVH: Leishmaniose Visceral Humana;

MS- Ministério da Saúde;

nPCR: “Nested PCR”(PCR em ninho);

pb: Pares de base;

PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral;

PCR: “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase);

PCR-SC: PCR de suabe conjuntival;

PCR-SG: PCR de sangue;

qPCR: PCR quantitativa em tempo real;

RBCL: “Red Blood Cell Lysis” (Tampão de Lise de Hemácia);

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta;

RPM: Rotações por minuto;

SC: Suabe conjuntival;

SDS: Sulfato Dodecil de Sódio;

TBE: Tris Borato EDTA;

TE: Tris EDTA;

URE: Uveíte Recorrente Equina;

UV: Ultravioleta;

WHO: "World Health Organization" (Organização Mundial de Saúde).

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: graus Celsius.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU TEGUMENTAR	25
2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	30
2.3 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES	35
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVOS	45
5 MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1 REGIÃO DO ESTUDO	46
5.1.1 Bragança Paulista	46
5.1.2 Embú das Artes	46
5.1.3 Ilha Solteira	47
5.1.4 Itapequerica da Serra	47
5.1.5 Pirassununga	48
5.1.6 São Lourenço da Serra	48
5.1.7 São Paulo	48
5.2 ASPECTOS ÉTICOS	49
5.3 AMOSTRAGEM	49
5.3.1 Animais	49
5.3.2 Coleta de Material Biológico	50
5.3.2.1 Coleta de sangue	50
5.3.2.2 Coleta de suabe conjuntival	53
5.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	55
5.4.1 Cães	55
5.4.2 Gatos	56
5.4.3 Equinos	57
5.5 DETECÇÃO DO DNA DE LEISHMANIA	58
5.5.1 Extração de DNA	58
5.5.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	58
5.5.2.1 Detecção de <i>Leishmania</i> spp.	58
5.5.2.2 Detecção de espécies do Complexo <i>Leishmania donovani</i>	59

5.6 ELETROFORESE	60
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
6 RESULTADOS	61
6.1 CÃES.....	62
6.2 GATOS.....	64
6.3 EQUINOS.....	66
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE	97
ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO

Segundo Michalsky et al. (2002), as leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), que apresentam diferentes graus de especificidade para o hospedeiro.

Os protozoários flagelados do gênero *Leishmania* podem estar sob as formas promastigota e amastigota, sendo que a primeira é encontrada no tubo digestivo de insetos vetores e em alguns meios de cultura artificiais e a segunda, nas células do sistema fagocitário de hospedeiros vertebrados (DUNAISKY, 2006).

São doenças endêmicas em 88 países (DESJEUX, 1996), especialmente em regiões tropicais e subtropicais, tais como o leste e sudeste da Ásia, Oriente Médio, norte e leste da África, sul da Europa (Mediterrâneo) e Américas Central e do Sul (BRASIL, 2006).

Estima-se que 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrem todo ano, enquanto que 12 milhões de pessoas no mundo estão com a doença (WHO, 2000) que ocorre em três diferentes formas: leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (SPANAKOS et al., 2008).

Apesar de ser considerada a segunda protozoonose mais importante da atualidade, a LV é negligenciada, sendo que 80% dos casos ocorrem em populações de baixa renda, que sobrevivem com menos de dois dólares por dia (DESJEUX, 2004).

Desjeux (2004) relata que em relação a infecção humana, duas entidades epidemiológicas podem ser definidas: as leishmanioses zoonóticas, onde animais domésticos ou selvagens são reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, e os seres humanos desempenham um papel como um hospedeiro acidental, e as leishmanioses antroponóticas, onde o homem é o único ou principal reservatório e fonte de infecção do vetor.

No Brasil, o agente causador da LV é a *Leishmania infantum*, enquanto que a LT pode ser causada por várias espécies de *Leishmania*, entre elas a *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania amazonensis*, pertencentes aos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana*, respectivamente. A taxa de flebotomíneos naturalmente

infectados em áreas endêmicas e a correta identificação da leishmania envolvida em determinadas espécies de flebotomíneos, são de grande importância em estudos epidemiológicos e de vetores das leishmanioses (MICHALSKY et al., 2002).

O diagnóstico das leishmanioses é um desafio, graças a grande variedade de sintomas e a grande quantidade de portadores assintomáticos. A abordagem diagnóstica das leishmanioses nas diferentes espécies animais deve ser organizada de acordo com uma sequência de diferentes procedimentos, histórico do caso, clínica, achados laboratoriais inespecíficos e os achados laboratoriais específicos, análise parasitológica, molecular e imunológica. Para o diagnóstico de animais infectados por *Leishmania* spp. pode-se fazer uso de métodos diretos ou indiretos (FERRER et al., 1988), os testes diretos detectam o parasita, e os indiretos, avaliam a resposta do sistema imunológico do hospedeiro ao parasita (GRAMICCIA, 2011).

O intenso processo de migração de populações rurais para as cidades e as alterações ambientais ocorridas nos últimos anos, juntamente com a redução da condição sócio-econômica da população brasileira, permitiram a entrada e a manutenção dos agentes etiológicos e dos vetores das leishmanioses em áreas não endêmicas, o que leva os animais de companhia de diversos territórios a enfrentarem novos riscos de infecção (SILVA et al., 2001). Dessa forma, torna-se imprescindível que os veterinários clínicos, principalmente os de regiões não endêmicas, mantenham-se informados sobre as características das formas clínica e subclínica das leishmanioses, bem como dos testes diagnósticos disponíveis, suas indicações e limitações (GRAMICCIA, 2011).

As áreas de ocorrência de certas doenças transmitidas por vetores, tais como babesiose, hepatozoonose, erliquiose, leishmaniose e dirofilariose estão se estendendo cada vez mais, devido a mudanças ecológicas e climáticas, e reforçada por animais que após visitas à áreas endêmicas, voltam ao seu local de residência com infecção subclínica (IRWIN, 2002).

Cada vez mais, devido às proporções mundiais ocupadas pelas leishmanioses, torna-se urgente a necessidade de desenvolvimento e validação de novos testes diagnósticos, que visem manter as características ideais de especificidade, sensibilidade e confiabilidade e também a praticidade no momento da coleta, tornando-se facilmente aplicável nos inquéritos epidemiológicos, menos desgastante na rotina dos veterinários clínicos e menos estressante para os animais e seus proprietários.

O presente estudo objetivou verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos procedentes de regiões endêmicas e não endêmicas do estado de São Paulo, por meio dos testes diagnósticos Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) e objetivou também comprovar a eficácia da PCR realizada com DNA extraído de amostras de suabe da conjuntiva ocular de cães, gatos e equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são definidas como infecções parasitárias que envolvem animais e seres humanos, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987), que constituem um problema global de saúde pública, especialmente em países tropicais e subtropicais (MARCUSI, 2013) e representam um complexo de doenças com grande importância clínica e epidemiológica (BRASIL, 2007), sendo consideradas algumas das mais importantes zoonoses no mundo (WHO, 2013).

Cerca de 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV e 0,7 a 1.2 milhões de casos de LT, ocorrem a cada ano no mundo, sendo que mais de 90 % dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil, enquanto que para a leishmaniose tegumentar americana (LTA) os dez países com a maior quantidade de casos estimados são o Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, que juntos, correspondem a 70 a 75 % da incidência mundial de LT estimada (ALVAR et al, 2012). Sendo considerada endêmica em 88 países (WHO, 2013).

Segundo Laison e Shaw (1998) na América Latina, as espécies de *Leishmania* pertencem a dois diferentes grupos taxonômicos. As do sub-gênero *Leishmania*, composto por *L. mexicana* e *L. amazonensis*, responsáveis por causar a forma cutânea localizada ou difusa da doença e *L. infatum*, causadora da forma viscerotrópica no Novo Mundo, e um segundo grupo do sub-gênero Viannia, composto por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, causadores de lesões mucocutâneas.

As manifestações clínicas destas doenças são variáveis e estão relacionadas com as de diferentes espécies de *Leishmania* e também a resposta imunitária do hospedeiro (WHO, 2010).

Em seres humanos, as leishmanioses podem se manifestar na forma cutânea, através de severas lesões de tegumento e na forma visceral, como consequência da resposta imunológica do hospedeiro (LAINSON; SHAW, 1998).

Segundo Schlein (1993) os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico heteroxênico, ou seja, necessitam de dois hospedeiros, um vertebrado,

representado por canídeos silvestres e domésticos, além de roedores e humanos, e outro invertebrado, representado pelo inseto vetor.

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, que pertencem a Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie nas Américas (REY, 2001) e do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (DESJEUX, 1996). No Brasil, dependendo da localização geográfica são conhecidos através dos nomes populares, mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2007).

Várias espécies de flebotomíneos hematófagos pertencentes à ordem Diptera e ao gênero *Lutzomyia* são transmissoras das leishmanioses na América e mudam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, assim como os reservatórios (FUNASA, 2002).

Segundo Miranda et al. (1998) os vetores das diferentes espécies de leishmania, também são apontados como possíveis vetores biológicos e mecânicos de vírus, bactérias e outros protozoários.

Os flebotomíneos possuem diferentes hábitos alimentares que variam de acordo com o sexo. Os machos se alimentam de substâncias açucaradas de excreção de afídeos, e as fêmeas de substâncias açucaradas provenientes da seiva de vegetais, e também de sangue de vários animais, o que as tornam responsáveis pela transmissão das leishmanioses (MARCONDES, 2001), são mosquitos de aproximadamente 2 a 3 mm, que possuem hábitos peridomésticos e intradomiciliares e fazem seu ciclo larvar em matéria orgânica úmida, o que dificulta seu combate (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Segundo REY (2001), os flebotomíneos, quando se alimentam em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerem as formas amastigotas da leishmania, presentes no interior dos macrófagos, que passam a ser promastigotas no tubo digestivo anterior do inseto vetor. As formas promastigotas aderem à parede intestinal e se multiplicam, e em poucos dias o intestino anterior fica repleto destas.

Durante um novo repasto sanguíneo, o flebótomo pode infectar a pele do hospedeiro vertebrado através o regurgitamento das formas promastigotas, que são então fagocitadas pela pele do mesmo e perdem o flagelo, multiplicando-se em amastigotas no interior dessas células (REY, 2001).

Missawa et al. (2008) buscaram determinar a preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* e sua relação com a transmissão da leishmaniose visceral

(LV) através de estudos realizados no município de Várzea Grande, Estado de Mato Grosso, observaram que as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentaram-se preferencialmente em aves (30,8%) e roedores (21,2%), entretanto foram encontradas fêmeas alimentadas de sangue de humanos, gambás, bois, cavalos e cães, o que demonstra o caráter oportunista da espécie.

2.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA OU TEGUMENTAR

A LTA é uma doença infecciosa, que acomete pele e mucosas, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (BRASIL, 2007), que ocorre desde o sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, sendo que no Brasil, segundo informações da World Health Organization (WHO), (1990) existe ocorrência em todos os estados na forma autóctone. Está presente no Novo Mundo, com elevado número de casos humanos, particularmente no Peru e no Brasil (DESJEUX, 2001).

Segundo Lainson (2010), a leishmaniose tegumentar americana (LTA) parece ser uma doença antiga, que em áreas tropicais e subtropicais do Novo Mundo afetava seres humanos. Sua existência pode ser relatada através de antigas peças de cerâmica originárias do Peru e Equador (*huacos*) que retratavam deformações faciais graves em humanos, muito parecidas com as causadas pela leishmaniose muco-cutânea, e informações de que historiadores da época da colonização ibérica relatavam, com frequência, lesões cutâneas nos habitantes nativos.

Com o passar do tempo, ficou claro que as lesões cutâneas chamadas de *uta* pelos índios peruanos, e a doença muco-cutânea conhecida como espundia, eram disseminadas pela maior parte do continente latino americano, onde receberam diferentes denominações e eram divididas em lesões menos destrutivas conhecidas como *uta seco*, *úlcera de Velez*, *ulcer de los chicleros*, *buba*, *úlcera de Baurú*, *ferida brava*, *botão do oriente*, *forest yaws*, *Baysore*, *pian-bois* e *bosch-yaws*; e em lesões mais destrutivas conhecidas como *espundia*, *llaga corrosiva*, *cancro espúndico*, *nariz de tapir*, *tiacaraña*, *gangosa*, *ferida esponjosa*, e *cancro fagendênico*, porém a etiologia de ambos tipos de lesão permaneceu desconhecida por muito tempo (LAINSON, 2010).

São verificados 25.000 casos por ano, e um aumento na incidência da doença associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido reportada em todas as regiões do Brasil, não estando restritos apenas a regiões endêmicas (BRASIL, 2007).

Segundo dados do CVE-SP (2013), 994 casos de LTA humana foram confirmados no estado de São Paulo, de 2010 a Abril de 2013.

No Brasil, seis espécies pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* podem ser descritos como causadores da LTA, entre eles a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (PASSOS et al, 1999), protozoários impossíveis de se distinguir morfologicamente, mas que podem ser diferenciados por anticorpos monoclonais (SHAW et al., 1986), métodos moleculares (DEGRAVE et al., 1994) e análise de isoenzimas (FIGUEIRA et al., 2008).

Nas Américas, os principais reservatórios de *Leishmania* dentre os mamíferos são os roedores, gambás, endentados, caninos, primatas e equinos, porém nos últimos anos, tem-se aberto discussões sobre o papel do gato doméstico como hospedeiro de *Leishmania*, devido à verificação de felinos infectados nos últimos anos (DUARTE et al., 2010).

Segundo Brandão-Filho et al. (2003), em várias regiões endêmicas no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, de assentamentos antigos ou onde ocorreu desmatamento pesado, relatos de lesões de pele associadas a *Leishmania* em animais domésticos como cães e cavalos, tornaram-se relativamente frequentes, e os parasitas foram identificados como *L. (V.) braziliensis lato sensu*.

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, já foi isolada de roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*) em Pernambuco, no Rio de Janeiro em felídeos (*Felis catus*), no Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo em canídeos (*Canis familiaris*), e em equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) nos estados do Ceará, Bahia e Rio de Janeiro (BRASIL, 2007).

No estado do Espírito Santo, através dos estudos de Falqueto et al. (1986), foi comprovada a relação entre cães infectados com leishmaniose tegumentar (LT) e o surgimento de novos casos em seres humanos, o que sugeriu que a doença se comportou como zoonose e manteve-se através destes animais.

Em 1993, no povoado rural de Canoa, município de Santo Amaro, no estado da Bahia, ocorreu um surto de LTA e através dos inquéritos sorológicos em caninos

e equídeos realizados, revelou-se a participação destes no ciclo da doença, embora ainda sejam necessários estudos mais específicos (FOLADOR et al., 1999). O mesmo aconteceu no município de Paracambi, estado do Rio de Janeiro, onde através de inquérito realizado em áreas endêmicas, rural e semi-urbana, foi comprovada a associação entre a presença das formas clínica e subclínica da LTA na população canina e a infecção humana, e sugerida a atuação do cão como possível fonte de infecção (SANTOS et al., 2005).

Ao longo dos últimos 20 anos, características clínicas associadas com a infecção por *Leishmania* foram elucidadas, e as espécies foram identificadas corretamente através de métodos bioquímicos e/ou moleculares. Cinco espécies de *Leishmania* foram identificadas nos casos em felinos: *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo, e *L. infantum*, no Novo Mundo e no Velho Mundo (PENNISI, 2010).

A leishmaniose em gatos domésticos (*Felis catus*) tem sido relatada em várias regiões do mundo, mas seu papel como reservatórios ainda não está bem elucidado. Os seguintes agentes etiológicos foram relacionados à LT em gatos: *Leishmania* (V.) spp. (PASSOS et al., 1996) no Brasil, *Leishmania* (L.) *amazonensis* (SCHUBACH et al., 2004) no Brasil, *Leishmania* (V.) *braziliensis* (SCHUBACH et al., 2004; DE SOUZA et al., 2005) no Brasil e *Leishmania* (V.) *braziliensis* (ROUGERON et al., 2011) na Guiana Francesa.

Nos felinos a leishmaniose cutânea é a forma mais frequentemente encontrada e já foi descrita no Brasil e em outros países (SIMÕES-MATTOS et al., 2005).

No estudo elaborado por Duarte et al. (2010), após 20 dias da realização da inoculação em camundongos, de uma amostra de *L. (L.) amazonensis* previamente isolada de um gato infectado, livre de doenças imunossupressoras, foi demonstrada a alta e rápida infectividade, através do intenso parasitismo e do infiltrado inflamatório da amostra. Não foram encontrados sinais de visceralização, uma vez que não foram observados parasitos no fígado e no baço dos animais.

Acredita-se que o gato não está com sua participação na epidemiologia das leishmanioses bem elucidada, devido a ausência de estudos baseados no xenodiagnóstico (MANCIANTI, 2004). Para se avaliar a existência de um ciclo de transmissão de leishmanioses envolvendo os gatos, são necessários estudos para

se comprovar que estes são capazes de transmitir o parasita para o vetor na natureza (MAIA et al., 2010).

Simões-Mattos et al. (2005) sugerem que o gato doméstico apresente um alto grau de resistência natural ao parasito, conforme observado em infecções experimentais. Entretanto, a resistência do gato à leishmaniose pode depender também de fatores genéticos não relacionados à resposta celular (MANCIANTI, 2004). Gatos infectados por *Leishmania* e pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou vírus da leucemia felina (FeLV) concomitantemente, comprovaram que tanto os agentes virais quanto o estresse, podem induzir danos à resposta imunológica mediada por células (GREVOT et al., 2005).

As informações em relação às leishmanioses envolvendo os felinos vêm aumentando, mas ainda existem muitas questões que devem ser respondidas através de novos estudos, principalmente em relação patogenia e ao real papel do gato como reservatório de *Leishmania* spp. (PENNISIA; SOLANO-GALLEGO, 2013).

Em equídeos domésticos, a leishmaniose foi primeiramente relatada por Mazza (1927) em um cavalo na Argentina, e, no Brasil, por Alencar (1959) em um jumento no estado do Ceará, desde então vários relatos vem sendo descritos em diversos estados do Brasil: no da Bahia (VEXENAT et al., 1986; FOLLADOR et al., 1999), no Rio de Janeiro (AGUILAR et al., 1986; AGUILAR et al., 1987; OLIVEIRA-NETO et al., 1988) no Espírito Santo (FALQUETO et al., 1987), em Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), em São Paulo (YOSHIDA et al., 1990), no Paraná (VEDOVELLO-FILHO et al., 2008) e mais recentemente em Minas Gerais (SOARES et al., 2013). Quando as investigações foram possíveis, nos casos brasileiros supracitados, o parasita identificado foi sempre *Leishmania braziliensis* (SOARES et al., 2013).

Em seres humanos, a LTA pode se apresentar em quatro formas diferentes, a infecção aparente, a leishmaniose linfonoidal, a leishmaniose cutânea e a mucosa ou mucocutânea, entretanto a forma clássica da doença se manifesta através de diferentes sintomas clínicos sob duas formas: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose mucosa, também conhecida como mucocutânea (BRASIL, 2007).

Na LT humana ocorre a presença de lesões exclusivamente na pele, iniciadas no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras. Geralmente as lesões primárias são únicas, mas também podem ser múltiplas, devido a várias

picadas do vetor ou a disseminação local (MARZOCHI, 1992). A leishmaniose mucosa ou mucocutânea causa lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores, sua forma clássica é secundária a lesão cutânea (BRASIL, 2007).

A sintomatologia da LT nos cães é caracterizada pela existência de úlceras cutâneas sugestivas, que podem se apresentar de forma única ou eventualmente múltipla, com localização nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal. O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras doenças causadoras de úlceras como neoplasias, piodermites e micoses (BRASIL, 2007).

Segundo Petersen (2009) as manifestações cutâneas por leishmanias em gatos são bem semelhantes as dos cães, traduzindo-se inicialmente como uma única pápula, que, depois aumenta de tamanho, tornando-se um nódulo ou uma lesão com bordas elevadas que pode ainda se transformar em ulcerativa.

Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem lesões nodulares ou ulceradas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras e alopecia, geralmente os gatos infectados apresentam envolvimento dos linfonodos e do sangue, o que indica a disseminação de *Leishmania* nos hospedeiros felinos (MANCIANTI, 2004).

Ramos-Vara et al. (1996), em seu relato de caso, verificaram que as características das lesões de pele nos dois equinos, corroboram com as observações de outros estudos, que descreveram como locais comuns das lesões a cabeça, envolvendo orelhas, olhos e focinho, o escroto, os membros e o pescoço e que nos cortes histológicos apresentam-se um grande número de parasitas.

As epidemias causadas por *L. braziliensis* foram descritas em asnos (*Equus asinus*), e esporadicamente em cavalos (*Equus caballus*) e mulas (*Equus asinus* x *Equus caballus*), onde os sinais clínicos observados foram lesões cutâneas ulceradas ou nodulares, ocasionalmente disseminadas, sem ocorrência de visceralização, que em alguns casos apresentaram regressão espontânea (ROLÃO et al., 2005).

A leishmaniose cutânea em equinos deve ser considerada como diagnóstico diferencial para qualquer lesão papulonodular ou ulcerada, especialmente quando são verificadas na região da cabeça e orelhas e quando não respondem a terapia com antibióticos ou antifúngicos (RAMOS-VARA et al., 1996).

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

Segundo LAINSON (2010), a origem da leishmaniose visceral americana (LVA) pode ser tão antiga quanto da LT na América Latina, apesar de oferecer menor quantidade de evidências visuais externas de sua existência. No Brasil, entretanto, uma enfermidade conhecida como *barriga d'água*, caracterizada por uma dilatação anormal do abdômen, associada a episódios de febre e mal estar, era muito conhecida, e provavelmente boa parte de suas ocorrências foram casos não diagnosticados de leishmaniose visceral.

A LV ocorre na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas, onde é conhecida como LVA ou calazar neo-tropical. Já foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina, sendo o Brasil responsável por 90% dos casos, que ocorrem principalmente na Região Nordeste (BRASIL, 2006).

No Brasil, a LV tem sido verificada como infecção oportunista em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), semelhante ao que ocorre no sul da Europa (BRASIL, 2011). Devido a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus HIV, o que a torna uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2006).

Em algumas regiões do Sudeste europeu e na região Nordeste brasileira, a prevalência da leishmaniose canina (LC) chega a 40% (CAMPINO, 2002). No estado de São Paulo, a doença encontra-se em expansão e já foi detectada em 55 municípios paulistas (CAMARGO-NEVES et al., 2007).

No Brasil, nos últimos dez anos, aconteceram uma média de 3.156 casos de LV humana por ano, com incidência de dois casos para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2006). Segundo dados do CVE-SP, 634 casos de LV humana foram confirmados, no estado de São Paulo, de 2010 a Abril de 2013.

As espécies causadoras de LV na África, Europa e Ásia são a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum* (MICHALICK; GENARO, 2005). No Brasil, a espécie responsável pela forma visceral, ou LV é a *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (KUHLS et al., 2011).

A LV, causada por *Leishmania infantum*, é um problema de saúde veterinária e pública na Bacia do Mediterrâneo, América Central e do Sul e no Oriente Médio, sendo os canídeos os principais reservatórios (ROSA et al., 2005).

Animais são infectados com leishmanias de diferentes espécies, mas *L. infantum* é a mais difundida entre os cães domésticos, principais reservatórios da LV. Os cães são muito suscetíveis a este parasita e podem apresentar uma síndrome complexa e fatal. Nas outras espécies, como os gatos e equinos, também existem relatos de infecções, em áreas onde a LC é diagnosticada. Os gatos podem apresentar a síndrome de leishmaniose felina (LF), bem menos grave se comparada a canina, enquanto que os equinos domésticos ocasionalmente podem manifestar a doença através de lesões cutâneas únicas ou múltiplas, e provavelmente representam um hospedeiro acidental da doença (GRAMICCIA, 2011).

Em estudo realizado por Coutinho et al. (2005), foi relatado que carrapatos *R. sanguineus* foram considerados como um vetor alternativo para a transmissão de *L. chagasi* entre cães. A taxa de infecção produzida por infecções orais foi de 5,9 a 29,4%, e indicou que a ingestão de carrapatos ou de seu conteúdo intestinal e o hábito de lamber feridas, pode representar uma forma importante de infecção por *L. chagasi*. De Moraes et al. (2013) em um trabalho com 117 ectoparasitas de cães provenientes de áreas rurais de Pernambuco, fizeram uso da PCR convencional e PCR em tempo real, para verificar a infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* e tiveram como resultado uma frequência de 43,60 % de ectoparasitas positivos.

A *Leishmania infantum* tem um tropismo pelo sistema genital masculino, em particular pelo epidídimo, prepúcio e glândula do pênis, resultando em derramamento de leishmania no sêmen, tal fato levou Silva et al. (2009) a verificar a possibilidade de transmissão venérea deste protozoário. Dados obtidos com a técnica de PCR de ejaculados coletados em série, indicaram que a eliminação de leishmania no sêmen é intermitente, sendo que no final do experimento (165 dias após a última cópula) três cadelas se tornaram soropositivas e seis positivas pela PCR, o que levou-os a concluir que a *L. infantum* pode ser sexualmente transmitida para cadelas, a partir de machos naturalmente infectados, na ausência do inseto vetor.

Segundo Arias et al. (1996), o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico no ambiente doméstico, sendo considerado de grande importância na manutenção do ciclo da LV.

Comparados com os seres humanos, os cães parecem ser mais suscetíveis a infecção por *Leishmania infantum* e desenvolvem doença grave com maior frequência (GRAMICCIA, 2011).

Assim como acontece em humanos, as infecções assintomáticas podem também ser identificadas em cães, que apresentam qualquer fase da doença antes da progressão crônica, ou formas resistentes que eventualmente, podem se recuperar de maneira espontânea. A infecciosidade do vetor flebotomíneo tende a ser associada com a progressão da doença. Entretanto, cães assintomáticos com sorologia positiva podem ser tão infecciosos como os sintomáticos, além disso, cães doentes mesmo que tratados repetidamente com medicamentos leishmanicidas mantêm um elevado potencial de infecciosidade (GRADONI et al., 1987; MICHALSKY et al., 2007.). O número de portadores assintomáticos varia de 25% até mais de 80%, dependendo da área geográfica e da técnica de detecção utilizada. (PAPADOPOULOS et al., 2005; QUEIROZ et al., 2009).

Os cães podem ser infectados pela *Leishmania* em qualquer idade, mas a prevalência da infecção mostra uma distribuição em duas fases, sendo um primeiro pico em cães com menos de 3 anos de idade e um segundo, em cães 8-10 anos de idade (PALTRINIERI et al., 2010).

A leishmaniose em gatos foi relatada pela primeira vez em 1912, na Argélia. A infecção em gatos por *Leishmania infantum* foi relatada em vários países onde esta zoonose é endêmica: Espanha, França, Itália e Brasil (OZON et al., 1998; PENNISI, 2002; POLI et al., 2002; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

A primeira descrição da infecção por *L. infantum* em gatos na América Latina, foi realizada por Savani et al. (2004), quando relataram o primeiro caso em um gato doméstico naturalmente infectado no Brasil. O referido animal era proveniente da cidade de Cotia, localizada no estado de São Paulo. Após esse relato de caso, novos relatos de LV em gatos surgiram, no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2008) e em Andradina, estado de São Paulo (COELHO et al., 2010).

Estudos realizados sugerem que o gato atua como um habitual e bom reservatório de *Leishmania infantum*, e que apesar do fato desses animais ainda não terem seu papel epidemiológico totalmente esclarecido, indicam a importância de considerar a leishmaniose como diagnóstico diferencial de patologias felinas em gatos provenientes de áreas endêmicas (MAIA; NUNES; CAMPINO, 2008),

A soroprevalência da infecção foi estimada em populações de felinos do sul da Europa, que apresentaram títulos de anticorpos geralmente menores do que em casos de leishmaniose canina, a soroprevalência variou 0,9 a 68,0% em diferentes áreas endêmicas (POLI et al., 2002; MAROLI et al., 2007).

De acordo com BRASIL (2006), os cães portadores de LV podem ser classificados em assintomáticos, caracterizados pela ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*, oligossintomáticos, animais que apresentam adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco e os sintomáticos que representam os indivíduos que possuem todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas, alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose, onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores.

Os sinais clínicos da LV em cães mais comumente encontrados, são as alterações cutâneas, como pelame seco, prurido, alopecia, áreas de hiperqueratose e nódulos intradérmicos. São observados ainda, apatia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, onicogrifose, emaciação, anemia, além de sinais oculares e emagrecimento (FEITOSA et al., 2000). Entretanto, uma grande variedade de sinais clínicos e de lesões podem ser detectadas durante o exame físico dos animais (PALTRINIERI et al., 2010).

Os gatos podem apresentar a síndrome da LF, menos grave em comparação com a que ocorre nos cães. Casos com sintomas clínicos envolvendo as formas cutâneas polimórficas foram frequentemente descritos, enquanto que os que envolvidos na doença sistêmica, com o comprometimento do fígado, do baço, de linfonodos e dos rins foram relatados com menor frequência (GRAMICCIA, 2011). A evidência que ocorre transmissão de parasitas felinos para um vetor comprovado, foi relatada por Maroli et al. (2007) e por Da Silva et al. (2010), na Itália e no Brasil respectivamente, sugerindo que os gatos podem representar um hospedeiro reservatório secundário para *L. infantum*.

Os gatos domésticos podem ser infectados por várias espécies de *Leishmania*, podendo ou não adoecer, mas são passíveis de abrigar os protozoários e serem atraentes para alguns flebotomíneos, e participar manutenção do ciclo doméstico. Apesar do aumento do número de casos de LF no mundo, acredita-se que gatos ainda estão sub-diagnosticados, possivelmente devido às dificuldades em distinguir a leishmaniose de outras doenças que afetam esses hospedeiros e ao fato

da possibilidade de gatos infectados possuírem um certo grau de resistência natural à enfermidade, provavelmente relacionada a fatores genéticos (MANCIANTI, 2004; VITA et al., 2005).

A infecção por *Leishmania infantum* em gatos possui como manifestações clínicas frequentes, lesões na pele (principalmente dermatite ulcerativa ou nodular) e linfadenomegalia, hiperglobulinemia e outras anormalidades também podem ser verificadas. Associações da infecção por *L. infantum* com doenças causadas pelos Vírus da FIV e da FeLV são comuns (PENNISIA; SOLANO-GALLEGO, 2013). Pennisi et al. (2013) através do estudo de 24 casos clínicos confirmados de infecção por *L. infantum* na Itália, observaram que o diagnóstico ocorre principalmente em gatos mais velhos, errantes, com linfadenomegalia e com co-infecção por FIV, em sua maioria.

Vides et al. (2011), concluíram através de seu estudo, que lesões dermatológicas em gatos provenientes de áreas endêmicas, foram altamente associadas à LV e, portanto em pacientes dermatológicos de tais áreas deve-se sempre fazer o diagnóstico diferencial para LV.

Equinos domésticos sofrem ocasionalmente de lesões cutâneas únicas ou múltiplas, mas provavelmente, representam um hospedeiro acidental da doença (GRAMICCIA, 2011).

Nos últimos anos, cinco casos de leishmaniose equina (LE) causados pela *Leishmania infantum*, foram confirmados na Europa (KOEHLER et al., 2002; SOLANO- GALLEGO et al., 2003; GRAMICCIA; GRADONI, 2005; ROLÃO et al., 2005). As infecções foram do tipo cutânea com lesões nodulares ou ulceradas, isoladas ou difusas, que aparentemente apresentavam auto-cura sem qualquer terapia (GRAMICCIA, 2011). No Brasil, o primeiro relato de caso de infecção por *Leishmania infantum* em equinos (*Equus caballus*) nas Américas, foi descrito por Soares et al. (2013).

Os casos descritos na Alemanha (KOEHLER et al., 2002), na Espanha (SOLANO-GALLEGO et al., 2003) e em Portugal (ROLÃO et al., 2005) apresentaram semelhanças: a restrita localização da doença na pele e a raridade da LV em cavalos de áreas endêmicas (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006) ou na ausência de anticorpos leishmania específicos apresentados por animais infectados, o que sugeriu que a LT é a única forma clínica em cavalos e argumentou contra um acometimento visceral (KOEHLER et al., 2002), entretanto Rolão et al. (2005)

detectou anticorpos anti-*Leishmania* e sugeriu um envolvimento visceral concomitante.

2.3 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

Em cães, a leishmaniose pode ser confirmada em animais com sinais clínicos evidentes, pela citologia, sorologia ou ensaios moleculares. Entretanto, em casos suspeitos de cães com histórico de exposição à *Leishmania* e nenhum ou poucos sinais clínicos sugestivos de LC a primeira abordagem diagnóstica deve incluir a análise citológica de tecidos lesados e o ensaio específico sorológico quantitativo. Dependendo dos resultados, testes mais sensíveis e específicos podem ser aplicados (OLIVA et al., 2006).

Através dos exames parasitológicos, podem ser observadas formas amastigotas em esfregaços de linfonodo, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos corados com corantes Giemsa, Wright e Panótico (BRASIL, 2003). Existem técnicas imunoistoquímicas que aumentam a sensibilidade e a especificidade das técnicas parasitológicas (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004).

Tasca et al. (2009), relataram que através da detecção microscópica direta do parasita e de exames histopatológicos, o baço mostrou-se como um órgão útil no auxílio do diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC).

As provas sorológicas também são bastante utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose, destacando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A RIFI tem as vantagens de possuir fácil execução, rapidez, baixo custo, e sensibilidade e especificidade adequadas, quando comparada a outras técnicas (ALVES; BEVILACQUA, 2004), enquanto que o ELISA tem sua sensibilidade e especificidade dependentes do tipo de antígeno empregado e de mudanças no protocolo experimental padrão (REITHINGER et al., 2002).

Na RIFI, frequentemente ocorrem reações cruzadas, principalmente com outros tripanossomatídeos (FERREIRA; AVILA, 2001). Outros trabalhos apresentaram resultados que indicam a presença de reações cruzadas com

Trypanosoma cruzi e *Leishmania braziliensis* (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996), entretanto Macianti, Pedonese e Poli (1996), relataram em seu trabalho a não ocorrência de deste tipo de reação na técnica supracitada.

Oliveira et al. (2008) conseguiram através de suas pesquisas demonstrar a inexistência de reatividade cruzada de soros de cães positivos para *Leishmania infantum* com antígenos de *Ehrlichia canis* e de *Babesia canis* pelo ELISA e pela RIFI, mostrando que a coinfeção em cães é um achado frequente em áreas endêmicas para a LVC.

Até recentemente os testes sorológicos RIFI e ELISA, eram as técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da LVC em inquérito epidemiológico canino. Para triagem da infecção era utilizado o ELISA, e nas investigações de foco ou quando se desejava confirmar as amostras positivas detectadas pelo ELISA, era utilizada a RIFI (SÃO PAULO, 2006). Porém os resultados destes testes, utilizados até então como critério para a eutanásia dos animais sororeagentes, apresentam reação cruzada com *Trypanosoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996).

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda para triagem o teste sorodiagnóstico imunocromatográfico DPP. Grimaldi Jr. et al. (2012) através de seu trabalho, verificaram que este teste apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães assintomáticos para LVC. Silva et al. (2013), sugerem frente aos resultados obtidos em seu estudo, que o ensaio imunocromatográfico pode ser uma boa alternativa, uma vez que proporciona um diagnóstico rápido e simples, sem a necessidade da participação de um laboratório especializado.

Bisugo et al. (2007), através do estudo do desempenho do teste rápido imunocromatográfico formato *dipstick*, empregando antígeno recombinante K39 (rK39), em amostras de sangue total e soro de cães de municípios paulistas onde a LV ocorre de forma autóctone, verificaram que o teste rápido, realizado em amostras de soro, apresenta-se como um ensaio simples, rápido, de baixo custo, e adequado para ser utilizado como uma técnica alternativa de triagem diagnóstica, devido a sua especificidade para as espécies do complexo *Leishmania donovani*, responsáveis pela LV.

Dantas-Torres et al. (2010), ressaltou que a utilização de RIFI em áreas onde estão presentes *L. infantum* e *L. braziliensis* deveria ser banida, a fim de evitar a

eutanásia desnecessária de cães que sejam realmente infectados apenas por *L. braziliensis*.

O teste de ELISA é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (EVANS et al., 1990). Mettler et al. (2005) e Queiroz et al. (2010) demonstraram em seus trabalhos que a RIFI também apresenta baixa sensibilidade na detecção de animais assintomáticos. Segundo Leontides et al. (2002), a sensibilidade da detecção de anticorpos é geralmente baixa em infecções recentes e animais assintomáticos.

Freitas et al. (2012), demonstraram que cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* apresentam títulos elevados de IgE, IgA e de IgG2 anti-*Leishmania* e indicaram que os níveis séricos de IgG2 anti-*Leishmania* estão correlacionados com sinais clínicos típicos da doença e níveis séricos de IgE anti-*Leishmania* não se correlacionam com a progressão da doença. Oliveira et al. (2009) observaram maiores títulos de IgG2 em animais assintomáticos. Porém, mais estudos são necessários para demonstrar que a determinação de anticorpos anti-*Leishmania* específicos, trata-se de uma maneira importante de prever o curso clínico da LV.

Queiroz et al. (2009), avaliaram as técnicas de imunoistoquímica (IMIQ) e de PCR em tecidos cutâneos para o diagnóstico da LVC e compararam com os exames parasitológicos em tecidos corados histoquimicamente (hematoxilina-eosina, HE) e com os testes sorológicos RIFI e ELISA. A eficiência dos testes variou de acordo com a evolução da doença e demonstrou a necessidade da associação das técnicas usando-se IMIQ para confirmação da sorologia e a PCR apenas nos casos suspeitos após a IMIQ para gerar um aumento nos níveis de positividade e contribuir para o controle da LVC.

A associação de técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de um maior número de cães positivos para LVC em diferentes áreas endêmicas (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

As técnicas moleculares têm sido utilizadas para a confirmação de diagnóstico, a identificação da *Leishmania* ou para detecção de portadores assintomáticos (GRAMICCIA, 2011). Investigações epidemiológicas utilizando técnicas moleculares têm demonstrado que a prevalência da infecção é muito

superior a observada anteriormente pelas técnicas sorológicas (REALE et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

O método molecular mais empregado nos estudos envolvendo leishmania, é a detecção de DNA pela reação de PCR, que permite a amplificação seletiva de sequências do DNA do parasito, tornando-se um instrumento diagnóstico espécie-específico (DEGRAVE et al., 1994).

Os protozoários da ordem Kinetoplastida, possuem além do DNA nuclear o DNA mitocondrial, conhecido como cinetoplasto, que é composto por uma rede de moléculas de DNA circulares que são divididas em maxicírculos e em minicírculos. Os maxicírculos estão presentes na quantidade de 20 a 250 cópias por cada cinetoplasto, enquanto que os minicírculos apresentam-se com aproximadamente 10.000 cópias para cada cinetoplasto (CORTES et al., 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2009).

Para a identificação e detecção de *Leishmania* spp. podem ser utilizados vários marcadores, entre eles o DNA extra celular, como os minicírculos de kinetoplasto (kDNA) (RODGERS et al., 1990; RAVEL et al., 1995; REALE et al., 1999; MAHBOUD et al., 2002; VOLPINI et al., 2004; PENNISI et al., 2005). O DNA alvo mais empregado são as sequências de minicírculo do kinetoplasto (kDNA) (MANNA et al., 2004). Comparando seis métodos de PCR utilizando amostras de sangue periférico de cães para detectar LVC, onde três dos métodos utilizaram iniciadores endereçados para o DNA genômico e os outros três para o kDNA, foi demonstrado que os métodos com melhor desempenho utilizaram como alvo o kDNA (LACHAUD et al., 2002). A PCR com esses marcadores mostrou-se muito sensível na detecção de casos iniciais de leishmaniose (DEGRAVE et al., 1994; REY, 2001).

A PCR, atualmente é utilizada apenas em pesquisas e elucidação de casos inconclusivos da doença, principalmente em novos focos. Apesar de possuir grande sensibilidade ainda não é aplicada nos programas de controle da LVC (GOMES et al., 2007).

Cavalcanti, Silva e Gomes (2010) comparando a PCR convencional (cnPCR) e a PCR em tempo real (qPCR), relatam que ambos os métodos apresentam características interessantes para o diagnóstico da LV, tendo como benefícios da qPCR em relação a cnPCR, a velocidade, reprodutibilidade e capacidade

quantitativa, além de ser mais sensível e reprodutível e poder substituir o cnPCR em rotinas de diagnóstico.

A possibilidade de implantação de qPCR em diagnósticos de alta complexidade em áreas endêmicas de leishmaniose facilitaria um retorno rápido e seguro para os pacientes (CAVALCANTI; SILVA; GOMES, 2010)

Pinto (2004), através de seu trabalho, realizado em Capão Bonito, município do estado de São Paulo, concluiu que a infecção por *Leishmania* spp. ocorre em cães da região e pode ser detectada através de diagnóstico sorológico (RIFI) e molecular (Nested-PCR).

Cortes et al. (2004) testaram a eficácia da PCR para diagnosticar LC e leishmaniose humana (LH) causadas por *Leishmania infantum*, através do uso de novos primers, baseados na sequência completa de DNA dos minicírculos de kinetoplasto e verificaram que os primers foram altamente específicos detectando somente DNA de *L. donovani*, mesmo quando outras espécies de leishmania, outros tripanosomatídeos e ainda outros microorganismos patogênicos estavam envolvidos. A PCR com a utilização destes iniciadores específicos mostrou-se sensível na detecção de DNA do parasita em amostras biológicas de três regiões geográficas diferentes de Portugal (norte, centro e sul) e do Brasil.

Reale et al. (1999), utilizaram a técnica de RIFI e de PCR com os iniciadores 13A e 13B para o diagnóstico de leishmaniose em cães sorologicamente positivos e sorologicamente negativos a partir de aspirados de linfonodos e de amostras de sangue e observou que 40% dos animais sem sinais clínicos e 38% dos animais com sinais clínicos apresentaram resultados falso-negativos pela RIFI, tal fato os levou a concluir que somente os dados sorológicos não são suficientes para fazer o diagnóstico correto das leishmanioses e que o uso da PCR poderia ajudar a revelar novos casos de infecção em cães.

Oliveira et al. (2013), relataram através de seu trabalho que os primers 13 A e 13B, L1 e L2 e MC1 e MC2, utilizados em PCR convencional foram capazes de detectar *Leishmania* spp e *Leishmania infantum* no suabe de conjuntiva de cães, sendo úteis para estudos epidemiológicos e no diagnóstico direto da LVC.

A PCR tem apresentado bons resultados quando comparado a outros testes diagnósticos diretos, e principalmente quando é utilizado em amostras com baixa quantidade do parasita, como o sangue (GARCIA et al., 2005) e células conjuntivais (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Outros autores, que utilizaram-se de amostras de

suabe de conjuntiva ocular com sucesso, para o diagnóstico da LVC, demonstraram que é um método sensível e prático para coleta de amostras que permite um diagnóstico consistente através da PCR convencional (LEITE et al., 2011; PEREIRA, 2013).

A PCR tem sido bastante utilizada para o diagnóstico da LVC (MANNA et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; NUNES et al., 2007). Para a PCR pode-se utilizar DNA extraído de medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados e também do vetor (FERRER, 1999; IKONOMOPOULOS et al., 2003). Por essas amostras serem obtidas de forma invasiva, tem ocorrido um crescimento no interesse de se utilizar amostras não invasivas na detecção do DNA de *Leishmania*, entre elas o suabe conjuntival, que permite uma colheita menos invasiva e apresenta melhores resultados (MANNA et al., 2004; PEREIRA, 2013).

Amostras de suabe nasal em cães mostraram elevado potencial no diagnóstico da LVC, sendo seus resultados semelhantes aos observados em amostras coletadas de forma invasiva, além de ter sido um método prático e rápido, porém ainda são necessários maiores estudos para verificar a aplicabilidade deste tipo de amostra clínica, no contexto epidemiológico (FERREIRA et al., 2013b). A aplicação do suabe conjuntival em estudos epidemiológicos da LVC foi testada por Pereira (2013) e obteve bons resultados. Lombardo et al. (2012), demonstraram através de seu estudo, pela primeira vez, a presença de DNA de *Leishmania* em esfregaços orais em cães.

Segundo Ferreira et al. (2013a) utilizando cnPCR em amostras de suabe de ouvido de cães, verificaram um índice de positividade para *Leishmania infantum*, equivalente ao calculado para a biópsia de amostras de pele, um resultado promissor, porém a extração de DNA neste tipo de amostra ainda deve ser melhorada e avaliada por novos estudos, podendo ser tornar uma nova opção de coleta não invasiva. No mesmo trabalho confirmou o elevado potencial do uso de amostras de suabe nasal e oral no diagnóstico molecular qualitativo da LVC.

Solano-Gallego (2006) verificaram através da qPCR, a presença de *Leishmania infantum* na urina de cães com leishmaniose clínica e concluíram que nos animais que apresentavam lesão renal grave, um maior número de leishmanias está presente na urina.

Alguns autores sugerem o uso suabe conjuntival, baseado na alta sensibilidade demonstrada no diagnóstico de *Leishmania* em cães soropositivos com sinais clínicos, ou em animais infectados com infecção subclínica por meio de *nested* ou *seminested* PCR (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010).

Alguns trabalhos têm obtido resultados satisfatórios para diagnóstico de LV usando amostras de sangue (REALE et al., 1999; HU et al., 2000; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MAIA et al., 2009), enquanto outros apontam que as amostras de sangue frequentemente apresentam problemas relacionados com os inibidores de PCR e com a preparação do DNA (REALE et al., 1999; SILVA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; NUNES et al., 2007).

Realizando um estudo comparativo entre as técnicas de PCR de sangue (PCR SG) e PCR de suabe (PCR SC) em cães, Pereira (2013), observou uma maior sensibilidade e especificidade do suabe em relação ao sangue, além de apresentar maior facilidade de coleta, sendo menos invasiva e dolorosa do que a coleta de sangue. A PCR de suabe teve boa aceitação por parte dos proprietários, e até dos cães que não colaboraram durante a coleta de sangue. Conforme análise estatística a associação entre animais positivos na PCR-SC e a presença de sinais clínicos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), e a capacidade da PCR-SG em detectar um maior número de animais sem sinal clínico também foi significativa ($p < 0,05$).

O diagnóstico pela PCR com DNA proveniente de suabes de conjuntiva pela kDNA PCR - hibridização apresentou sensibilidade significativamente maior, quando comparada com a obtida através da biópsia cutânea e das amostras de sangue de cães (LEITE et al., 2010).

Utilizando suabe de conjuntiva ocular, Strauss-Ayali et al. (2004) observaram 92% de positividade, Ferreira et al. (2008) detectaram DNA do parasita em 91,7 % dos cães, Pilatti et al. (2009) obtiveram entre 73,9% e 95,6% de positividade dependendo do método de PCR utilizado e Leite et al. (2010) observaram sensibilidade de 90% (PCR com hibridização) e 83.3% (ITS-1nPCR).

O primeiro relato do uso de suabes de conjuntiva no diagnóstico de LV por PCR em cães assintomáticos, foi feito por Leite et al. (2010) que consideraram o método muito superior em relação a sensibilidade e praticidade, quando comparado a outras técnicas pouco invasivas, e concluiu que seu uso na triagem de cães pelo

PCR deve ser considerado, além de ser um método não invasivo, indolor, rápido, de fácil repetibilidade e aceitável pelos cães e por seus proprietários.

Em gatos, a confirmação do diagnóstico geralmente é realizada através de métodos diretos como o exame citológico com Giemsa, esfregaços de amostras de biópsia, cultura in vitro e testes moleculares. Nos casos de lesões dermatológicas e oftalmológicas, devido à leishmaniose não ser a suspeita inicial, o diagnóstico histológico pode ser frequentemente utilizado (MANCIANTI, 2004).

O diagnóstico sorológico em gatos geralmente confirma o diagnóstico direto, mas não é padronizada como para a LC. As técnicas sorológicas RIFI, ELISA, Western Blot, e o teste de aglutinação direta (DAT) têm sido empregados (GRAMICCIA, 2011). O diagnóstico de *L. infantum* em gatos é confirmado através de métodos diretos (citologia, histologia, cultura, PCR) ou sorológicos (RIFI, ELISA) (PENNISIA; SOLANO-GALLEGO, 2013).

A LE é uma doença onde os animais muitas vezes não mostram anticorpos específicos detectáveis, e apresentam recuperação sem tratamento. Dessa forma, os métodos diagnósticos sugeridos são os parasitológicos ou moleculares, realizados com amostras coletadas através de biópsias de lesões cutâneas, que são as características clínicas mais frequentes (GRAMICCIA, 2011).

Para a detecção de *Leishmania braziliensis* em equinos, existem relatos utilizando métodos sorológicos como a RIFI e ELISA (THOMAZ et al., 2013) e DAT (VEDOVELLO-FILHO et al., 2008) e também de métodos moleculares como a PCR (VEDOVELLO-FILHO et al., 2008; THOMAZ et al., 2013).

Para a detecção de *Leishmania* spp., Feitosa et al. (2012), em equinos de Araçatuba-SP, utilizaram os métodos ELISA e imunocromatografia, enquanto que para detectar *Leishmania infantum*, Soares et al. (2013), em animais de Belo Horizonte-MG, utilizaram como diagnóstico a presença de parasitas em lesões e aspirados de medula óssea, RIFI e ELISA e PCR.

3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças crônicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que acometem o homem e outros mamíferos domésticos e silvestres, especialmente os canídeos e roedores, causando diversas manifestações clínicas. No entanto, têm surgido cada vez mais relatos na literatura sobre a ocorrência desta patologia em animais das espécies felina e equina.

A migração de populações rurais para as cidades e as alterações ambientais ocorridas nos últimos anos, juntamente com a redução da condição sócio-econômica da população brasileira, permitiram a entrada e a manutenção dos agentes etiológicos e dos vetores das leishmanioses em áreas não endêmicas, levando os animais de companhia de diversos territórios a enfrentarem novos riscos de infecção.

Para o diagnóstico de animais infectados por *Leishmania* spp. pode-se fazer uso de métodos diretos ou indiretos. Dentre os métodos diretos, os moleculares são os mais utilizados atualmente, em especial a PCR, que tem apresentado bons resultados no que diz respeito a detecção de DNA de *Leishmania*, nos vetores e em amostras biológicas de animais das espécies acometidas.

O DNA de *Leishmania* pode ser extraído de animais infectados através da medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, cortes histológicos de tecidos parafinados, sangue e também do vetor, porém existe uma forte tendência atual em se obter a extração a partir de uma coleta menos invasiva, que pode ser realizada a partir da conjuntiva ocular.

Alguns trabalhos têm descrito o uso de suabes de conjuntiva no diagnóstico das leishmanioses por PCR em cães, apresentando excelentes resultados no que diz respeito a sensibilidade, especificidade, aplicabilidade e facilidade de coleta, entretanto até o momento existem poucos relatos da utilização na espécie felina e nenhum na espécie equina.

Devido à importância e expansão das leishmanioses no Brasil, à importância do cão como reservatório urbano, e à necessidade de se elucidar o papel das espécies felina e equina, como reservatórios das enfermidades, desenvolveu-se o presente trabalho.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em regiões endêmicas e não endêmicas no estado de São Paulo e testar a eficácia da PCR na detecção de *Leishmania* spp em amostras da conjuntiva ocular foram realizados testes em amostras de sangue e suabe conjuntival de cães, gatos e equinos.

4 OBJETIVOS

O presente estudo, objetivou verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos procedentes de regiões endêmicas e não endêmicas no estado de São Paulo, por meio dos testes diagnósticos Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR). Objetivou também comprovar a eficácia da PCR realizada com DNA extraído de suabes da conjuntiva ocular de cães, gatos e equinos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir encontram-se descritos os materiais e métodos empregados no presente estudo.

5.1 REGIÃO DO ESTUDO

No presente estudo foram analisadas amostras coletadas de animais dos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapeceira da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo.

5.1.1 Bragança Paulista

Bragança Paulista, é um município localizado na região Sudeste do estado de São Paulo, com latitude 22° 57' 07" Sul, longitude 46° 32' 31" Oeste, altitude de 817 metros e área de 514,8 km² (APOLO11, 2013). Distante 88 km da capital do estado, o município teve 05 casos confirmados de LTA em humanos, no período de 2007 a Abril de 2013, segundo o CVE-SP (2013). Foram coletadas amostras de sangue e suabe da conjuntiva ocular em 14 animais da espécie equina.

5.1.2 Embú das Artes

Embu das Artes, é um município localizado na sub-região Oeste da região metropolitana da cidade de São Paulo, com latitude 23° 38' 56" Sul, longitude 46° 51' 08" Oeste, altitude de 775 metros e área de 70,3 km² (APOLO11, 2013). Distante 27 km da capital do estado, o município teve 03 casos confirmados de LTA em

humanos, no período de 2007 a Abril de 2013, segundo o CVE-SP (2013). Foram coletadas amostras de sangue e suabe da conjuntiva ocular em 42 animais da espécie canina e 09 animais da espécie felina.

5.1.3 Ilha Solteira

Ilha Solteira, é um município localizado na região Noroeste do estado de São Paulo, com latitude 20° 25' 58" Sul, longitude 51° 20' 33" Oeste, altitude de 0 metros e área de 661,3 km² (APOLO11, 2013). Distante 669 km da capital do estado, o município é considerado endêmico para LV e segundo o CVE-SP (2013) no período de 2010 a Maio de 2013, teve 01 caso confirmado de LV em humanos. Foram coletadas amostras de sangue e suabe da conjuntiva ocular em 40 animais da espécie equina.

5.1.4 Itapecerica da Serra

Itapecerica da Serra, é um município localizado na região metropolitana da cidade de São Paulo, com latitude 23° 43' 01" Sul, longitude 46° 50' 57" Oeste, altitude de 906 metros e área de 151,8 km² (APOLO11, 2013). Distante 33 km da capital do estado, o município teve 05 casos confirmados de LTA em humanos, no período de 2007 a Abril de 2013, segundo o CVE-SP (2013). Foram coletadas amostras de sangue e suabe da conjuntiva ocular em 32 animais da espécie canina e 13 animais da espécie felina.

5.1.5 Pirassununga

Pirassununga, é um município localizado na região Centro-Leste do estado de São Paulo, com latitude 21° 59' 46" Sul, longitude 47° 25' 33" Oeste, altitude de 627 metros e área de 728,7 km² (APOLO11, 2013). Distante 230 km da capital do estado, o município teve 06 casos confirmados de LTA em humanos, no período de 2007 a Abril de 2013, segundo o CVE-SP (2013). Foram coletadas amostras de sangue e suabe da conjuntiva ocular em 07 animais da espécie felina.

5.1.6 São Lourenço da Serra

São Lourenço da Serra, é um município localizado na região metropolitana da cidade de São Paulo, com latitude 23° 51' 09" Sul, longitude 46° 56' 33" Oeste, altitude de 690 metros e área de 187,1 km² (APOLO11, 2013). Distante 52 km da capital do estado, o município teve 02 casos confirmados de LTA em humanos, no período de 2007 a Abril de 2013, segundo o CVE-SP (2013). Foram coletadas amostras de sangue e suabe da conjuntiva ocular em 10 animais da espécie canina e 3 animais da espécie felina.

5.1.7 São Paulo

São Paulo, é um município localizado no Sul da região sudeste do estado de São Paulo, com latitude 23° 32' 51" Sul, longitude 46° 38' 10" Oeste, altitude de 760 metros e área de 1528,5 km² (APOLO11, 2013). Capital do estado, o município teve 178 casos confirmados de LTA em humanos, no período de 2007 a Abril de 2013, segundo o CVE-SP (2013). Foram coletadas neste município amostras de sangue e

suabe da conjuntiva ocular em 116 animais da espécie canina e 76 animais da espécie felina.

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo intitulado “Ocorrência de *Leishmania* spp. em Cães, Gatos e Equinos no estado de São Paulo”, teve seu conteúdo apresentado e aprovado junto ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o número 2361, em reunião no dia 23 de Agosto de 2013.

5.3 AMOSTRAGEM

No presente estudo foram analisadas amostras de animais das espécies canina, felina e equina, coletadas de maneira aleatória, de acordo com a disponibilidade das espécies animais nos diferentes municípios estudados.

5.3.1 Animais

Foram avaliados 362 animais do estado de São Paulo, das espécies canina, felina e equina, machos e fêmeas, jovens e adultos, com ou sem raça definida, oriundos dos Centros de Controles de Zoonoses e de propriedades particulares dos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, conforme tabela 1.

Tabela 1 - Animais das espécies canina, felina e equina que tiveram amostras coletadas nos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, no estado de São Paulo – São Paulo – 2013

Cidade	Cães	Gatos	Equinos
Bragança Paulista	-	-	14
Embu das Artes	42	09	-
Ilha Solteira	-	-	40
Itapequerica da Serra	32	13	-
Pirassununga	-	07	-
São Lourenço da Serra	10	03	-
São Paulo	116	76	-
Total	200	108	54

Os animais que tiveram suas amostras coletadas, foram primeiramente analisados clinicamente para a verificação da presença de sinais clínicos compatíveis com os causados pelas leishmanioses nas espécies estudadas.

5.3.2 Coleta de Material Biológico

No presente estudo foram utilizadas amostras biológicas, das espécies canina, felina e equina para a realização das técnicas diagnósticas para detecção de *Leishmania* spp. e leishmanias do Complexo *Leishmania donovani* para os animais da espécie equina provenientes do município de Bragança Paulista.

5.3.2.1 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de sangue de 200 cães, pela punção da veia jugular ou da veia cefálica (Figura 1) e de 108 gatos pela punção da veia jugular (Figura 2) Para essas duas espécies, foram utilizadas agulhas (0,55 x 20mm) e seringas (3mL) estéreis e descartáveis. O sangue foi acondicionado em tubos sem e com anticoagulante (EDTA) para a obtenção de sangue total e soro para realização dos testes.

As 54 amostras de sangue de equinos foram obtidas pela punção da veia jugular (Figura 3) com agulhas (1,20 x 40mm) e seringas (5mL) estéreis e descartáveis e posteriormente acondicionadas em tubos sem e com anticoagulante (EDTA) para a obtenção de sangue total e soro, para realização dos testes.

Para a obtenção dos soros, os tubos sem anticoagulante, após a formação do coágulo, foram centrifugados à 13.000xg, por 10 minutos, os soros foram coletados e acondicionados à - 20°C, até o momento do uso.

Os tubos com anticoagulante foram acondicionados a -20°C, até o momento do uso.

Figura 1 - Imagem de coleta de sangue de animal da espécie canina através de punção da veia jugular – São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Figura 2 - Imagem de coleta de sangue de animal da espécie felina através de punção da veia jugular– São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Figura 3 - Imagem de coleta de sangue de animal da espécie equina através de punção da veia jugular – São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

5.3.2.2 Coleta de suabe conjuntival

Amostras de células epiteliais foram coletadas, com auxílio de suabes estéreis, na conjuntiva ocular de cada animal, nos olhos direito e esquerdo, das espécies canina, felina e equina (Figuras 4, 5 e 6), totalizando 724 amostras. Os suabes coletados foram acondicionados em microtubos plásticos com capacidade de 1,5 ml (livres de DNases e RNases), identificados e mantidos à temperatura de 4°C, para posterior processamento. A temperatura de 4°C para armazenagem dos suabes até o momento do processamento, foi definida por Pereira (2013), após avaliação da estabilidade destes em diferentes temperaturas.

Figura 4 - Imagem de coleta de suabe de conjuntiva ocular direita de animal da espécie canina – São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Figura 5 - Imagem de coleta de suabe de conjuntiva ocular direita de animal da espécie felina – São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Figura 6 - Imagem de coleta de suabe de conjuntiva ocular direita em equino – São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

5.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A RIFI foi realizada segundo metodologia descrita por Oliveira et al. (2008), para cães, por Vides et al. (2011) para gatos e por Soares et al. (2013) para equinos. Lâminas de microscopia, gentilmente cedidas pela FCAV - UNESP - Jaboticabal, com formas promastigotas de *Leishmania infantum* imobilizadas em pequenos círculos, previamente demarcados, foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

Os soros puros, de animais das espécies canina, felina e equina armazenados a -20°C foram descongelados e submetidos à diluição referente a cada espécie de animal (Tabela 2).

Tabela 2 - Diluição de soros das espécies canina, felina e equina e dos respectivos conjugados para realização de RIFI – São Paulo – 2013

Espécie animal	Canina	Felina	Equina
Diluição do soro sérico	1:40	1:80	1:80
Diluição do conjugado	1:600	1:100	1:100

5.4.1 Cães

No momento da realização do teste, as lâminas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente por quinze minutos. Foram depositados aproximadamente 10µL de cada amostra de soro diluída em PBS pH = 7,2, reservando-se dois poços para a adição de amostras de soros controle positivo e negativo. O material foi incubado a 37°C em câmara úmida por 30 minutos e as lâminas lavadas 3 vezes, de cinco minutos cada, em solução de PBS pH = 7,2. Posteriormente, foram adicionados de 10 µL do conjugado anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma catalog n-F7884), diluído conforme orientação do fabricante. Em seguida, nova incubação e lavagens foram realizadas e a lâmina preparada para leitura com glicerol tamponado e lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência e a positividade da reação implicou na observação da fluorescência dos parasitas, comparada a amostras controle positivo e negativo, presente na mesma lâmina. Foram

consideradas reações positivas quando os parasitas apresentam coloração fluorescente em toda a periferia, com ponto de corte $\geq 1:40$ (OLIVEIRA et al., 2008).

O título de anticorpos foi determinado como a recíproca da maior diluição do soro, na base 2, capaz de promover fluorescência.

O soro controle positivo utilizado na reação, foi gentilmente cedido por Pereira (2013), enquanto que soros de animais sabidamente negativos foram utilizados como controles negativos da reação.

5.4.2 Gatos

Os soros puros, armazenados a -20°C foram descongelados e submetidos à diluição referente a espécie felina (Tabela 2).

No momento da realização do teste, as lâminas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente por quinze minutos. Foram depositados aproximadamente $10\mu\text{L}$ de cada amostra de soro diluída em PBS pH = 7,2, reservando-se dois poços para a adição de amostras de soros controle positivo e negativo. O material foi incubado a 37°C em câmara úmida por 30 minutos e as lâminas lavadas 3 vezes, de cinco minutos cada, em solução de PBS pH = 7,2. Posteriormente, foram adicionados de $10\mu\text{L}$ do conjugado anti-IgG felino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma catalog n-F4262), diluído conforme orientação do fabricante. Em seguida, nova incubação e lavagens foram realizadas e a lâmina preparada para leitura com glicerol tamponado e lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência e a positividade da reação implicou na observação da fluorescência dos parasitas, comparada a amostras controle positivo e negativo, presente na mesma lâmina. Foram consideradas reações positivas quando os parasitas apresentam coloração fluorescente em toda a periferia, com ponto de corte $\geq 1:80$. A técnica utilizada foi baseada na descrita por Vides et al. (2011).

O título de anticorpos foi determinado como a recíproca da maior diluição do soro, na base 2, capaz de promover fluorescência.

Os controles positivos utilizados para a RIFI com soro de gatos foram obtidos a partir de amostras positivas do atual experimento, enquanto que soros de animais sabidamente negativos foram utilizados como controles negativos da reação.

5.4.3 Equinos

Os soros puros, armazenados a -20°C foram descongelados e submetidos à diluição referente a espécie equina (Tabela 2).

No momento da realização do teste, as lâminas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente por quinze minutos. Foram depositados aproximadamente $10\mu\text{L}$ de cada amostra de soro diluída em PBS pH = 7,2, reservando-se dois poços para a adição de amostras de soros controle positivo e negativo. O material foi incubado a 37°C em câmara úmida por 30 minutos e as lâminas lavadas 3 vezes, de cinco minutos cada, em solução de PBS pH = 7,2. Posteriormente, foram adicionados de $10\mu\text{L}$ do conjugado anti-IgG equino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma catalog n-F7759), diluído conforme orientação do fabricante. Em seguida, nova incubação e lavagens foram realizadas e a lâmina preparada para leitura com glicerol tamponado e lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência e a positividade da reação implicou na observação da fluorescência dos parasitas, comparada a amostras controle positivo e negativo, presente na mesma lâmina. Foram consideradas reações positivas quando os parasitas apresentam coloração fluorescente em toda a periferia, com ponto de corte $\geq 1:80$. A técnica utilizada foi baseada na descrita por Soares et al. (2013).

O título de anticorpos foi determinado como a recíproca da maior diluição do soro, na base 2, capaz de promover fluorescência.

Os controles positivos para a RIFI com soro de equinos foram obtidos no atual experimento, enquanto que soros de animais sabidamente negativos foram utilizados como controles negativos da reação.

5.5 DETECÇÃO DO DNA DE LEISHMANIA

A detecção do DNA de *Leishmania* spp. e de leishmanias do Complexo *Leishmania donovani* foi realizada conforme descrição a seguir.

5.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada a partir de amostras de *suabes* da conjuntiva ocular de cães, gatos e equinos, e amostras de sangue de cães e gatos, pelo método de *salting out* descrito por John et al. (1991) e por Lahiri e Nurnberger (1991) com algumas modificações (Apêndices A e B).

Para a extração do sangue de equinos foi utilizado o *illustra® blood genomic Prep Mini Spin Kit*, GE Healthcare®, conforme recomendações do fabricante (Anexo A).

5.5.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para a detecção de *Leishmania* spp. e de leishmanias do Complexo *Leishmania donovani* foi utilizada a técnica de PCR convencional, conforme descrição abaixo.

5.5.2.1 Detecção de *Leishmania* spp.

Objetivando a detecção molecular de *Leishmania* spp das amostras de suabe de conjuntiva ocular, e de sangue foi empregada a técnica de PCR, utilizando

oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3', descritos previamente por Rodgers, Popper e Wirth (1990), que amplificam um segmento conservado de 120pb do minicírculo do cinetoplasto do gênero *Leishmania* spp.

Para as reações de PCR foram utilizados 0,75U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 1X Buffer, 0,2mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,6μM de cada primer, 2,5 μl de DNA e H₂O, q.s.p. 25 μL. Cada reação de amplificação foi submetida ao ciclo de temperaturas: 94°C/3min, 35 vezes 94°C/40s, 56°C/30s, 72°C/30s e uma extensão final de 72°C por 5min em Termociclador (Veriti®, Applied Biosystems®).

Como controle positivo das reações, foi utilizada uma amostra de DNA extraído de *L. infantum*, gentilmente cedida pelo laboratório de Imunoparasitologia da FCAV - UNESP – Jaboticabal, e água deionizada estéril como controle negativo.

5.5.2.2 Detecção de espécies do Complexo *Leishmania donovani*

Objetivando a detecção molecular de leishmanias do Complexo *Leishmania donovani* das amostras de sangue dos equinos provenientes do município de Bragança Paulista, foi empregada a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) MC1: 5' –GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG– 3' e MC2: 5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3', descritos previamente por Cortes et al. (2004) que amplificam um segmento conservado de 447 pb.

Para as reações de PCR foram utilizados Para as reações de PCR foram utilizados 0,25 μL (5 U/ μL) de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 5 μL (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl, pH 8,4) de Buffer, 4 μL de dNTP's (10 mM cada), 1,5 μL de MgCl₂ (1,5 mM), 5 μL de cada primer (10 pmol/ μL), 5 μl de DNA (10ng/ μL) e H₂O Milli-Q, q.s.p. 45 μL. Cada reação de amplificação foi submetida ao ciclo de temperaturas: 1 ciclo: D: 94°C (2 min) e 30 ciclos: D: 94°C (20 seg); A: 60°C (20 seg); E: 72°C (30 seg); Efinal: 72°C(5 min) em Termociclador (Veriti®, Applied Biosystems®).

Como controle positivo das reações, foi utilizada uma amostra de DNA extraído de *L. infantum*, gentilmente cedida pelo laboratório de Imunoparasitologia da FCAV - UNESP – Jaboticabal, e água deionizada estéril como controle negativo.

5.6 ELETROFORESE

Ao produto amplificado foi adicionado 5µL de tampão de amostra (Tris 10mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v) e aplicado em uma matriz de gel de agarose 2% (TBE1X) com SYBR® Safe (Invitrogen®) de acordo com instruções do fabricante. Como marcador de peso molecular foram utilizados fragmentos múltiplos de 100pb. A matriz de gel foi colocada em cuba de eletroforese abastecida com tampão TBE 1X e submetida a 100 volts, durante 55 minutos e posterior visualização sob luz UV.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Microsoft Office Excel foi o aplicativo usado para a construção do banco de dados, contendo características clínicas e resultados dos exames laboratoriais dos animais das espécies canina, felina e equina. Para análise estatística, comparando os resultados da PCR de suabe conjuntival dos olhos esquerdo e direito, foi utilizado o método o Qui-quadrado de Pearson com nível de significância de 5% (SAS, 2013).

6 RESULTADOS

Todos os animais do presente estudo foram clinicamente avaliados, porém nenhum deles apresentou sinais clínicos compatíveis com as leishmanioses.

Foram coletadas amostras suabe da conjuntiva ocular, de soro e de sangue total de 362 animais, sendo 200 cães, 108 gatos e 54 equinos. As amostras foram testadas pelas técnicas de RIFI e PCR para *Leishmania* spp, onde foram obtidos os seguintes resultados: cães, 04 amostras positivas na PCR de SC e 8 positivas na PCR de SG; gatos, 02 amostras positivas na PCR de SC e 03 positivas na RIFI; equinos, 36 amostras positivas na PCR de SC, 54 positivas na PCR de SG e 01 positiva na RIFI, conforme pode ser observado na tabela 3. Foram testadas ainda, 14 amostras de sangue e 14 amostras de suabe de equinos provenientes do município de Bragança Paulista, para o Complexo *Leishmania donovani*, porém todas foram negativas.

Tabela 3 - Animais das espécies canina, felina e equina, com resultado positivo nas reações de PCR e RIFI, para detecção de *Leishmania* spp. nos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, no estado de São Paulo – São Paulo – 2013

Cidade	PCR ^a - suabe ocular			PCR - sangue			RIFI ^b		
	Cão	Gato	Equino	Cão	Gato	Equino	Cão	Gato	Equino
Bragança Paulista	-	-	0	-	-	14	-	-	0
Embú das Artes	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Ilha Solteira	-	-	36	-	-	40	-	-	1
Itapequerica da Serra	1	0	-	0	0	-	0	0	-
Pirassununga	-	2	-	-	0	-	-	2	-
São Lourenço da Serra	1	0	-	0	0	-	0	1	-
São Paulo	2	0	-	8	0	-	0	0	-
Total	4	2	36	8	0	54	0	3	1

Notas:

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

6.1 CÃES

Em São Paulo -SP, dos 116 cães que tiveram amostras de sangue e *suabe* coletados, 100% (116/116), apresentou resultado negativo na RIFI, 6,89% (08/116) dos animais apresentou resultado positivo para a PCR de sangue e 1,72% (02/116) dos animais apresentou resultado positivo para a PCR de *suabe*, sendo um deles somente no *suabe* da conjuntiva do olho esquerdo enquanto que o outro apresentou resultado positivo nos *suabes* das conjuntivas dos olhos direito e esquerdo (Figura 7).

Em Itapequerica da Serra-SP, em um total de 32 animais, 100% (32/32), apresentou resultado negativo na RIFI e na PCR de sangue, enquanto que 3,12% (1/32) dos animais foram positivos na PCR de *suabe* de conjuntiva de olho esquerdo (Figura 7).

Em Embu das Artes-SP, dos 42 cães analisados, 100%(42/42) apresentou resultado negativo para a RIFI, PCR de sangue e para a PCR de *suabe* (Figura 7).

No município de São Lourenço da Serra-SP, de 10 animais analisados, 100% (10/10) foram negativos na RIFI e na PCR de sangue e 10% (1/10) apresentou resultado positivo para a PCR de *suabe* de conjuntiva, esquerda (Figura 7). A figura 8 ilustra a eletroforese em gel de agarose de amostras positivas na PCR realizada com DNA extraído de *suabes* conjuntivais e de sangue, coletados em cães.

Figura 7 - Figura gráfica ilustrativa representando os resultados dos testes de RIFI e PCR de sangue e de conjuntiva ocular realizados com amostras de cães das cidades de Embu das Artes, Itapequerica da Serra, São Lourenço da Serra e São Paulo – São Paulo – 2013

Fonte: Benvença, G.U. (2013)

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos primers 13A e 13B, obtidos pela PCR com o DNA de sangue e de suabe conjuntival de cães, gerando fragmentos de 120pb - São Paulo – 2013

Fonte: Benvença, G.U. (2013)

Legenda:

Linha 1(L1): Marcador de peso molecular padrão 100pb (Invitrogen®).

Linha 2(L2): Controle positivo. Linha 3: Controle negativo.

Linhas de 4(L4) a 6(L6): Reações com o DNA extraído de amostras de SC de 3 cães diferentes.

Linhas de 7(L7) a 8(L8): Reações com o DNA extraído de amostras de sangue de 2 cães diferentes.

6.2 GATOS

Nos municípios de São Paulo-SP, Itapequerica da Serra-SP, e Embú das Artes 100% dos gatos que tiveram amostras de sangue e suabe coletados foram negativos na RIFI, na PCR de sangue e na PCR de Suabe (Figura 9).

No município de São Lourenço da Serra-SP, 03 animais tiveram amostras de sangue e suabe coletados, sendo que 33,33% (1/3) apresentou resultado positivo para a RIFI, na titulação de 1:160 e 100% (3/3) apresentou resultado negativo para a PCR de sangue e para a PCR de suabe (Figura 9).

Em Pirassununga-SP, em um total de 07 gatos, 28,57% (02/07) tiveram resultado positivo para a RIFI, apresentando titulação de 1:160, 100% (07/07), foram negativos na PCR de sangue e 28,57% (02/07) tiveram resultado positivo para a PCR de suabe, sendo um deles somente no suabe da conjuntiva do olho esquerdo enquanto que o outro apresentou resultado positivo nos suabes das conjuntivas dos olhos direito e esquerdo. A figura 10 ilustra a eletroforese em gel de agarose de amostras positivas pela PCR realizada com DNA extraído de suabes conjuntivais coletados em gatos.

Figura 9 - Figura gráfica ilustrativa representando em porcentagem os animais com resultado positivo nos testes de RIFI e PCR de sangue e de conjuntiva ocular realizados com amostras extraídas de gatos das cidades de Embu das Artes, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Figura 10 - Imagem de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos primers 13A e 13B, obtidos pela PCR com o DNA de sangue e de suabe conjuntival de gatos, gerando fragmentos de 120pb - São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Legenda:

Linha 1(L1): Marcador de peso molecular padrão 100pb (Invitrogen®);

Linha 2(L2): Controle positivo;

Linha 3(L3): Controle negativo;

Linhas 4(L4), 5(L5) e 6(L6): Reações com o DNA extraído de amostras de suabe conjuntival de 3 gatos diferentes;

6.3 EQUINOS

Dos 14 equinos que tiveram amostras coletadas na cidade de Bragança Paulista-SP, 100% (14/14) apresentaram resultado negativo na RIFI, através das PCRs utilizando os primers 13A e 13 B , 100% (14/14) dos animais foram positivos na PCR de sangue e 100% (14/14) foram negativos na PCR de suabe (Figura 11).

Nas reações de PCR utilizando os primers MC1 e MC2, para detecção de leishmanias do complexo *L. donovani*, 100% (14/14) dos equinos apresentaram resultado negativo para a PCR de sangue e para a PCR de suabe.

Em Ilha Solteira-SP, de um total de 40 animais, em 2,5% (01/40) foi verificado resultado positivo na RIFI, apresentando titulação de 1:80, 100% (40/40) apresentou resultado positivo para PCR de sangue e 90% (36/40) dos equinos apresentou resultado positivo na PCR de *suabe*, sendo 21 animais positivos nas conjuntivas oculares direita e esquerda, 09 positivos na conjuntiva ocular esquerda e 06 na conjuntiva ocular direita. A figura 12 ilustra a eletroforese em gel de agarose de amostras positivas pela PCR com DNA extraído de suabes conjuntivais e de sangue coletados em equinos.

Figura 11 - Figura gráfica ilustrativa representando em porcentagem os animais com resultado positivo nos testes de RIFI e PCR de sangue e de conjuntiva ocular realizados com amostras extraídas de equinos das cidades de Bragança Paulista e Ilha Solteira - São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Figura 12 - Imagem de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados pelos primers 13A e 13B, obtidos pela PCR com o DNA de sangue e de suabe conjuntival de equinos, gerando fragmentos de 120pb - São Paulo – 2013

Fonte: Benvenga, G.U. (2013)

Legenda:

Linha 1(L1): Marcador de peso molecular padrão 100pb (Invitrogen®);

Linha 2(L2): Controle positivo;

Linha 3(L3): Controle negativo;
Linhas de 4(L4) a 6(L6): Reações com o DNA extraído de amostras de suabe conjuntival de 3 equinos diferentes;
Linhas de 7(L7) a 8(L8): Reações com o DNA extraído de amostras de sangue de 02 equinos diferentes

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a espécie canina, dos animais positivos pela PCR de DNA extraído da conjuntiva, foram observados 25%(1/4) positivos na conjuntiva direita e 100%(4/4) na conjuntiva esquerda, sendo que 25% (1/4) tiveram resultado positivo nas duas conjuntivas (direita e esquerda).

Dos animais positivos da espécie felina pela PCR de DNA extraído da conjuntiva, foram observados 50%(1/2) positivos na conjuntiva direita e 100%(2/2) na conjuntiva esquerda, sendo que 50% (1/2) tiveram resultado positivo nas duas conjuntivas (direita e esquerda).

Para a espécie equina, dos animais positivos pela PCR de DNA extraído da conjuntiva, foram observados 75% (27/36) positivos na conjuntiva direita e 83,33% (30/36), sendo que 58,33% (21/36) tiveram resultado positivo nas duas conjuntivas (direita e esquerda).

Não houve diferença estatística entre as conjuntivas oculares direita e esquerda em todas as espécies animais estudadas ($P>0,05$). Os resultados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Amostras conjuntivais oculares (olho direito e esquerdo) de animais das espécies canina, felina e equina com resultado positivo nas reações de PCR para *Leishmania* spp. nos municípios de Bragança Paulista, Embú das Artes, Ilha Solteira, Itapequerica da Serra, Pirassununga, São Lourenço da Serra e São Paulo, no estado de São Paulo – São Paulo – 2013

Cidade	Cão		Gato		Equino	
	OD^a	OE^b	OD	OE	OD	OE
Bragança Paulista	-	-	-	-	0	0
Embú das Artes	0	0	0	0	-	-
Ilha Solteira	-	-	-	-	27	30
Itapequerica da Serra	0	1	0	0	-	-
Pirassununga	-	-	1	2	-	-
São Lourenço da Serra	0	1	0	0	-	-
São Paulo	1	2	0	0	-	-
Total	1	4	1	2	27	30

Notas:

OD: Olho direito

OE: Olho esquerdo

7 DISCUSSÃO

As amostras analisadas, dos cães provenientes dos municípios de Itapecerica da Serra, São Lourenço da Serra e São Paulo, foram positivas para *Leishmania* spp. com frequências de 3,12% (PCR de suabe), 10% (PCR de suabe) e 1,72% (PCR de suabe)/ 6,89%(PCR de sangue), respectivamente.

Nenhum dos cães analisados apresentou sinais clínicos e resultado positivo na RIFI, nem mesmo os que foram positivos nos testes moleculares, o que pode ser justificado pelo fato da RIFI apresentar baixa sensibilidade na detecção de animais assintomáticos (METTLER et al., 2005; QUEIROZ et al., 2010) ou em infecções recentes (LEONTIDES et al., 2002) e que indivíduos soropositivos podem ser assintomáticos e mostrar positividade nos métodos de diagnóstico molecular (OZENSOY et al., 2013).

Leite et al. (2013), utilizando oitocentos e setenta e sete cães domiciliados na Região Norte da cidade de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil), avaliados clinicamente por um veterinário, coletaram amostras de SC em ambos os olhos para diagnóstico molecular, relataram que 66% (579/877) dos cães analisados apresentaram pelo menos um sinal clínico relacionado à LV, sendo o principal deles alterações de pele. Obtiveram como resultado na RIFI, 5,2% dos animais (46/877) positivos e no ensaio de PCR em tempo real 25% (222/877) positivos e concluíram que a PCR utilizando amostras de SC foi altamente sensível e capaz de detectar a infecção por *Leishmania infantum* em cães sintomáticos ou assintomáticos, com diagnóstico sorológico positivo ou negativo.

A ausência de animais positivos na RIFI, notada neste trabalho, também corrobora com Savani et al. (1999) que em São Paulo realizaram a RIFI em 973 amostras de soro sanguíneo de cães errantes e nenhum indivíduo foi positivo, mesmo tratando-se de uma região onde a LTA ocorre de forma autóctone. Castro et al. (2005) no município de Adrianópolis, estado do Paraná, verificaram que de 159 cães submetidos à técnica de RIFI, apenas sete (4,4%) cães foram positivos para *Leishmania braziliensis*.

Não foram encontrados trabalhos publicados relatando a presença de cães infectados por *Leishmania* spp. nos municípios estudados. Segundo dados do CVE-SP (2013) foram confirmados no período de 2007 a Abril de 2013, 05 casos de LTA

em humanos em Itapeverica, 02 casos em São Lourenço da Serra e 178 casos em São Paulo. Não foram encontrados dados oficiais sobre a ocorrência de LV em humanos nesses municípios.

O uso do SC nos animais da espécie canina do presente trabalho mostrou-se um método simples, indolor, rápido, pouco estressante para os animais, para os proprietários, quando os possuíam, e para o técnico que realizou a coleta, além de ter se mostrado eficiente na detecção de animais infectados por *Leishmania* spp.. Características similares foram observadas por Ozensoy et al. (2013) e Pereira (2013) na detecção de *Leishmania* spp. e na detecção de *Leishmania infantum* por Oliveira et al. (2013), Pilatti (2009) e por Ferreira et al. (2013c).

Assis et al. (2010), utilizaram a PCR com DNA obtido em amostras de sangue e tecidos de cães de Ilha Solteira para comparar e confirmar os diagnósticos negativos e não conclusivos pelas técnicas de ELISA, RIFI, histoquímica (HE) e imunoistoquímica. Os índices de positividade foram respectivamente, 65%, 62%, 56 e 56%, enquanto que para a PCR foi de 97%. Entretanto, os resultados da pesquisa revelaram que nenhuma prova diagnóstica, quando testada isoladamente, identificou adequadamente todos os cães portadores de LVC.

Ferreira et al. (2012), através de seu experimento em Belo Horizonte-MG, relataram que o SC é uma amostra clínica adequada para o diagnóstico molecular quantitativo da LVC e que o qPCR enfatizou o papel dos cães, em especial dos assintomáticos, como reservatórios da LVC, graças a elevadas cargas parasitárias cutâneas. As frequências de resultados positivos obtidos por kDNA e hibridização por PCR para cães assintomáticos e cães sintomáticos, foram respectivamente, 77,5% e 95,0% na conjuntiva direita, 75,0% e 87,5% na conjuntiva esquerda, 45,0% e 75,0% na pele, 50,0% e 77,5% na medula óssea, e 27,5% e 22,5% no sangue. Em um estudo na Itália, com 253 cães, 72 (28,45%) animais foram positivos em pelo menos um teste, o n-PCR de SC mostrou o melhor desempenho relativo (76,38%), com um alto grau de concordância em comparação com a RIFI. As maiores taxas de positividade usando n-PCR de SC foram encontrados em 84,2% dos cães infectados assintomáticos e em 77,8% dos cães doentes, entretanto, a sensibilidade do ensaio não foi associada com a presença de sinais clínicos (DI MUCCIO et al., 2012).

As amostras analisadas dos gatos provenientes dos municípios de Pirassununga e São Lourenço da Serra, foram positivas para *Leishmania* spp., com frequências de 28,57% (PCR de suabe)/ 28,57%(RIFI) e 33,33% (RIFI),

respectivamente. Os resultados obtidos na RIFI, dos animais procedentes de São Lourenço da Serra corroboram com os obtidos por Rossi et al. (2013), que em experimento realizado com gatos do município de Araçatuba obtiveram frequência de 33.33% de animais positivos para *Leishmania* spp., detectados por meio da RIFI e sugeriram que o diagnóstico sorológico, utilizando as técnicas de RIFI e ELISA, em gatos deve ser utilizado com cautela, e se possível, associados ao diagnóstico parasitológico. Veronesi et al. (2013) relatam que em geral, os gatos exibem fracas respostas de anticorpos, entretanto em nosso trabalho observamos uma maior quantidade de gatos reativos à sorologia do que no diagnóstico molecular.

No presente trabalho, não foram detectados gatos positivos para *Leishmania* spp. pela PCR realizada a partir de amostras de sangue, entretanto houve uma frequência de 28,57% de animais positivos na PCR de suabe de conjuntiva. Tal fato corrobora com os resultados obtidos por Marques et al. (2013), que utilizando-se da detecção por qPCR, observaram uma baixa frequência (5%) de gatos positivos na qPCR de sangue e uma maior frequência (23%) em animais positivos na qPCR de SC e concluíram que a detecção de DNA no SC parece ser mais sensível do que em amostras de sangue.

Em todos os felinos (n=108) que tiveram amostras coletadas neste trabalho, não foram verificados sinais clínicos sugestivos de leishmaniose felina, o que concorda com Veronesi et al. (2013), que em seu estudo utilizando 98 gatos, não verificou a presença de sinais clínicos.

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos publicados relatando a presença de gatos infectados por *Leishmania* spp. nos municípios estudados, segundo os dados do CVE-SP (2013), foram confirmados no período de 2007 a Abril de 2013, 06 casos de LTA em humanos em Pirassununga e 02 casos em São Lourenço da Serra.

Savani et al. (2004), em um gato proveniente do município de Cotia, estado de São Paulo, fizeram o primeiro relato de um gato doméstico naturalmente infectados por *L. infantum* no Brasil e nas Américas e também sugeriram que a transmissão natural da doença está ocorrendo nesta área, e que os gatos poderiam atuar como um reservatório. Na cidade de Andradina, estado de São Paulo, Coelho et al. (2010), fizeram o primeiro relato da ocorrência de *Leishmania infantum*, diagnosticada por sequenciamento de produto de PCR, em um gato doméstico, positivo pelo ELISA e negativo pela RIFI.

Alves et al. (2011) em estudo com 55 gatos provenientes do município de Ilha Solteira, verificaram pelo diagnóstico parasitológico por hemocultura, a presença de formas flageladas sugestivas de *Leishmania* spp em 16% (9/55) dos animais.

Silva et al. (2008) relataram pela primeira vez, em uma área endêmica no Rio de Janeiro, leishmaniose em gatos domésticos, e observaram uma soroprevalência de 25%, apesar de nenhum dos animais terem apresentado sinais clínicos. Bresciani et al. (2010), comparando a ocorrência de *Leishmania* spp. em gatos de Araçatuba, estado de São Paulo, através dos métodos citológico e sorológico, verificaram ocorrência do parasito em 0,7% nos felinos examinados, por meio de imprint de linfonodos e nenhum animal apresentou títulos de anticorpos para *Leishmania* spp. sugerindo, devido a baixa incidência, que estes não assumem importância epidemiológica na área estudada.

Maia, Nunes e Campino (2008), em Portugal, com o objetivo de realizar um levantamento de leishmaniose em gatos a partir de um foco endêmico, coletaram amostras de sangue de 23 animais para análise sorológica e molecular. O DNA de *L. infantum* foi detectado no sangue de 30,4% (7/23) dos gatos e um baixo nível de anticorpos fluorescentes foi detectado em quatro amostras de soro. Todos os animais do estudo eram assintomáticos, o que os levou a concluir que levando-se em conta o alto índice de LF assintomática, sugere-se que os gatos podem atuar como hospedeiro reservatório habitual em áreas endêmicas e que o diagnóstico da LF deve ser efetuado por meio de técnicas moleculares.

Apesar de ainda existirem poucos relatos do uso de suabes de conjuntiva ocular para detecção de *Leishmania* em felinos, o uso de suabes conjuntivais nessa espécie animal já teve sua eficácia comprovada no diagnóstico de vários agentes etiológicos. O suabe conjuntival é utilizado na detecção de microorganismos que possuem tropismo pela conjuntiva ocular ou daqueles que fazem parte da microbiota local (HAESEBROUCK et al. 1991; LOW et al. 2007).

Haesebrouck et al. (1991) através da coleta de suabes conjuntivais de 40 gatos com conjuntivite e de 65 gatos sem a patologia, observaram que o *Mycoplasma felis* não foi isolado em animais clinicamente saudáveis e que tem papel importante na conjuntivite felina.

Low et al. (2007), utilizaram a PCR de suabe conjuntival para determinar a prevalência de DNA de Herpes Vírus Felino 1 (FHV-1), de *Chlamydomphila felis* e de *Mycoplasma* spp. em células da conjuntiva coletadas de gatos com e sem

conjuntivite, e concluíram que *Mycoplasma* spp foi o principal microorganismo detectado, associado à conjuntivite.

No presente trabalho, não foram verificados sinais clínicos sugestivos de LE nos animais coletados, porém vários animais foram positivos frente à PCR.

As amostras analisadas, dos equinos provenientes dos municípios de Bragança Paulista e Ilha Solteira positivas para *Leishmania* spp., obtiveram frequências de 100% (PCR de sangue) e 90% (PCR de suabe)/ 100% (PCR de sangue) / 2,5% (RIFI), respectivamente.

Nas reações de PCR utilizando os primers MC1 e MC2, para detecção de leishmanias do complexo *L. donovani*, 100% (14/14) dos equinos de Bragança Paulista apresentaram resultado negativo para a PCR de suabe e para a PCR de sangue. Tal fato indica que estes animais estão provavelmente infectados com outras espécies de *Leishmania* spp. e não por *Leishmania infantum*.

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos publicados, relatando a presença de equinos infectados por *Leishmania* spp. nesses municípios, segundo os dados do CVE-SP (2013), foram confirmados em humanos, 05 casos de LTA em Bragança Paulista, no período de 2007 a Abril de 2013, e 01 caso de LV em Ilha Solteira, de 2010 a Maio de 2013.

Cabe ressaltar que este é o primeiro trabalho descrevendo o uso de suabe conjuntival na detecção de *Leishmania* spp. em equinos. Devido a não haver um protocolo estabelecido para a detecção de *Leishmania* spp. em suabes da conjuntiva ocular em equinos, foi padronizada, no presente trabalho, a técnica para extração (Apêndice A) de DNA nessas amostras.

Antes deste estudo, o uso de suabes conjuntivais em equinos já teve sua eficácia comprovada no diagnóstico de vários agentes etiológicos que possuem tropismo pela conjuntiva ocular ou mesmo daqueles microorganismos que fazem parte da microbiota local (SAMUELSON; ANDRESEN; GWIN, 1984; PISANI et al., 1997; BORCHERS et al., 2006).

PISANI et al. (1997), ressaltam a importância no conhecimento da microbiota conjuntival normal de equinos e da realização de testes de sensibilidade diante de antibióticos e quimioterápicos, fundamentais para o diagnóstico e tratamento de afecções oculares. Através de seu estudo, coletaram amostras de SC de equinos que foram submetidas a exames bacteriológicos e a testes de sensibilidade diante de antibióticos e quimioterápicos. A microbiota conjuntival normal dos equinos

analisados foi composta por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, tais como: *Bacillus subtilis*, *Stafilococcus* spp., *Streptococcus* spp., Enterobacterias, *Candida* spp. A colheita de material, a identificação dos microorganismos através de testes bacteriológicos, e a realização de testes de sensibilidade diante de antibióticos e quimioterápicos, são necessárias para estabelecer tratamentos corretos e eficazes, em face da multiplicidade de microorganismos encontrados nas amostras conjuntivais dos equinos estudados.

Para estudo de microbiota, utilizando-se de amostras de suabe de conjuntiva ocular, obtidas a partir dos olhos direito e esquerdo de 43 cavalos sem patologias oculares, Samuelson, Andresen e Gwin (1984), procederam o isolamento dos microorganismos, e verificaram fungos em 95% dos cavalos, sendo que o *Aspergillus* spp foi verificado em 56% dos animais, e os fungos *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp isolados de forma onipresente.

Mair e Wills (1992), por meio de suabes da conjuntiva ocular isolaram *Chlamydia psittaci* em 15% dos 300 cavalos pertencentes ao estudo, indicando que o isolamento desta bactéria por este tipo de coleta é efetivo e possibilita o diagnóstico de *Chlamydia*, microorganismo de grande importância na uveíte recorrente equina (URE).

Para obter mais informações referentes à prevalência do Herpes Vírus Equino 2 (EHV-2) em suabes conjuntivais de cavalos, possuindo ou não patologia ocular, Borchers et al. (2006), fizeram uso da PCR e verificaram que 28,6% dos animais clinicamente sadios foram positivos, enquanto que 8,3% dos cavalos doentes foram positivos.

Thomaz et al. (2013), detectou *Leishmania braziliensis* em equídeos de áreas endêmicas para LTA da região sul do Brasil, utilizando-se dos métodos de ELISA e PCR. Obteve 11,0% (25/ 227) equídeos soropositivos para *L. (V.) braziliensis* e 16,3% (37/ 227) positivos pela PCR de sangue, e concluiu que equídeos desta região estão infectados com *L. (V.) braziliensis* e poderiam ser fontes de alimento para os flebotomíneos no ambiente peridomiciliar e, conseqüentemente, desempenhar um papel no ciclo da LC.

Em um estudo para se verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em equinos do município de Araçatuba-SP, área endêmica para LV canina e humana, dos 466 equinos testados para a presença de IgG anti-*Leishmania infantum* pelo método de ELISA, 68 (14,59%) apresentaram-se soropositivos. Os

mesmos animais também foram testados por imunocromatografia e apresentaram uma frequência de positivos de 19/466 (4,08%), o que indica que os equinos desta região devem atrair flebotomíneos transmissores das leishmanioses e ressalta a necessidade de investigação mais detalhada sobre o real papel dos equinos, residentes em áreas endêmicas (FEITOSA et al., 2012).

Vedovello-Filho et al. (2008), investigaram a infecção de cavalos por *Leishmania* em áreas rurais endêmicas para LCA, através da utilização do Teste de aglutinação direta (DAT) e da PCR. Num total de 55 animais que tiveram amostras de sangue coletadas, os títulos de anticorpos detectados pelo DAT apresentaram variação de 10 a 640, e 42 (76,3%) animais apresentaram títulos ≥ 20 , enquanto para a detecção de *Leishmania (viannia)* através da PCR, 7,1% (3/42) dos animais mostraram-se positivos.

SOARES et al. (2013), relataram a primeira evidência de infecção por *Leishmania infantum* em *Equus caballus* nas Américas e a primeira infecção mista por *L. infantum* / *Leishmania braziliensis* nesta espécie no mundo. Utilizaram como diagnóstico a presença de parasitas em lesões e aspirados de medula óssea, RIFI e ELISA e para a correta identificação das espécies, utilizaram primers específicos para os complexo *L. infantum* e *L. braziliensis*.

Através dos resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que a utilização do suabe de conjuntiva ocular foi efetiva no diagnóstico de animais infectados por *Leishmania* spp., nas diferentes espécies estudadas, contribuindo para o incentivo do uso de amostras menos invasivas. A presença de animais infectados nos municípios estudados, nos faz sugerir que mais estudos devem ser realizados em municípios do estado de São Paulo, para se verificar a ocorrência das leishmanioses, principalmente nas espécies felina e equina, que ainda são pouco estudadas.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo presente estudo permitem concluir que:

- a) Animais infectados por *Leishmania* spp. foram identificados em 85,71% (06/07) dos municípios estudados, o que sugere a expansão das leishmanioses pelas cidades do estado de São Paulo;
- b) A coleta do suabe da conjuntiva ocular foi um método simples, pouco invasivo, pouco estressante para, cães, gatos e seus proprietários, no caso de animais particulares. O método é fácil, pouco tempo é dispendido pelo técnico na coleta, além de ser um método simples e pouco invasivo, quando comparado à coleta de sangue;
- c) A coleta do suabe da conjuntiva ocular foi um método simples, pouco invasivo, porém incômoda para os equinos, quando comparada à coleta de sangue;
- d) A detecção da infecção por *Leishmania* spp. nos animais, somado à ausência de sinais clínicos nos mesmo indica a condição de portadores sãos destes hospedeiros;
- e) Foram encontrados gatos e equinos positivos para *Leishmania* spp. pela RIFI;
- f) O uso do suabe conjuntival pode ser uma ferramenta importante, em inquéritos epidemiológicos realizados em áreas endêmicas.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; DEANE, L. M. Cutaneous Leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 471-472, 1986.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; FRANCISCO, G. G.; MOMEM, H. Human, Canine and Equine Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an Endemic Area in the state of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n.1, p. 143, 1987.
- ALENCAR, J. E. Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENE. **Anais...**14., 1959, Niterói, RJ.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p.1-12, 2012.
- ALVES, M. F.; PAIXÃO, M. S.; SILVA, D. T.; ALVES, M. L.; PIRAJÁS, G. V.; TENÓRIO, M. S.; BUZETTI, W. A. S.; LUCHEIS, S. B. Hemocultura como ferramenta diagnóstica para Leishmaniose em gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) procedentes de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 192-196, 2011.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- APOLO11. Latitude e longitude das cidades brasileiras. 2013. Disponível em: <<http://www.apolo11.com/latlon.php?uf=sp&cityid=26>>. Acesso em: 15/09/13.
- ARIAS, J. Epidemiología y control de la leishmaniasis en la Américas, por país o territorio. Whashington, **Cuaderno técnico Organización Panamericana de la Salud**, n. 44, 52 p., 1996.
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA JR., A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; BUZZETI, W. A. S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F.; TANIGUCHI, H. H.; CUNHA, E. A.; SANTOS, A. A.; SPESSOTO JÚNIOR, M.; KANETO, C. N.; CAMARGO, C. V. O.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, E. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p.185-193, 2007.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J. J. Wild and synantropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, p. 291–296, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 182 p

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses Vetoriais e Raiva. NOTA TÉCNICA N°/2011 UVR/CGDT/DEVEP/SVS/MS. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. (Nota técnica, 2011).

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

BORCHERS, K.; EBERT, M.; FETSCH, A.; HAMMOND, T.; STERNER-KOCK, A. Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 260-266, 2006.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Grupo de Estudos em leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 4, n. 39, p. 27-39, 2007.

CAMPINO, L. M. Canine reservoirs and Leishmaniasis: Epidemiology and Disease. In: FARREL, J. P **World class parasites**. Norwell: Kluwer Academic, 2002, v. 4, p. 45-57.

CASTRO, E. A.; LUZ E.; TELLES, F. Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; SOCCOL, V. T. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 93 p. 141–149, 2005.

CAVALCANTI, M. P.; DA SILVA, C.G. R.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16 , n. 4, p. 537-542, 2010.

COELHO, W. M. D.; LIMA, V. M. F.; AMARANTE, A. F. T.; LANGONI, H.; PEREIRA, V. B. R.; ABDELNOUR, A.; BRESCIANI, K. D. S. Ocorrência de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em gato doméstico (*Felis catus*) em Andradina, São Paulo, Brasil: relato de caso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 256-258, 2010.

CORTES, S.; MAURICIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTOVÃO J. M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**, v. 55, p. 277-283, 2006.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J. CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 98, p. 12-17, 2004.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149–155, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; MELO, M. F.; SILVA, F. J.; SILVA, A. L.; ALMEIDA, E. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 313–317, 2010.

DA SILVA, S. M.; RABELLO, P. F.; GONTIJO, N. F.; RIBEIRO, R. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICS, M. S. First report of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, n. 174, p. 150-154, 2010.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-469, 1994.

DE MORAIS, R. C. S ; GONÇALVES , S. C ; E SILVA, R. P ; COSTA, P. L , SILVA, K. G ; SILVA, J. F ; BRANDÃO-FILHO, S. P ; DANTAS - TORRES, F.; DE PAIVA - CAVALCANTI , M. *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis* detection in animals and their ectiparasites by PCR and Real Time PCR. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 746.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 4, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95 n. 3, p. 239-243, 2001.

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

DI MUCCIO, T.; VERONESI, F.; ANTOGNONI, M. T.; ONOFRI, A.; FIORETTI, D. P.; GRAMICCIA, M. Diagnostic Value of Conjunctival Swab Sampling Associated with Nested PCR for Different Categories of Dogs Naturally Exposed to *Leishmania infantum* Infection. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 50, n. 8, p. 2651–2659, August 2012.

DUARTE, I. R. M.; ARRUDA, C. C. P.; ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; SOUZA, A. I.; DOURADO, D. M.; COSTA, S. C. G. Comportamento Biológico de *Leishmania* (*L.*) *amazonenses* Isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical** v. 39, n.1, p. 33-40, 2010.

DUNAISKY, M. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais?** 2006, 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A. B.; LIMA, J. B.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; LOPES, U. G.; PEARSON, R. D.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 118-23, 1990.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI FILHO, G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R.; DE JESUS, A. C.; DE ALENCAR, J. T. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 155-163, 1986.

FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B. M.; SESSA, P. A. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of the Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 443, 1987.

FEITOSA, F. L. F.; LEAL, J.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; PERRI, S. H. V.; DE LIMA, V. M. F.; MARCONDES, M. Estudo soroepidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 500-502, 2012.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGÍ, M.; ALBEROLA, J.N.; RAMIS, A.; FERRER, L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 181–185, 2006.

FERREIRA, A. L.; CARREGAL, V. M.; LEITE, R. S.; FERREIRA, S. A.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Comparison of Real-Time PCR and KDNA PCR-Hybridization for diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Symptomatic and Asymptomatic dogs using four different clinical samples. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013c. p. 580.

FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. p. 255-262.

FERREIRA, S. A.; ALMEIDA, G. G.; SILVA, S. O.; VOGAS, G. P.; FUJIWARA, R. T.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. A new practical approach based on nasal swab for diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs from an urban and endemic area in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013a. p. 223.

FERREIRA, S. A.; ALMEIDA, G. G.; SILVA, S. O.; VOGAS, G. P.; FUJIWARA, R. T.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2013b.

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257–263, 2008.

FERREIRA, S. A.; LEITE, R. S.; ITUASSU, L. T.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, D. M.; FUJIWARA, R. T.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 6, n. 4, p. 1-9, 2012.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Hoechst Roussel Vet, 1999. p. 6-10.

FERRER, L.; RABANAL, R.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D. Identification of leishmania amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, n. 44, p. 194-196, 1988.

FIGUEIRA, L.P.; ZANOTTI, M.; PINHEIRO, F. G.; FRANCO, A. M. R.; Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** n. 41, p. 512-514, 2008.

FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; CARDOSO, M. A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J. C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E. M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p.497-503, 1999.

FREITAS, J. C. C.; LOPES-NETO, B. E.; ABREU, C. R. A.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S. L.; REIS, A. B.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Profile of anti-Leishmania antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 705–709, 2012.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Guia de vigilância epidemiológica**. Fundação Nacional de Saúde. 5. ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842 p.

GARCIA, A. L.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, K. W.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; AREVALO, J.; BAÑULS, A. L.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, p. 109-116, 2005.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of

Leishmania in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 234–241, 2007.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. Leishmania infantum infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 1, p. 339–342, 1987.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p. 123–30, 2011.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.

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

GRIMALDI JR., G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; AZEVEDO, C. T. de; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54–59, 2012.

HAESEBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A.; RIJSEN, B. V.; COX, E. Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. **Veterinary Microbiology**, v. 26, n. 1–2, p. 95–101, 1991.

HU, X. S.; YANG, W. T.; LU, H. G.; YAN, H. P.; CHENG, J. P.; MA, Y.; JIN, B. Q.; ZHANG, T. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **Journal Parasitology**, v. 86, n.4, p. 822–826, 2000.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 99–113, 2003.

IRWIN, P. J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 581–593, 2002.

JOHN, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A. Rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 192, p. 408-408, 1991.

KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; DOMINGO, M.; SCHÖNIAN, G.; ZAHNER, H.; BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 9–17, 2002.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHÖNIAN, G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 5, n. 6, e1155, p. 1-16, June, 2011.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 210-215, 2002.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR., J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5444-5444, 1991.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** v. 1, n. 2, p.13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecology and epidemiology: new world. In: Peters W, KILLICK-KENDRICK R. Ed. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press Inc., 1987. v. 1, p. 291.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: FEG COX; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed.) Topley & Wilson's **Microbiology and Microbial Infections**. Parasitology, 9th ed., v. 5, p. 241-266, Arnold, London.

LEITE, R. S.; BARBOSA, A. D.; FERREIRA, A. L. C.; ANDRADE, A. S. R. PCR screening of visceral leishmaniasis by conjunctival swab in domiciled dogs of north region of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 675.

LEITE, R. S.; FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 201–206, 2010.

LEITE, R. S.; MENDES, V. C.; FERREIRA, A. L. C.; ANDRADE, A. S. R. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 36-41, 2011.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19-27, 2002.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÍ, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 10-17, 2012.

LOW, H. C.; POWELL, C. C.; VEIR, J. K.; HAWLEY, J. R.; LAPPIN, M. R.; Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydophila felis*, and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 6, p. 643-648, 2007.

MAHBOUDI, F.; ABOLHASSANNI, M.; TEHRANI, S. R.; AZIMI, M. Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species level by PCR. **Scand Journal Infectious Diseases**, v. 34, p. 756-458, 2002.

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

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 4, p. 555-559, 2008.

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 142-144, 2009.

MAIR, T. S.; WILLS, J. M. *Chlamydia psittaci* infection in horses: results of a prevalence survey and experimental challenge. **Veterinary Record**, v. 130, p. 417-419, 1992.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 203–206, 2004.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked Immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 1-9, 1996.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251-262, 2004.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 13-30.

MARCUSSI, L. M.; SKRABA, C. M.; PERLES, T. F.; PEDROSO, R. B.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Evaluation of Specific Primers for species identification of *Leishmania (V.) braziliensis*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n.1, p. 64-71, 2013.

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

MARQUES, C. S.; SANTOS, M. F.; POMBA, C.; GOMES, L.; DUARTE, A.; MEIRELES, J.; TAVARES, L.; GOMES, G. S.; FONSECA, I. P.; Detection of *Leishmania* infection in Cats by qPCR of blood and conjunctival swabs and by indirect immunofluorescence assay. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 242.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology** v. 145, p. 267–273, 2007.

MARZOCHI, M. C. As leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MAZZA, S. Leishmaniosis cutánea en el caballo y nueva observación de la misma em el perro. **Boletín del Instituto de Clínica Quirúrgica**, n. 3, p. 462-464, 1927.

METTLER, M.; GRIMN, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent anti-body test, and to rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5515-5519, 2005.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 56-72.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae:

Phlebotominae) **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, 2007.

MIRANDA, C.; MARQUES, C. C. A.; MASSA, J. L. Sensoriamento remoto orbital como recurso para análise da ocorrência da leishmaniose tegumentar americana em localidade urbana da região Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, n. 30, p. 455-463, 1998.

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 da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.4, p. 365-368, 2008.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F. DE; GARCIA, J. F. Avaliação da Reação em cadeia pela Polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V. F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA-NETO, M. P.; PIRMEZ, C.; RANGEL, E.; SCHUBACH, A.; GRIMALDI JR. G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memorial Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 427-435, 1988.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A Study of Cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Fluorescent Antibody Test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; MINEO, T. W. P.; BASON, M.; DAY, M. J.; MACHADO, R. Z. IgG subclass profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 16-22, 2009.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; PEREIRA, V. F.; BENASSI, J. C.; DA SILVA, T. D.; BUZETTI, W. A. S. Conjunctival Swab as a Specific and sensitive tool in the

diagnosis of canine leishmaniasis using generic and specific primers. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 667.

OZENSOY TOZ , S.; KARAKUS , M.; ERTABAKLAR , H.; ARSERIM , S. K.; PASA , S.; ALKAN , M. Z.; OZBEL , Y. The diagnosis of naturally infected dogs by Leishmania parasite using conjunctival swab Nested PCR and correlation with indirect Immunofluorescence Antibody Test. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 224.

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

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PAPADOPOULOU, C.; KOSTOULA, A.; DIMITRIOU, D.; PANAGIOU, A.; BOBOJIANI, C.; ANTONIADES, G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. **The Journal of Infectious**, v. 50, p. 53-60, 2005.

PASSOS, V. M. A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P. A. F.; NOLPINI, A. C.; GONTIJO, C. M. F.; DEGRAVE, W.; ROMANHA, A. J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant specie infecting pacientes with american cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast, Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 251-258, 1999.

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. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 19-20, 1996.

PENNISIA, M. G.; SOLANO-GALLEGO, L. Feline leishmaniosis: top ten frequently asked questions (FAQ). In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 989.

PENNISI, M.G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution**. Intervet International, Boxmeer, p. 39–48, 2002.

PENNISI, M. G. La leishmaniosi felina dalla A alla Z. In: Ed. Gruppo di Studio sulla Leishmaniosi Canina (Ed.), **Leishmaniosi canina**. Edizioni Veterinarie, p. 59–64, 2010.

PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; PERSICHETTI, M. F.; MASUCCI, M.; VITALE, F. Feline Leishmaniosis in Italy: Retrospective Evaluation of 24 clinical cases. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 883.

PENNISI, M. G.; REALE, S.; LO GIUDICE, S.; MASUCCI, M.; CARACAPPA, S.; VITALE, M.; VITALE, F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with Allopurinol. **Veterinary Research Communications**, v. 20, n. 2, p. 301-303, 2005.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Diagnóstico molecular das Leishmanioses: contribuição ao Programa e Controle da LVA no estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 68, p. 4-13, 2009.

PEREIRA, V. F. **Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina por PCR**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PETERSEN, C. A. Leishmaniasis, an Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 182-188, 2009.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, A. F.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 255-257, 2009.

PINTO, C. M. **Ocorrência de Leishmania sp. em animais domésticos e silvestres em Capão Bonito, São Paulo, Brasil**. 2004. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PISANI, E. H. R.; BARROS, P. S. M.; ÁVILA, F. A. Microbiota conjuntival normal de equinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 261-265, 1997.

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, p. 181–191, 2002.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C.; BUZETTI, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

QUEIROZ, P. V.; MONTEIRO, G. R.; MACEDO, V. P.; ROCHA, M. A.; BATISTA, L.M.; QUEIROZ, J. W.; JERONIMO, S. M.; XIMENES, M. F. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 267-273, 2009.

RAMOS-VARA, J. A.; ORTIZ-SANTIAGO, B.; SEGALÉS, J.; DUNSTAN, R. W. Cutaneous Leishmaniasis in Two Horses. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 731-734, 1996.

RAVEL, S.; CUNY, G.; REYNES, J.; VEAS, F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, v. 59, n. 3, p. 187-196, 1995.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 289-290, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. p. 214-266.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 267-275, 1990.

ROLÃO, N.; MARTINS, M. J.; JOÃO, A.; CAMPINO, L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite** v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

ROSA, R.; RODRIGUES, O. R.; MARQUES, C.; SANTOS-GOMES, G. M. *Leishmania infantum*: soluble proteins released by the parasite exert differential effects on host immune response. **Experimental Parasitology**, v. 109, p. 106-114, 2005.

ROSSI, C. N.; SOBRINHO, L. S. V.; NUNES, C. M.; LIMA, V. M. F.; TOMOKANE, T. Y.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Comparison among Enzyme- Linked- Immunosorbent Assay with two distinct conjugates and indirect fluorescent antibody test for the diagnosis of feline visceral leishmaniasis. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 565.

ROUGERON, V.; CATZEFLISB, F.; DE MEEÛS, T.; BAÑULS, 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.

SAMUELSON, D. A.; ANDRESEN, T. L.; GWIN, R. M. Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 10, p. 1240-1242, 1984.

SANTA-ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, G. P. L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M. C. A.; SANTOS, E. G. O. B.; SILVA, V. L.; PACHECO, R. S.; MOUTA-CONFORT, E.; CONCEIÇÃO, N. F.; ANDRADE, M. V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica (CVE). Leishmaniose Visceral Americana Humana. **Distribuição do número de casos e óbitos de LVA segundo município e GVE de infecção. Estado de São Paulo, 2010 a 02/05/2013**. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica (CVE). Leishmaniose Tegumentar Americana Humana. **Casos Confirmados, segundo GVE e Município de Residência e Ano de Diagnóstico, 2007 a 25/04/2013, Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo**. São Paulo: SES, 2006. 160 p.

SAVANI, E. S. M. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'ÁURIA, S. R. N.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 120 p. 229-233, 2004.

SAVANI, E. S. M. M.; GALATI, E. A. B.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; DAMASCENO, J. T.; BALDUINO, S. A. Inquérito Sorológico sobre Leishmaniose Tegumentar Americana em cães errantes no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 6, p. 629-632, 1999.

SCHLEIN, Y. Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, p. 255-257, 1993.

SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, F. B.; PEREIRA, S. A.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, I. B.; ANDRADE, M. V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M. C. A.; American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural

infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165–167, 2004.

SILVA, A. V. M.; CÂNDIDO, C. D. S.; PEREIRA, D. P.; BRASIL, R. P.; CARREIRA, J. 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, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. Short Report: Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 896-898, 2001.

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

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; ABRANTES, T. R.; BARBOSA FILHO, C. J. L.; FIGUEIREDO, F. B. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 195, p. 252–253, 2013.

SHAW, J. J.; LAINSON, R.; MCMAHON-PRATT, D.; DAVID, J. R. *Serodemes of the Leishmania braziliensis complex*. In: *Leishmania Taxonomie et Phylogenese. Applications eco-epidemiologiques* (Coll Intern CNRS/INSERM, 1984). France: IMEEE, Montpellier, p. 179-183, 1986.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M. R. F.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA-LIMA, J. W. BEVILAQUA, C. M. L.; PRATA-JÚNIOR, 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, p. 199–208, 2005.

SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINI, P.; MARANHÃO, R. P. A.; SILVA FILHO, J. M.; MELO, M. N.; PALHARES, M. S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, 2013, Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.014>>. Acesso em: 31 jul. 2013.

SOLANO-GALLEGO L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7–12, 2004.

SOLANO GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; SERRA, R.; GALLEGO, M.; RAMIS, A.; FONDEVILLA, D.; FERRER, L. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 320–323, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; HEGARTY, B.; ESPADA, Y.; LULL, J. BREITSCHWERDT, E. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 274–277, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and sorology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 139, p. 560-3, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-Sectional Serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n.4, p. 676–680, 2007.

SPANAKOS, G.; PIPERAKI, E. T.; MENOUNOS, P. G.; TEGOS, N.; FLEMETAKIS, A.; VAKALIS, N. C. Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 46-53, 2008.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute Incorporation. **SAS User's guide**: statistics. 8. ed. Cary: SAS, 2001.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GOMEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1779-33, 2004.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONCALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

TASCA, K. I.; BUZETTI, W. A. S.; TENORIO, M. S.; PAULAN, S. C.; LIMA, F. L.; QUEIROZ, N. M. G. P.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NEVES, M. F.; NORONHA, A. C. F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.

THOMAZ, S.V.T.; TRUPPEL, J.H.; OTOMURA, F.; TEODORO, U.; MASSAFERA, R.; DALAGRANA, L.; CATARINO, C.M.; COSTA - RIBEIRO, M.C.V.; COSTA FERREIRA, M.E. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in equids from areas endemic for American Cutaneous Leishmaniasis in Southern Brazil: Serological and Molecular study. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...**Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 811.

VEDOVELLO-FILHO, D.; JORGE, F.A.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. American Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the North-Central Mesoregion of Paraná State, Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 149–155, 2008.

VERONESI, F.; Fiorentino, E.; DI Muccio, T.; Scalone, A.; GRAMICCIA, M. Nested-PCR Conjunctival swab for the diagnosis of *Leishmania infantum* infection in cats. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 5., 2013, Porto de Galinhas, Pernambuco. **Abstract Book...** Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil: World Congress on Leishmaniasis, 2013. p. 712.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C.O.; SALES, C.C.; MAGALHAES, A.V. Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania braziliensis braziliensis* – Bahia, Brasil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, n. 81, p. 237-238, 1986.

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

VITA, S.; SANTORI, D.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline Leishmaniasis and Ehrlichiosis: Serological Investigation in Abruzzo Region. **Veterinary Research Communications**, v. 29(Suppl. 2), p. 319–321, 2005.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1. p. 31-37, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis. **Report of a meeting of WHO Expert Committee on the control of Leishmaniasis, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. WHO technical report series; n. 949. Geneva, p. 22-26, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis. **Technical Report Series, World Health Organization**, Geneva, n. 793 p. 1–158, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: The Leishmaniasis and Leishmania/HIV Co-Infections. **WHO fact sheet 116**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000.

YOSHIDA, E.L.A.; CORREA, F.M.A.; MARQUES, S.A.; STOLF, H.O.; DILLON, N.L.; MOMEN, H.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *Leishmania braziliensis braziliensis*) in the South-west region of São Paulo state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 133-134, 1990.

XAVIER, C. Frases. 2013. Disponível em: < <http://frases.globo.com/chico-xavier/4941> >. Acesso em: 26 Set. 2013.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL NaCl – Salting out (LAHIRI; NURNBERGER, 1991, com modificações)

1. Descongelar as amostras;
2. Transferir 1,0ml de sangue de cada amostra para microtubos plásticos com capacidade de 1,5 ml (livres de DNAses e RNAses), identificados;
3. Adicionar 300 µl de solução de lise, homogeneizar por inversão e no vórtex e centrifugar (13.000 rpm por 1 minuto);
4. Descartar o sobrenadante, vertendo o microtubo no frasco de descarte.
5. Repetir os passos 3,4 e 5 tanto quanto for necessário, até que o pellet fique limpo (branco);
6. Lavar o microtubo, adicionando 1,0ml de água ultrapura, usando movimentos leves para não mover o pellet.
7. Verter e secar em papel absorvente em posição invertida;
8. Para cada amostra, preparar a seguinte solução:
 - a) 80 µl da solução tampão de proteinase K;
 - b) 280 µl de água ultrapura;
 - c) 20 µl de SDS (10%);
 - d) 10 µl de proteinase K (25 mg/ml).

Volume total= 390 µl

9. Distribuir a solução nos microtubos que já estão com os pellets que contém DNA;
10. Aquecer a 54°C, agitando periodicamente, durante 3 horas;
11. Manter a 4°C por aproximadamente 15 minutos;
12. Adicionar 120µl de solução de NaCl a 5M;
13. Passar cada amostra no vórtex, em velocidade máxima por 8 segundos;
14. Centrifugar (13.000 rpm por 10 minutos);
15. Preparar e identificar novos microtubos;
16. Transferir 400µl do sobrenadante para seu respectivo tubo;
17. Adicionar 1,0ml de etanol absoluto;

18. Homogeneizar por inversão duas a três vezes;
19. Manter no freezer -80°C, durante 30 minutos ou *overnight*;
20. Centrifugar a (12.000 rpm por 20 minutos) a 4°C;
21. Descartar o sobrenadante e deixar os microtubos invertidos sobre papel absorvente;
22. Colocar em banho seco por 15 minutos;
23. Adicionar 40µl de água ultrapura e homogeneizar;
24. Aquecer a 54 °C.
25. Utilizar ou Congelar.

APÊNDICE B – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SUABE DE CONJUNTIVA OCULAR NaCl – Salting out (LAHIRI; NURNBERGER, 1991, com modificações)

1. Para cada microtubo com suabe, adicionar 300µl de solução tampão de proteinase K;
2. Homogeneizar por 8 segundos em vórtex e deixar em temperatura ambiente durante 20 minutos;
3. Recuperar 160µl do microtubo e distribuir em novos microtubos identificados, já preenchidos com 390µl com a seguinte solução:
 - a) 200µl de água ultrapura
 - b) 20µl de SDS (10%)
 - c) 10µl de proteinase K (25mg/ml)
4. Homogeneizar em vórtex por 8 segundos;
5. Aquecer a 54°C, agitando periodicamente, durante 3 horas;
6. Manter a 4°C por aproximadamente 15 minutos;
7. Adicionar 120µl de solução de NaCl a 5M;
8. Passar cada amostra no vórtex, em velocidade máxima por 8 segundos;
9. Centrifugar 13.000 rpm por 10 minutos;
10. Preparar e identificar novos microtubos;
11. Transferir 400µl do sobrenadante para seu respectivo tubo;
12. Adicionar 1,0ml de etanol absoluto;
13. Homogeneizar por inversão duas a três vezes;
14. Manter no freezer -80°C, durante 30 minutos ou *overnight*;
15. Centrifugar a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C;
16. Descartar o sobrenadante e deixar os microtubos invertidos sobre papel absorvente;
17. Colocar em banho seco por 15 minutos;
18. Adicionar 40µl de água ultrapura e homogeneizar;

19. Aquecer a 54 °C.

20. Utilizar ou Congelar.

ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL COM ILUSTRA® BLOOD GENOMICPREP MINI SPIN KIT, GE HEALTHCARE®

1. Adicionar no frasco de proteinase K liofilizada 1,5ml de água ultrapura, homogeneizar no vórtex e armazenar a 4°C;
2. Adicionar 24 ml de álcool absoluto no Tampão tipo 6 e homogeneizar por inversão;
3. Em um microtubo, adicionar 200µl de sangue total em temperatura ambiente e 400µl de *Lysis buffer type 10*
4. Homogeneizar no vórtex
5. Deixar 10 minutos em temperatura ambiente;
6. Transferir o conteúdo do tubo para um novo tubo com coluna;
7. Centrifugar a 11.000 rpm , durante 1 minuto;
8. Adicionar 500µl de *Lysis buffer type 10*;
9. Centrifugar a 11.000 rpm, durante 1 minuto;
10. Adicionar 500µl de *Wash buffer type 6*
11. Centrifugar a 11.000 rpm, durante 3 minutos;
12. Colocar a coluna em um novo microtubo livre de DNAses e RNAses;
13. Adicionar 200µl de *Elution buffer type 5*, aquecido a 70 °C;
14. Deixar 1 minuto em temperatura ambiente;
15. Centrifugar a 11.000 rpm, durante 1 minuto;
16. Recolher o DNA eluído;
17. Utilizar ou estocar a -20 °C.