



Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Lucilene Simões Mattos

O GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) COMO
POTENCIAL HOSPEDEIRO RESERVATÓRIO DE
Leishmania (Viannia) braziliensis

Fortaleza-Ceará

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

O GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*) COMO
POTENCIAL HOSPEDEIRO RESERVATÓRIO DE
Leishmania (Viannia) braziliensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros e Aves

Orientadora: Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

Fortaleza- Ceará

2005

S531g

Simões-Mattos, Lucilene.

O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (Viannia) braziliensis*/Lucilene Simões Mattos. – Fortaleza, 2005.

23 lp.; il.

Orientadora: Prof. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) –
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. gato doméstico (*Felis catus*), 2. hospedeiro reservatório, 3. *Leishmania braziliensis*. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. II. Título.

CDD:599.74428

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Autor: Lucilene Simões Mattos

Defesa em: 14/12/2005

Conceito obtido:

Nota obtida:

Banca Examinadora

Claudia Maria Leal Bevilaqua, Prof^a. Dr^a.

Orientadora

Carlos Roberto Franke, Prof. Dr.
Examinador

Ana Maria Jansen-Franke, Prof^a. Dr^a.
Examinadora

Antônio Wilson Vasconcelos, Prof. Dr.
Examinador

Izabel A. B. Vasconcelos, Prof^a. Dr^a.
Examinadora

FICHA TÉCNICA

Instituições Executoras

Laboratório de Doenças Parasitárias/FAVET/UECE.

Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical (NMT)/UFC

Laboratório de Entomologia da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA/CE)

Instituições Colaboradoras

- 1) Laboratório de Imunopatologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA
- 2) Divisão de Controle de Endemias - Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.
- 3) Laboratório de Patologia Veterinária - União Pioneira de Ensino Superior (UPIS)

Equipe executora

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE

Claudia Maria Leal Bevilaqua, Prof. Dr^a. (Médica Veterinária);

Marcos Renato Franzosi Mattos, Prof. Dr. (Médico Veterinário);

Kelma Maria Souza Bastos, Prof. Dr^a. (Médica Veterinária);

Carina de Magalhães Holanda (Estudante de Medicina Veterinária/Bolsista IC/UECE);

Fernanda Cristina Macedo Rondon (Estudante de Medicina Veterinária/Bolsista IC/UECE);

Fernanda Menezes de Oliveira e Silva (Estudante de Medicina Veterinária/Bolsista IC/UECE/FUNCAP);

Iara Tersia Freitas Macedo (Estudante de Medicina Veterinária/Bolsista IC/FUNCAP/CNPq);

Priscila Teixeira de Souza (Estudante de Medicina Veterinária/estagiária)

Cynthia Levi Baratta Monteiro (Estudante de Medicina Veterinária/estagiária).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC

Margarida Maria de Lima Pompeu, Prof^ª. Dr^ª. (Médica);

Ivo Castelo Branco Coelho, Prof. Dr. (Médico);

Maria Jânia Teixeira, Prof^ª. Dr^ª. (Farmacêutica);

Érika F. Mota, MSc. (Bióloga) doutoranda em Bioquímica da UFC;

Zirlane Castelo Branco Coelho, MSc. (Farmacêutica);

Patrícia Gomes de Matos Teixeira, MV (médica veterinária);

José Rômulo Prata Júnior (estudante de Biologia/estagiário);

Mércia Sindeaux Frutuoso (estudante de Biologia/ Bolsista IC/CNPq);

Vera Seldom (Técnica de laboratório).

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – FUNASA

José Wellington de Oliveira Lima, Prof. Dr. (Médico/UECE);

Raimundo Nonato de Sousa (Entomologista - técnico);

Francisco Vieira Gadelha (Técnico de campo);

Antonio Mauricio de Oliveira (Técnico de campo);

José Helder Magalhães (Técnico de campo);

José Mauricio de Carvalho Pinto (Técnico de campo);

José Jerisvaldo Uchoa Pinto (Técnico de campo);

Raimundo Almeida Filho (Técnico de campo).

CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ (FIOCRUZ/BA)

Aldina Barral, Prof^ª. Dr^ª. (Médica/FIOCRUZ-BA).

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ – SESA/CE

Antonia Ivoneida Aragão, Dr^a. (Farmacêutica/Bioquímica)

UNIÃO PIONEIRA DE ENSINO SUPERIOR (UPIS)

Erno Tury, Prof. Dr. (Médico Veterinário);

Roselene Ecco, Prof^a. MSc (Médica Veterinária).

“Engraçado, costumam dizer que tenho sorte. Só eu sei que quanto mais eu me preparo mais sorte eu tenho.”

Antony Robbins

A todos os animais experimentais que, sem compreender o por que, compartilham conosco o direito sobre suas existências, doando-se para a ciência e fazendo o bem.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Com certeza, a maioria das pessoas que escreve uma tese deixa esta parte do trabalho para escrever por último, não é? É o momento de extrema reflexão...é o momento de estar diante de um filme 35 mm rodado apenas uma vez! Momento de prazer extremo, pois afinal...todos nós, quer sejamos atores principais, quer co-adjuvantes, ou apenas figurantes, fizemos de toda essa etapa um filme para ser celebrado para o resto da vida! Entramos para a história! Sim amigos! Entramos para a história...Para alguns, história da Carochinha, para outros...história da Vida Real! História de Vida Real para quem acreditou...História de Vida Real para quem sequer imagina, até hoje, o que é uma verdadeira história de Vida Real! E será que eu sei?

E diante dessa história...não poderia deixar de escrever nessas linhas...limitadas linhas por uma regra...mas vou quebrar as regras! Porque afinal elas existem para serem quebradas! Então vá lá! Quem tiver paciência que leia! Caso contrário, considere essa parte apenas um anexo desta tese, que como “as regras” ditam...anexos não são necessários serem lidos, apenas se quiser...

Caro leitor paciente, e mais do que tudo...curioso leitor... deixo nessa linhas e, aliás tenho que me limitar, pessoalmente falando, porque caso contrário me estenderei mais do que a própria revisão de literatura da tese, alguns agradecimentos que se farão medíocres diante de tão valioso aprendizado que obtive. Aprendizado que obtive com os grandes mestres intelectuais, aprendizado que obtive, sem sombra de dúvidas com as pessoas que se fizeram anônimas até agora, mas que sempre estarão presentes aqui...nessas folhas brancas...que com certeza o tempo as deixarão amarelas. E quando isso acontecer...ah! Quando isso acontecer...talvez estaremos em um pequeno “birô” (como dizem os cearenses) fazendo parte, talvez, de uma nova história da Vida Real! E aí eu acreditarei em você! Você que sonha e que resolveu fazer uma nova história de Vida! E você, diante desse amontoado de papéis, se perguntaria a quem eu mais teria

infinito agradecimento? Pois então vamos ao começo de tudo...bem lá no comecinho de tudo! Quem seria o destinatário “mor” de meus agradecimentos? Ora vejamos! Algumas pessoas me julgam ser pessoa atéia! Como diz meu caro amigo Fernando Pessoa que “[...] isto talvez é ridículo aos ouvidos de quem não sabe o que é olhar para as cousas...não compreende quem fala delas!” E assim...meu primeiro agradecimento vai a Você! Perdoe-me a intimidade! Mas Você só pode ser mais íntimo do que qualquer um! Afinal, sabes tudo de mim! Sabes até quando indaguei a Sua existência! Obrigada por colocar na minha vida todas as más e boas pessoas que se passaram por aqui, exatamente neste filme 35mm! Das más, ou melhor dizendo, daquelas que enriqueceram o meu caminho no aprendizado da vida, quer com intenção, quer sequer sem intenção, meu muito obrigada! E quantas vezes não agi da mesma forma com algumas pessoas? Às pessoas do bem, deleito meus agradecimentos à pelo menos alguns deles...os que eu consigo ter em minha vaga mente moralmente formada! E em se falando de vida...meus pais...que até hoje não conseguem entender o por que de tanto estudo sem ao menos uma retribuição financeira digna! Caros pais...Ayrton Ferreira Simões (China) e Aurelina Leite Simões (Lela), a vida hoje é muito diferente de outrora, quando se “estar bem de vida” dependia apenas de trabalho! Mas tenham a certeza de que “quem corre de gosto não se cansa” e assim estou! Obrigada meus pais pela vida que me deram, pelos ensinamentos, pela oportunidade do estudo e, sobretudo, pela conduta moral! Sou hoje mais do que apenas um pedacinho de vocês!

Mas parece que meus agradecimentos estão cronologicamente definidos. Então vamos lá! Para não me estender...passo agora a meu marido Marcos Renato Franzosi Mattos. O que posso dizer dele? Qualquer coisa que escrevo nessas linhas sobre Renato nada mais seria do que uma verdadeira declaração de Amor! Mas...declarações de Amor não são confidenciais!? Mas nestas linhas destas brancas páginas, ou amarelas, aliás, para quem nos conhece sabe que nosso Amor não é, e nem nunca será confidencial e está aí para quem quiser ou precisar de exemplo. Obrigada meu amor pelo seu afeto e por sua imensa paciência com o meu ser. A você dedico também essa tese que é parte de sua vida!

E quando aqui cheguei na Terra do Sol...encontrei Maria Jânia Teixeira, hoje Dr^a. Maria Jânia Teixeira! Sonhadora Jânia! Dividiu sonhos e pesadelos...e aqui estamos!

E... o mais engraçado foi quem comprou esses sonhos! Dr^a Claudia Maria Leal Bevilaqua, minha orientadora! Como hoje me lembro que Dr^a Claudia me “apertava” dizendo-me que eu deveria trabalhar com *Haemonchus contortus*, sua grande paixão! Felizmente, ela acreditou na minha paixão! As minhas leishmânias! E o que é mais interessante...deixou ser seduzida por elas! Hoje, Dr^a Claudia Bevilaqua trabalha com *Leishmania*! É lógico que também com elas! Obrigada Dr^a Claudia por ter apostado em mim e na minha luta. Obrigada por ter me dado a grande oportunidade de participar da revista Ciência Animal...ah...que saudades!

Nesse meio tempo, uma grande pessoa...profissional e amiga...passou a ser parte da orientação. Dr^a Margarida Maria de Lima Pompeu, ou para os íntimos, apenas a “Guidinha”! Aliás, de “Guidinha” fica apenas a doçura e a meiguice porque é mais “Guidona” do que muitos de nós juntos! Obrigada pela orientação e por todos os ensinamentos da Vida Real! Você é hoje para mim o exemplo de ética e profissionalismo!

Meus agradecimentos são direcionados também ao Dr. José Wellington de Oliveira Lima (ZW) que em muito contribuiu para esta tese. “Eita!” Acho que faltou tempo para nós “ZW”! Mas sempre há tempo...e eu espero aprender ainda muito com você!

Não poderia deixar de mencionar a valiosa ajuda técnica e intelectual de Dr. Ivo Castelo Branco Coêlho que desde o começo foi peça muito importante neste trabalho.

Bom...gostaria agora de agradecer a todos que fizeram parte da equipe executora e colaboradora do trabalho. Como gosto de transgredir as regras...adicionei um item a mais na minha tese, “Ficha Técnica” com a “Equipe executora” e a “Equipe

Colaboradora”. A todos, sou imensamente grata...nada seria possível sem vocês!
Obrigada Vera, Lucineide e Herivaldo.

À Universidade Estadual do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, à FUNCAP e ao CNPq muito obrigada pela credibilidade e pela oportunidade de formação.

À Sociedade brasileira, com uma grande maioria tão marginalizada, e quem mal sabe quem sou e que apoiou, sem saber, meu trabalho sou imensamente grata! Posso dizer a ela apenas uma coisa: Eu durmo com a consciência tranqüila porque tenho a certeza que fiz juz ao apoio recebido de todos os brasileiros!

Um agradecimento mais que especial é dirigido a todos aqueles que compõem minhas referências bibliográficas. Àqueles que se fizeram eternos na escrita. Obrigada por terem participado de minha história de Vida Real!

Aos meus amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR) da UECE que sempre estiveram comigo em todos os passos desta caminhada, quer seja em apoio moral, quer seja em apoio técnico. Em se falando de apoio moral...ôh Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo...ou simplesmente “Carol”. Quanto “apoio moral” sobrava naquela mesa do *Society Grill*! E quando não cabia mais na mesa... “o apoio moral” se acumulava no chão, embaixo da mesa! E o que é mais interessante...nunca precisamos sair de lá apoiadas! Obrigada amiga por se fazer sempre presente em minha vida!

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução de Carnívoros...puxa vida...o que posso dizer de vocês? Que sempre estava eu lá...nas listas das “vaquinhas” para festas...que sempre estava eu lá...nas festas de aniversários e comemorações...que sempre estava eu lá...nas apresentações de reprodução...que sempre estava eu lá...xeretando tudo o que acontecia! Obviamente não era por conta do Renato...era porque eu era xereta mesmo! Aprendi “pacas” com vocês...meus eternos amigos...em especial:

Alexandre Rodrigues Silva, Ticiania Franco de Oliveira e Silva, Rita de Cássia Soares Cardoso e Prof^ª Lúcia Daniel Machado da Silva.

Aos meus amigos do Laboratório de Reprodução de Caprinos...mas existe alguém que se destaca nessa equipe...Edilson Soares Lopes Júnior...grande pessoa...exemplo de pessoa e profissional...exemplo de caráter! Obrigada amigo por fazer parte da minha (nossa) vida!

Aos demais laboratórios e professores do PPGCV, meu muito obrigada a total força que me deram!

Aos professores da UECE, em especial à Dra. Kelma Maria Souza Bastos que me deu todo apoio durante todo o tempo de mestrado e doutorado. Nunca vou esquecer da credibilidade que depositou em minha pessoa e em meu trabalho. Espero não ter lhe decepcionado!

A todas as “vetgirls” que trabalharam diretamente comigo na tese como bolsistas de iniciação científica ou estagiárias, em ordem cronológica: Carina de Magalhães Holanda, Fernanda Cristina Macedo Rondon, Fernanda Menezes de Oliveira e Silva, Iara Tersia Freitas Macedo, Priscila Teixeira de Souza, Cynthia Levi Baratta Monteiro. Espero que tudo o que vocês passaram comigo tenha servido para confundir mais ainda a cabecinha de vocês...porque só assim a gente um dia saberá o que quer da vida! Não poderia deixar de esquecer a única “biogirl” da equipe: Mércia Sindeaux! Agradeço também a companhia agradável e a colaboração no trabalho de Érika Mota (UFC) e Zirlane Castelo Branco Coêlho (UFC).

Ao final destas brancas folhas...senão amarelas, agradeço à presença de uma pessoa que tão pequenina é tão grande no meu ser...Rafaela Simões Mattos, a Rafa, minha filha, razão disso tudo! Obrigada meu neném por aparecer tão de repente em nossas vidas! E se não fosse assim... E ainda...meu muito obrigada é direcionado à babá de Rafa, Jaqueline Santos de Lima (Jaca), que de forma indireta, em muito

contribuiu nesta fase final da tese dando toda a atenção e carinho a minha filha durante as vastas horas em que eu permanecia em frente do computador e de vários papéis. À Maria Aparecida da Silva Ricardo (Cidinha), minha secretária do lar, obrigada também por cuidar de mim e de minha família!

Sem mais...o curioso e paciente leitor...conheceu um pouco de todos nós!
Obrigada a você também!

RESUMO

Diante dos vários e emergentes relatos infecção de gatos domésticos (*Felis catus*) pelos protozoários *Leishmania* sp, incluindo *Leishmania (Viannia) braziliensis (LVb)*, tem sido especulada a potencialidade destes animais como reservatórios do parasito em áreas endêmicas. Objetivando clarear parte desta especulação este trabalho apresenta seis experimentos distribuídos em três etapas gerais: (1) conhecer suscetibilidade de gatos à infecção experimental com *LVb*; (2) verificar a competência e a capacidade de infecção de flebótomos após contato com gatos; (3) avaliar a ocorrência de infecção natural de gatos por *LVb*. Para comprovar a primeira etapa foram realizadas três infecções experimentais via intradérmica com uma concentração de 10^7 promastigotas seguindo os protocolos: (a) duplos e simultâneos sítios (orelha e nariz – n= 13) e (b) sítio único (orelha – n=18), ambos (a e b) com cepa isolada de paciente humano; (c) inóculos simples (orelha – n=6) com cepa isolada de caso felino. Os gatos submetidos aos inóculos duplos com cepa de *LVb* humana apresentaram quadro clínico-patológico semelhantes aos casos humanos Leishmaniose Tegumentar Americana e com pico de anticorpos anti-*Leishmania* coincidindo com o decréscimo do tamanho das lesões. Entretanto, o grupo submetido ao inóculo único, apesar de semelhanças no período de incubação, teve o desenvolvimento das lesões mais tardiamente. Por outro lado, o grupo inoculado com cepa de *LVb* felina não apresentou alteração clínica digna de nota. Para avaliar a segunda etapa, (a) gatos não-infectados com *Leishmania* sp foram submetidos aos flebótomos para verificar taxas de ingurgitamento, bem como (b) a preferência alimentar destes dípteros em condições de campo em relação a potenciais hospedeiros reservatórios de *LVb*, incluindo o gato. Além disso, (c) os gatos da segunda infecção experimental com *LVb* foram submetidos ao xenodiagnóstico. De maneira geral, a taxa de ingurgitamento dos flebotomíneos em contato com os gatos e em condições laboratoriais foi alta. Ademais, o trabalho a campo mostrou uma menor atratividade do gato quando comparado ao cão, porém, as fêmeas ingurgitadas foram numericamente superiores na armadilha do gato quando comparada ao cão. No xenodiagnóstico, um gato foi positivo sendo encontradas formas promastigotas em um flebotomíneo de 224 avaliados aos 2½ meses p.i. Na terceira etapa deste trabalho, os dados disponíveis referem-se a dois casos suspeitos de LF cujo diagnósticos foram Criptococose e Histoplasmose. O inquérito sorológico está em fase de realização não sendo obtidos os resultados até a presente data. De antemão, os dados obtidos até o momento, leva-nos a concluir que gatos domésticos agregam todas as condições de um potencial reservatório de *LVb*. Entretanto, os estudos epidemiológicos são necessários para avaliar o real papel destes animais na transmissão da leishmaniose em áreas endêmicas.

ABSTRACT

Due to the several and emerging reports of infection of domestic cats (*Felis catus*) by *Leishmania* sp, including by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (*LVB*), the potentiality of these animals as *Leishmania*-reservoir hosts in endemic foci has been speculated. Aiming to clear part of this speculation, this study was distributed in three general stages: (1) to know the susceptibility of cats to experimental infection with *LVB*; (2) to verify the competence and capacity of phlebotomine infection after contact with cats; (3) to evaluate the occurrence of natural infection of cats by *LVB*. Three experimental infections with 10^7 promastigotes, by intradermic route, were carried out to know the first stage as follow: (a) double and simultaneously sites of inoculum (ear and nose – $n = 13$) and single site of inoculum (ear – $n = 18$), both (a and b) with human *LVB* strain; (c) single site of inoculum (ear – $n = 6$) with feline *LVB* strain. Cats infected in double sites with human *LVB* strain showed similar clinic-pathological picture to the natural human and canine American Tegumentary Leishmaniasis. The higher level of anti-*Leishmania* antibody had coincidence with the decrease of lesion size. However, the animals inoculated in single site, in spite of the similarity of incubation period, had lesion development later than the group of double site inoculation. On the other hand, the cats infected with feline *LVB* strain had not show cutaneous manifestation. To evaluate the second stage of this study, (a) *Leishmania* sp-no infected cat were submitted to the contact with phlebotomines to verify their behaviour and engorgement rate, as well as (b) to the host feeding preference of these dipterous in field condition in relation of potential *LVB*-reservoir hosts, including the cat. In addition, (c) the cats experimentally infected with *LVB* (second experiment) were submitted to the xenodiagnosis. In general, the engorgement rate of phlebotomines in laboratory condition was high. In addition, the field trial showed that the cat had lower attractiveness by phlebotomine than dog, although the engorgement phlebotomine females were higher in cat's trap than dog's trap. One cat was positive in xenodiagnosis which promastigotes forms were found in one phlebotomine out of 224 evaluated at 2½ months p.i. In the third stage of this study, the data were two suspicion of feline leishmaniasis whose definitive diagnosis were criptococossis and histoplasmosis. The seroepidemiological study of cats from the Ceará State is still under accomplishment. Up to now, the data lead us to conclude that domestic cats join all conditions of the potential *LVB*-reservoir host. However, the epidemiological study is necessary to evaluate the real role of these animals in the leishmaniasis transmission in the endemic foci.

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS.....	21
LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	24
1 INTRODUÇÃO	28
2 REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 Histórico.....	31
2.2 A LTA no Ceará.....	33
2.3 Agente etiológico, vetores e distribuição geográfica.....	36
2.4 Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> e seu ciclo de vida.....	38
2.5 Sinais e sintomas nos hospedeiros suscetíveis.....	39
2.6 Alterações histológicas.....	41
2.7 Diagnóstico.....	47
2.8 Controle.....	49
2.9 Zoonoses e hospedeiros de agentes de doenças transmissíveis.....	51
2.10 Hospedeiros reservatórios de <i>Leishmania</i> dermatrópica.....	54
2.11 A infecção de gatos por <i>Leishmania</i> spp.....	56
2.12 O gato (<i>Felis catus</i>): etologia e estimativas populacionais.....	63
3 JUSTIFICATIVA	70
4 OBJETIVOS	72
4.1 Geral.....	72
4.2 Específico.....	72
5 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.1 Experimento 1 - Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com <i>Leishmania braziliensis</i> isolada de paciente humano.....	73
5.1.1. Parasitos.....	73
5.1.2 Animais.....	73

5.1.3 Infecção experimental.....	74
5.1.4 Avaliação das manifestações clínicas.....	74
5.1.5 Isolamento de <i>Leishmania</i> dos tecidos.....	74
5.1.5.1 Citologia aspirativa das lesões das orelhas.....	74
5.1.6 Avaliação da produção de anticorpos.....	75
5.1.7 Avaliação da ocorrência de disseminação visceral.....	77
5.1.7.1 Citologia aspirativa e <i>imprints</i> de tecidos.....	77
5.1.7.2 Alterações anatomopatológicas.....	77
5.2 Experimento 2 - Comportamento da infecção experimental de gatos com <i>L. (V.) braziliensis</i> humana em períodos pré-estabelecidos.....	78
5.2.1 Animais.....	78
5.2.2 Critério de inclusão dos animais experimentais.....	78
5.2.2.1 Avaliação da linfoblastogênese.....	78
5.2.2.2 Sorologia.....	79
5.2.3 Infecção e grupos experimentais.....	79
5.2.4 Tempos de avaliação.....	79
5.2.5 Excisão do linfonodo submandibular esquerdo (drenagem): quantificação de carga parasitária e avaliação histológica.....	80
5.2.5.1 Quantificação da carga parasitária no linfonodo esquerdo.....	80
5.2.5.2 Avaliação histológica do linfonodo esquerdo.....	81
5.2.6 Avaliação anatomopatológica.....	81
5.3 Experimento 3 - Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com cepa de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> isolada de caso natural de Leishmaniose Felina.....	81
5.3.1 Animais.....	81
5.3.2 Parasitos e procedimento.....	81
5.4 Experimento 4 - Capacidade e competência dos flebotomíneos como vetores de <i>Leishmania braziliensis</i> em relação aos gatos.....	82
5.4.1. Colônia de flebotomíneos.....	82
5.4.2 Comportamento alimentar dos flebotomíneos em contato com gatos não infectados por <i>Leishmania sp.</i>	82

5.4.3 Xenodiagnóstico.....	83
5.5 Experimento 5 – Atratividade e preferência alimentar de flebotomíneos em relação a alguns potenciais hospedeiros reservatórios de <i>Leishmania braziliensis</i> em condições de campo.....	83
5.5.1 Local do estudo.....	83
5.5.2 Animais e procedimento.....	84
5.5.3 Identificação dos dípteros.....	84
5.6. Experimento 6 - Infecção natural de gatos por <i>Leishmania</i> spp.....	84
5.6.1 Inquérito sorológico.....	84
5.6.1.1 Amostras.....	84
5.6.1.2 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp.....	86
5.6.2 Investigação de casos clínicos suspeitos de Leishmaniose Felina.....	86
5.6.2.1 Caso 1 - Caso clínico e procedimentos.....	86
5.6.2.2 Caso 2 - Caso clínico e procedimentos.....	87
5.7 Análise dos dados.....	89
6 RESULTADOS	90
6.1 Experimento 1 - Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com <i>Leishmania braziliensis</i>	90
6.1.1 Estabelecimento da infecção e evolução clínica.....	90
6.1.2 Detecção de parasito.....	91
6.1.3 Comportamento da resposta sorológica anti- <i>Leishmania</i> e detecção de FeLV.....	92
6.1.4 Correlação entre desenvolvimento da lesão e sorologia.....	92
6.1.5 Sinais inespecíficos.....	92
6.1.6 Avaliação anatomatológica.....	96
6.2 Experimento 2 - Comportamento da infecção experimental de gatos com <i>L. (V.) braziliensis</i> humana em períodos pré-estabelecidos.....	101
6.2.1 Considerações gerais sobre a linfoblastogênese e sorologia e, histologia e quantificação da carga parasitária do linfonodo.....	101
6.2.2 Avaliação clínica.....	101
6.3 Experimento 3 - Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção	

experimental com cepa de <i>L. (V.) braziliensis</i> isolada de caso natural de Leishmaniose Felina.....	102
6.2.1 Avaliação clínica.....	102
6.4 Experimento 4 - Capacidade e competência dos flebotomíneos como vetores de <i>L.(V.) braziliensis</i> em relação aos gatos.....	102
6.4.1 Comportamento alimentar dos flebotomíneos em contato com gatos não infectados por <i>Leishmania</i> sp.....	102
6.4.2 Xenodiagnóstico	105
6.5 Experimento 5 - Atratividade e preferência alimentar de flebotomíneos em relação a alguns potenciais hospedeiros reservatórios de <i>L. (V.) braziliensis</i> em condições de campo.....	105
6.5.1 Atratividade e preferência alimentar.....	105
6.6 Experimento 6 - Infecção natural de gatos por <i>Leishmania</i> spp.....	107
6.6.1 Infecção natural de gatos por <i>Leishmania</i> spp.....	107
6.6.1.1 Inquérito sorológico.....	107
6.6.1.2 Avaliação dos casos clínicos suspeitos de LTA felina.....	107
6.6.1.2.1 Caso 1 – Diagnóstico.....	108
6.6.1.2.2 Caso 2 – Diagnóstico.....	108
7 DISCUSSÃO GERAL	111
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	145
Anexo I - Artigo 1 – <i>Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown?</i>	146
Anexo II - Artigo 2 – Leishmaniose em gatos domésticos: é bom manter-se informado!.....	156
Anexo III - Artigo 3 - Leishmaniose Felina: revisão de literatura.....	159
Anexo IV - Artigo 4 - <i>The susceptibility of domestic cats (Felis catus) to experimental infection with <u>Leishmania braziliensis</u></i>	179
Anexo V - Artigo 5 – <i>Domestic cat (<u>Felis catus</u>) as potential reservoir host of <u>Leishmania (Viannia) braziliensis</u> for <u>Lutzomyia migonei</u> and <u>L. whitmani</u> infection</i>	190

Anexo VI – Resumo 1 - Leishmaniose felina experimental.....	205
Anexo VII– Resumo 2 – Comportamento alimentar de flebotomíneos em contato com gatos domésticos não infectados por <i>Leishmania sp</i>	207
Anexo VIII – Resumo 3 - Gatos domésticos como reservatórios de <i>Leishmania braziliensis</i>	209
Anexo IX - Artigo 6 - <i>Cryptococcus neoformans</i> em lesão nasal de um gato (<i>Felis catus</i>): implicações do isolamento da variedade <i>neoformans</i> , sorotipo A, no município de Baturité, Ceará (Brasil).....	211
Anexo X – Artigo 7 - <i>Primary cutaneous histoplasmosis in a domestic cat (<u>Felis catus</u>) from non-endemic area of the Ceará State, Brazil</i>	220
APÊNDICE	227
Apêndice I - Quadro 1. Frequência de LTA humana (1996-2005) por município residente do Ceará.....	228

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

° C	: Graus Celsius
×	: Vezes
%	: Porcentagem
µm	: Micrô metro (s)
µL	: Microlitro
ABTS	: 2-azinodio-3-etilbenzitiazolína
a.C.	: Antes de Cristo
BDT	: Base de Dados Tropicais
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co.	: <i>Company</i>
CO ₂	: Dióxido de Carbono
COM	: Contagem por minuto
d.C.	: Depois de Cristo
DNA	: Ácido desoxirribonucléico
DO	: Densidade óptica
d.p.i.	: Dias pós-infecção
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	: Erro padrão da média
EV	: Endovenosa
F1	: <i>First generation</i>
FAVET	: Faculdade de Veterinária
FL	: <i>Feline Leishmaniasis</i>
FeLV	: Vírus da Leucemia Felina
FIOCRUZ	: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

FIV	: Vírus da Imunodeficiência Felina
FUNASA	: Fundação Nacional da Saúde
FUNCAP	: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
G	: Grama
H ³	: Timidina triciada
HEPES	: <i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
IC	: Iniciação Científica
ID	: Intradérmico
IDM	: Intradermorreação de Montenegro
IE	: Índice de estimulação
IFI	: Imunofluorescência Indireta
IM	: Intramuscular
Inc.	: <i>Incorporation</i>
Kg	: Kilograma (s)
Km	: Kilo meter
LABODOPAR	: Laboratório de Doenças Parasitárias
LC	: Leishmaniose Cutânea
LCD	: Leishmaniose Cutânea Difusa
LF	: Leishmaniose Felina
LT	: Leishmaniose Tegumentar
LTA	: Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	: Leishmaniose Visceral
M	: Molar
Mg	: Miligrama
mL	: Mililitros
mm ²	: Milímetros quadrados
mM	: Milimolar
m.p.i.	: Meses de pós-infecção
MSD	: Meio Schneider Drosófila
N	: Número

N	: Normal
NUEND	: Núcelo de Endemias
Nm	: Nanômetro
NNN	: Novy, McNeal e Nicole
NMT	: Núcleo de Medicina Tropical
OMS	: Organização Mundial da Saúde
P	: Probabilidade
PBS	: <i>Phosphate buffer saline</i>
pH	: Potencial de hidrogênio
p.i.	: Pós-infecção
PL	: Peso do linfonodo
PP	: Peso da placa
PPL	: Peso da placa com linfonodo inteiro
R	: Raio
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SC	: Subcutâneo
SESA	: Secretaria de Saúde
SFB	: Soro fetal bovino
SFM	: Sistema fagocítico-mononuclear
s.p.i.	: Semana pós-infecção
SRD	: Sem raça definida
T	: Tween 20
U	: Unidades
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
UFC	: Universidade Federal do Ceará
UPIS	: União Pioneira de Ensino Superior

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURAS	Pág.
Figura 1. Freqüência anual (1996-2005) de casos de LTA humana no Estado do Ceará.....	35
Figura 2. Freqüência anual (1996-2005) de casos de LTA humana no Maciço de Baturité.....	36
Figura 3. Freqüência anual (1996-2005) de casos de LTA humana em Pacoti....	36
Figura 4. Lesão de Leishmaniose Cutânea localizada na perna de um paciente humano de Baturité (CE-Brasil). Note as características da lesão com os bordos elevados, centro papuloso e úmido e com infecção secundária (pus).....	42
Figura 5. Lesão de Leishmaniose Cutânea no couro cabeludo de uma criança de aproximadamente 6 anos de idade residente do município de Baturité (CE-Brasil).....	42
Figura 6. Paciente humano de Baturité (CE-Brasil) com lesão de Leishmaniose Cutânea em processo de cura após tratamento com antimoniais.....	43
Figura 7. Cão residente no município de Pacoti (CE-Brasil) acometido por Leishmaniose Tegumanetar Americana. Note a presença de pequenas úlceras circundando a região de narina.....	43
Figura 8. Cão residente no município de Pacoti (CE-Brasil) acometido por Leishmaniose Tegumanetar Americana apresentando severa lesão ulcerada no focinho.....	44
Figura 9. Vista dorsal do focinho do cão da figura 8. Note a perda parcial do plano nasal direito.....	44
Figura 10. Cão residente no município de Baturité exibindo lesão clássica de Leishmaniose Cutânea no saco escrotal.....	45

Figura 11. Cão residente no município de Baturité (CE-Brasil) exibindo severa lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana no saco escrotal agravada por miíase secundária.....	45
Figura 12. Lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana em região interdigital de um cão residente no município de Pacoti (CE-Brasil). Note que o nódulo apresenta uma característica vesículo-bolhosa.....	46
Figura 13. Populações felina e canina vacinadas contra o vírus da raiva no Estado do Ceará de 2002 a 2005.....	66
Figura 14. Municípios do Estado do Ceará incluídos no inquérito soropidemiológico para a presença de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp em gatos	85
Figura 15. Grande massa granulomatosa na região dorsal do plano nasal com tecido de mesma característica protuindo da narina.....	88
Figura 16. Lesões ulceradas na cauda do gato exibindo um padrão de bordos elevados e exuberante tecido de granulação.....	88
Figura 17. Pápula formada na orelha de um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	93
Figura 18. Um grande e irregular nódulo formado pela coalescência de várias pápulas satélites na orelha de um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	93
Figura 19. Ulceração (seta) de uma lesão primária e disseminação dérmica nas orelhas ipsilateral e contraletaral em um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	94
Figura 20. Lesão ulcerada no nariz na 6 ^a s.p.i em um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	94
Figura 21. Evolução do tamanho da lesão em mm ² (média ± D.P.M.) e da resposta humoral in densidade óptica (DO[média ± D.P.M.]) durante o período experimental em gatos infectados com 10^7 promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	95
Figura 22. Cura de lesão de leishmaniose felina experimental as 72 s.p.i. Mesmo gato da figura 19. Note uma pequena cicatriz no sítio de uma antiga úlcera (seta).....	95

Figura 23. Corte histológico (5 µm) de tecido de orelha de gato eutanasiado aos 6 m.p.i. Note uma reação inflamatória difusa na derme cujo infiltrado celular é composto predominantemente por plasmócitos, poucos linfócitos e macrófagos (H × E – magnificação original ×600).....	98
Figura 24. Corte histológico (5 µm) de tecido de orelha de gato eutanasiado aos 15 m.p.i. Note que a derme exibe um intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular leve (seta preta) e uma área focal com quantidade moderada de linfócitos e plasmócitos (seta branca). (H × E – magnificação original ×100).....	98
Figura 25. Corte histológico (5 µm) de tecido de nariz de gato eutanasiado aos 15 m.p.i. Observe foco inflamatório linfoplasmocitário intersticial perivascular na derme. (H × E – magnificação original ×400).....	99
Figura 26. Corte histológico (5 µm) de tecido de orelha de gato eutanasiado aos 15 m.p.i. exibindo leve infiltrado linfoplasmocitário na derme (H × E – magnificação original ×100).....	99
Figura 27. Corte histológico (5 µm) de tecido esplênico de gato eutanasiado aos 15 m.p.i. exibindo intensa hiperplasia dos centros germinativos dos folículos linfóides (H × E – magnificação original ×200).....	100
Figura 28. Orelha de gato experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Note uma pápula eritematosa originada no sítio de inóculo aos 15 dias de infecção.....	103
Figura 29. Orelha de gato experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Observe formação de pápulas satélites (setas pretas) ao redor da pápula inicial (seta branca).....	103
Figura 30. Nódulo formado da coalescência de pápulas satélites em orelha de gato experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	104
Figura 31. Flebotomíneos <i>Lutzomyia migonei</i> pousados na cabeça de gato experimentalmente não infectado com <i>Leishmania</i> sp.....	104
Figura 32. Xenodiagnóstico realizado em gato experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Observe um flebótomo (<i>Lutzomyia migonei</i> – seta) realizando repasto sanguíneo na orelha infectada.....	106

Figura 33. Fêmea de <i>Lutzomyia migonei</i> repleta de sangue logo após o xenodiagnóstico realizado em gato experimentalmente infectado com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	106
Figura 34. Seleção de flebotomíneos na bandeja componente das armadilhas <i>Disney</i>	110
Figura 35. Hamster exibindo formação de lesão nodular no mesmo sítio de inóculo de <i>Histoplasma capsulatum</i>	110

TABELAS

Tabela 1. Razão da população canina por habitante em diferentes localidades do mundo.....	65
Tabela 2. Comportamento populacional canino e felino no município de Fortaleza (Ceará - Brasil) de 1998 a 2005.....	67
Tabela 3. Comportamento populacional canino e felino no Maciço de Baturité (Ceará - Brasil) de 2002 a 2005.....	68
Tabela 4. Evolução das lesões nos gatos (<i>Felis catus</i>) experimentalmente infectados com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	91
Tabela 5. Flebotomíneos capturadas em armadilhas <i>Disney</i> contendo potenciais hospedeiros reservatórios de <i>Leishmania braziliensis</i> em trabalho de campo realizado no município de Pacoti, Estado do Ceará, nordeste do Brasil.....	105

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas, de grande impacto em saúde pública mundial, causadas por diferentes espécies do protozoário difásico do gênero *Leishmania*. Como doença de ciclo indireto, o protozoário é transmitido pela picada de flebotomíneos, cujos gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, são encontrados no Velho e Novo Mundo, respectivamente (KENNER *et al.*, 1999). A diversificação das espécies de *Leishmania* é responsável pela forma da doença que manifesta em seu hospedeiro, dentre elas, destacamos as Leishmanioses Visceral (LV) e Tegumentar (LT).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005) as leishmanioses afetam 12 milhões de pessoas em 88 países, e estima-se que 350 milhões estejam expostas ao risco de infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. A OMS salienta ainda, que a incidência anual é de 2 milhões, sendo 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar (LT) e 0,5 milhões de leishmaniose visceral (LV), e está claro que os dados oficiais são freqüentemente subestimados em relação à realidade, já que são obtidos exclusivamente pela detecção de casos.

Alguns canídeos, em especial os cães domésticos (*Canis familiares*), são incriminados como hospedeiros reservatórios dos protozoários *L. infantum* (= *L. chagasi*) para transmissão humana, ocasionando a LV. Além disso, em locais onde é endêmica, a LTA humana vem crescendo, sendo atribuído ao cão também, o papel de hospedeiro reservatório, principalmente em casos de infecção por *L. braziliensis* (MADEIRA *et al.*, 2003). Sabe-se que o cão, além de transmitir o protozoário ao vetor, também padece da doença. Desta forma, com o intuito de minimizar a infecção tanto em seres humanos quanto de cães, estudos tem sido voltados ao bloqueio da cadeia de transmissão, tendo como objeto alvo, os flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997; DAVID *et al.*, 2001; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2002a; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2002b; DAVIES *et al.*, 2002; MAROLI *et al.*, 2002).

Pesquisas de sucesso têm comprovado a diminuição da soroconversão em ambos os hospedeiros com a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina em cães de áreas endêmicas (BADARÓ *et al.*, 2002). Por outro lado, advindo deste promissor controle, tem sido especulado o possível papel de outros animais como hospedeiros reservatórios de *Leishmania* (PENNISI, 2002) e/ou mesmo padecendo da enfermidade, uma vez que, ambos, vetor e protozoário, podem adaptar-se a novos hospedeiros, caso não encontrem mais ambiente propício nos cães portadores de coleiras “anti-flebótomos”. Dentre os animais domésticos, o gato vem despontado como um provável candidato (PENNISE, 2002; KILLICK-KENDRICK, 2002; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004; SIMÕES-MATTOS, 2005). Esta afirmação vem baseada nos recentes relatos de casos clínicos de leishmaniose felina (LF – SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a; SIMÕES-MATTOS, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, no prelo). Diante disso, apesar de serem considerados de rara ocorrência, casos de LF com manifestações cutâneas e/ou implicação visceral, associados a esta doença, vêm sendo relatados na América, Europa, Ásia e África. Além disso, inquéritos epidemiológicos (sorológicos e parasitológicos) realizados em vários países, têm demonstrado taxas consideráveis de infecção nesta espécie animal (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a).

Assim, a suposição sobre o papel do gato doméstico (*Felis catus*) como hospedeiro reservatório, em alguns focos endêmicos, tem sido freqüentemente comentado. Entretanto, de forma geral, em doenças de ciclo indireto, alguns requisitos são indispensáveis para considerar uma espécie animal como hospedeiro reservatório: (a) encontrar casos de infecção natural pelo bioagente; (b) ser suscetível à reprodução experimental da infecção e albergar o agente infectivo por um período; (c) ser atrativo ao vetor (d) o vetor ter capacidade de se infectar em contato com a espécie animal infectada com o bioagente.

Para CHABLE-SANTOS *et al.* (1995) cinco critérios devem ser considerados para qualificar um reservatório primário: (1) superposição da distribuição geográfica e temporal dos reservatórios e vetores; (2) sobrevivência do hospedeiro reservatório suficientemente longa para garantir a transmissão; (3) prevalência da infecção entre os

reservatórios em níveis superiores a 20%; (4) manutenção do parasito na pele ou sangue em quantidades suficientes para infectar facilmente o vetor e (5) a espécie de parasito encontrada no reservatório e no homem ser a mesma.

Ademais, SHAW (1988) salienta que os hospedeiros podem ser classificados em três tipos: (1) reservatório primário, como o hospedeiro responsável pela manutenção do ciclo do parasito na natureza; (2) reservatório secundário, como aquele que é infectado e serve como fonte de infecção para o vetor, porém não é capaz de manter o ciclo indefinidamente; (3) hospedeiro acidental, aquele que se infecta, mas não representa fonte de infecção.

Assim, cada um desses requisitos devem ser cuidadosamente analisado e considerado, quando nos casos de infecção por *Leishmania* em gato, para incriminá-lo como hospedeiro reservatório.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Para NEVES (1997) não há dúvidas de que a leishmaniose tegumentar seja uma antiga doença do homem. Descrições de leishmaniose cutânea podem ser encontradas no primeiro século d.C., na Ásia Central. As lesões nos doentes eram referidas de acordo com a região geográfica em que ocorriam. Sendo assim, foi atribuído o nome de doença de ferida de Balkh aos doentes de uma cidade no norte do Afeganistão. Da mesma forma, botão de Aleppo, na Síria e, botão de Bagdá, no Iraque, o que mais tarde passou a ser conhecida pelos viajantes como Botão-do-Oriente.

Na América, a documentação mais antiga data da época pré-colombiana (400 a 900 d.C.) em obras arqueológicas de cerâmicas equatorianas e peruanas, os chamados potes *Mochica* e *Huacos*, que exibem faces humanas com deformidades nas narinas e lábios, semelhantes às lesões destrutivas da forma cutaneomucosa (AZULAY, 1952; NEVES, 1997). Ademais, com estes achados, AZULAY (1952) comentou, em sua obra, ser bastante evidente o fato da LTA ser uma enfermidade autóctone do continente americano.

As primeiras descrições clínicas de LTA remontam do século XVI, por Oviedo, em 1535, e Pizarro, em 1571, que fazem alusão a uma doença que destruía o nariz e cavidades bucais dos índios na encosta da Cordilheira dos Andes, nos vales onde cultivavam coca. Foi em 1764 que Bueno publicou observações mostrando que no Peru a leishmaniose cutânea, ou UTA, era transmitida pela picada de flebotomíneos (NEVES, 1997).

Entretanto, somente em 1885 que Cunningham, na Índia, fez a primeira observação dos parasitos em casos de calazar humano. Em 1898, o cientista russo Borovsky descreveu, com detalhes, estes parasitos em casos de leishmaniose cutânea

humana sem lhes dar nome ou estabelecer sua posição sistemática. Em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania* e no mesmo ano Wright descobriu o agente etiológico do botão-do-Oriente, incluindo-o no mesmo gênero e pertencente à espécie *Leishmania tropica* (NEVES, 1997).

No Brasil, há suspeitas da ocorrência de LTA já no início do século XIX, na região amazônica. Estas suspeitas baseiam-se em um registro realizado por um missionário católico que relatava detalhes sobre a presença de “mosquitos” associados à severa enfermidade, sendo essa a primeira menção da existência da relação da doença com transmissão por vetores:

“[...] de los mosquitos y otras muchas especies de moscardones y de sus picaduras o mordeduras de estos, salen las llagas asquerosas y muchas de una consecuencia fatal [...] es común en todas estas tierras a la par de su fertilidad y humedades, la lepra y en el quedarse sus narices, sino se vive con precaución [...]; los mosquitos y demás insectos son si no se tiene cuidado, un poderoso fomento de las llagas profundas y fétidas in piernas y brazos, hervor de boca, galito [...]”

(RABELLO, 1925 *apud* CANTARINO, 1998).

Para ratificar a presença da LTA no Brasil registrada nos escritos do missionário, estudos comentam de sua provável presença no final do século XIX, mais especificamente nos anos de 1882, 1884 e 1885. Entretanto, em 1925, Rabello atribuiu aos modelos de cera do Museu da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, que datavam de 1882 e que exibiam lesões com invasões de mucosa, o diagnóstico de “lupus vulgar” (CANTARINO, 1998). Por outro lado, segundo AZULAY (1952), em 1895, italianos que regressaram de São Paulo para a Itália foram acometidos da doença sendo que em um deles a doença teve início em 1884. Entretanto, Cerqueira, desde 1855 já relatava a presença de leishmaniose em pacientes por sua semelhança ao botão-do-Oriente. Foi então que em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, que ocorreram vários casos, principalmente na cidade de Bauru, sendo atribuído o nome da enfermidade como úlcera-de-Bauru. Em 1909, Lindeberg, Carini e Paranhos identificaram os parasitos na úlcera-de Bauru os

quais foram denominados, em 1911, por Gaspar Vianna como *Leishmania braziliensis*. Diante desta descoberta, passou a ser possível mapear a extensão da endemia de LTA em todo o território brasileiro.

Segundo AZULAY (1952), apesar da doença ainda ser desconhecida no início do século XIX, a primeira citação relacionando a transmissão da leishmaniose por picada de mosquitos parece ter sido a do missionário católico. Ademais, a incriminação de um vetor do protozoário foi feita por Wenyon em 1913 quando teorizou a relação sazonal da doença. Entretanto, foram Cerqueira e Beaurepaire-Aragão, em 1920, que encontraram evidências da transmissão envolvendo flebotomíneos (NEVES, 1997).

O homem, por muito tempo, foi considerado como a principal fonte de infecção do protozoário. Entretanto, em 1913, Brumpt e Pedroso relataram a possibilidade de outros animais mamíferos selvagens também o ser. Esta suposição foi baseada na ocorrência de casos de leishmaniose em humanos quando estes adentravam as florestas inabitadas. Especificamente no Brasil, foram os trabalhos de FORATTINI (1960) e FORATTINI *et al.* (1972; 1973) que começaram a evidenciar a importância de roedores como reservatórios de *Leishmania* da forma tegumentar da doença. Além disso, GUIMARÃES *et al.* (1968) já comentavam que a ação antrópica em focos silvestres de roedores poderia estabelecer focos endêmicos rurais e urbanos tendo o cão e até o próprio homem como reservatórios.

2.2 A LTA no Ceará

O Ceará é um dos Estados da Federação que tem contribuído com a maior parte dos casos de LTA no Brasil. Este fato pode estar atribuído, provavelmente, às peculiaridades de características paisagísticas e de ocupação do espaço que favorece a transmissão da doença. Segundo COSTA (1998), dentre os municípios cearenses, o que mais apresenta casos de LTA é Baturité, sendo o primeiro caso diagnosticado pelo Serviço Sanitário do Estado em 1939 (VALIM, 1993). Este município está situado a

105 km de Fortaleza em região de serra onde a temperatura média anual é de 27 °C, com grandes plantações de banana. Pelas peculiaridades da região e forma de ocupação do espaço, o município possui ampla variabilidade paisagística.

Segundo TOLEDO (1996), a ocupação do Estado do Ceará, intimamente ligada à história econômica, teve início com a cultura do açúcar no período colonial, com a interiorização em busca de ouro, aldeamento de índios, e pecuária extensiva para abastecimento dos engenhos de açúcar do litoral, formando assim uma cultura de subsistência. Entretanto, com o declínio do açúcar e o surgimento do ciclo do ouro em Minas Gerais, passam a ter destaques a pecuária cearense (indústria de charque) e a cultura de alimentos de subsistência, particularmente em áreas de pés-de-serra e chapada onde as condições de agricultura são mais favoráveis.

No final do século XVIII ocorreu um grande fluxo migratório para outras regiões do país devido ao crescimento da indústria de carne na região sul, bem como, mais tarde, já no século XIX, com a implantação da cultura do algodão, cuja decadência determinou novo refluxo para a produção de subsistência. Foi então que em meados dos anos 30, agravando ainda mais em 50, começou a crise econômica do Estado, intensificada pela seca (TOLEDO, 1996). Para ROSICKY (1967) as mudanças econômicas contribuem para produzir reflexos na modificação da paisagem acarretando impactos ambientais capazes de alterar o perfil epidemiológico e a distribuição de doenças que sofram influências do ambiente ou de características zoonóticas. Para este autor, a variação da paisagem, com múltiplos habitats, permite o desenvolvimento e a interação de numerosas populações animais, inclusive de parasitos, aumentando a possibilidade de infecções eventuais e adaptação dos parasitos a novos hospedeiros. Além disso, a persistência da endemia em região com população assentada e cobertura vegetal muito modificada pelo trabalho humano sinaliza a hipótese de existir um ou mais ciclos de transmissão de LTA distintos dos descritos nas frentes agrícolas pioneiras (SABROZA, 1983).

Atualmente, a LTA no Estado do Ceará é assinalada em 146 municípios (APÊNCIDE I) com um total de 10.946 casos humanos registrados de 1996 a 2005 (Figura 1).

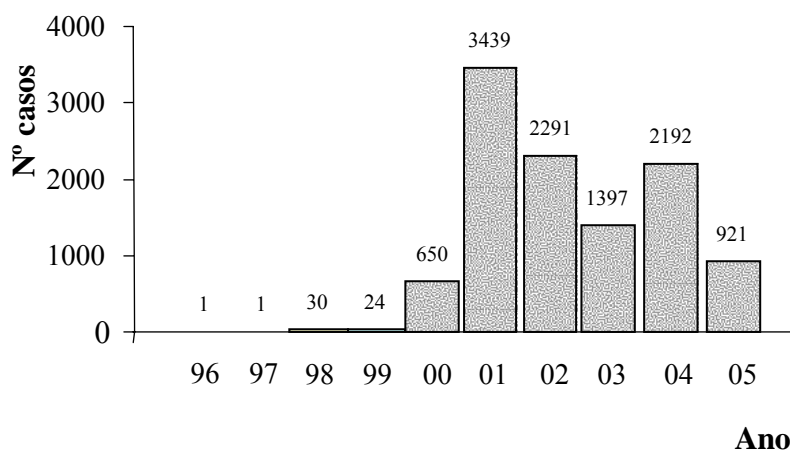


Figura 1. Frequência anual (1996-2005) de casos de LTA humana no Estado do Ceará.

Destes municípios, os que apresentaram o maior número de casos foram Baturité (669), Crato (548), Guaraciaba do Norte (411), Itapagé (456), Pacoti (818), São Benedito (812), Tianguá (428), Ubajara (556) e Viçosa do Ceará (882).

De acordo com a Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA/CE), o complexo serrano Maciço de Baturité abrange oito municípios pertencentes à 4ª Célula Regional de Saúde, a saber: Baturité, Guaramiranga, Aracíoaba, Capistrano, Mulungu, Pacoti e Aratuba. Este complexo é considerado endêmico para LTA humana, porém o número de casos vem diminuindo a cada ano (Figura 2). Pacoti, município alvo deste trabalho, apresentou o maior número de casos (Figura 3) entre os municípios pertencentes ao Maciço de Baturité.

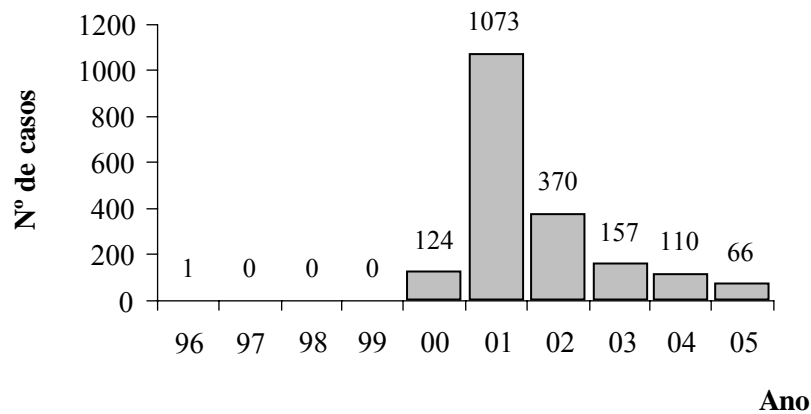


Figura 2. Frequência anual (1996-2005) de casos de LTA humana no Maciço de Baturité.

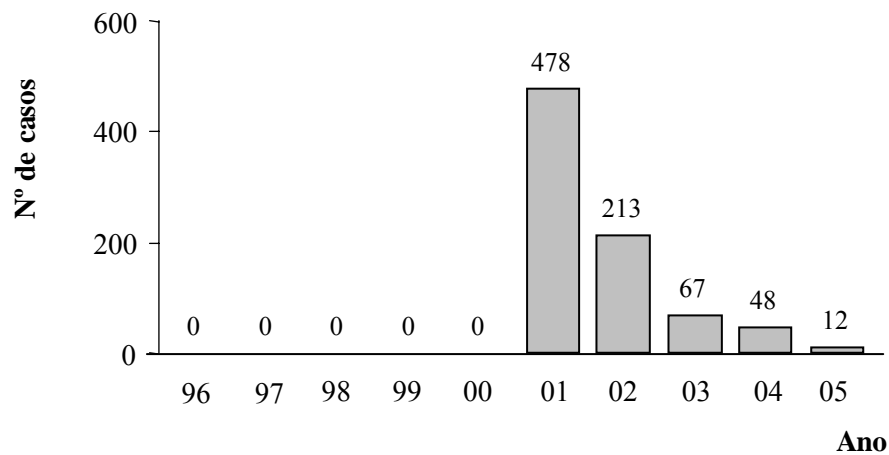


Figura 3. Frequência anual (1996-2005) de casos de LTA humana em Pacoti.

2.3 Agente etiológico, vetores e distribuição geográfica.

Segundo FUNASA/MS (2000), no Brasil há diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania* implicadas na epidemiologia da forma tegumentar da doença,

sendo as mais importantes: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* encontra-se distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia, Ceará, Piauí), Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso). Seus principais vetores são os *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia), têm hábitos noturnos e vôo baixo e são pouco antropofílicos.

Já a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, aparentemente encontra-se limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas, principalmente em florestas de terra firme, em áreas que não sofrem alagamentos em período de chuvas. Os vetores são *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia umbratilis*, sendo este último considerado o principal vetor, costumando pousar durante o dia em troncos de árvores e atacar o homem em grande quantidade, quando perturbado.

Por fim, destaca-se a espécie de maior importância para este trabalho, *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Esta possui ampla distribuição geográfica estando compreendida do sul do Pará ao Nordeste, região centro-sul do país e áreas da Amazônia Oriental. Na Amazônia, a infecção é usualmente contraída em áreas de terra firme. Nos anos 30 e 40, nas regiões Sul e Sudeste, a transmissão encontrava-se associada aos vetores *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia pessoai* e *Lutzomyia migonei*, todos com comportamentos silvestres. Atualmente, nessas regiões, coincidindo com as antigas áreas de Mata Atlântica, *L. (V.) braziliensis* encontra-se associada à *Lutzomyia intermedia* em áreas endêmicas litorâneas dos Estados do Espírito Santo (Viana), Rio de Janeiro (capital e interior) e São Paulo (Vale do Ribeira), assim como nos vales de grandes rios do interior de São Paulo e Paraná, onde o vetor é encontrado dentro e ao redor das habitações e em abrigos de animais domésticos. A *Lutzomyia whitmani* vem

sendo incriminado como vetor no estado de Minas Gerais e em algumas localidades no interior da Bahia como o município de Três Braços. Este vetor é costumeiramente encontrado nas imediações dos domicílios, em plantações de bananas e em áreas de florestas. No estado do Ceará, especificamente no Maciço de Baturité, área de estudo de parte desta tese, a principal forma de transmissão da LTA é periurbana e atribuída ao flebotomo *Lutzomyia wellcomei*, sendo sua presença relacionada com áreas de florestas. Entretanto, QUEIROZ *et al.* (1994) incriminaram também o flebotomo *Lutzomyia whitmani* como principal vetor de *Leishmania braziliensis* neste município, atribuindo sua presença especialmente associada aos animais.

Além das espécies de *Leishmania* citadas, recentemente foram descritas: *L.(V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi*, com poucos casos humanos no Pará; *L.(V) shawi* encontradas nos estados do Pará e Maranhão.

2.4 Formas evolutivas de *Leishmania* e seu ciclo de vida

As leishmânias apresentam-se sob duas formas evolutivas distintas: aflagelada e flagelada (PESSÔA & MARTINS, 1988). A forma aflagelada, denominada amastigota, é ovóide e encontrada predominantemente parasitando células do sistema fagócito-mononuclear do homem e de animais infectados. Possui dimensões variando entre 2 a 6µm de comprimento a 1,5 a 3,0µm de diâmetro. A forma flagelada, denominada promastigota, é fusiforme e observada no tubo digestivo do hospedeiro vetor e nas culturas do parasita, medindo entre 14 a 20µm de comprimento por 1,5 a 4µm de largura, possuindo núcleo, citoplasma, cinetoplasto e um flagelo livre. Ambas formas se multiplicam por divisão binária (PESSÔA & MARTINS, 1988; DIETZE *et al.*, 1991; NEVES, 1997; REY, 2001).

O flebotomíneo transmite os protozoários sob a forma de promastigotas que infectam as células do sistema fagocítico-mononuclear (SFM) de humanos ou de outros mamíferos, transformando-se em formas amastigotas que se dividem abundantemente, culminando com a ruptura das células, sendo então novamente

fagocitados pelo SFM (DIETZE *et al.*, 1991; NEVES, 1997). Ao picar um hospedeiro infectado, os flebotomíneos podem ingerir com o sangue circulante, as formas amastigotas (DIETZE *et al.*, 1991; REY, 2001). No tubo digestivo destes insetos, as formas amastigotas transformam-se em formas móveis flageladas, as promastigotas (DIETZE *et al.*, 1991) em um período de 4 a 25 dias (OMS, 2005). As formas promastigotas podem sofrer multiplicação rápida e intensa, bloqueando o proventrículo do tubo digestivo do flebótomo (DIETZE *et al.*, 1991). Devido a este bloqueio, o inseto ao picar novamente um hospedeiro sadio ou não, poderá regurgitar com o sangue os grumos de leishmanias na forma de promastigota e a transmissão do ciclo é completada (DIETZE *et al.*, 1991)

2.5 Sintomas nos hospedeiros suscetíveis

Como a manifestação clínica da LTA está bem definida em humanos, serão descritos os sinais e sintomas relacionados, principalmente a este hospedeiro.

Segundo ARIAS *et al.* (1996) existem pelo menos 14 espécies de *Leishmania* identificadas e, pelo menos mais umas quatro ainda não definidas que causam comprometimento tegumentar no homem, podendo manifestar-se sob três formas distintas: cutânea (LC), cutâneomucosa (LCM) cutânea difusa (LCD).

A LC consiste em uma ou mais úlceras cutâneas que aparecem entre 1,5 a vários anos (excepcionalmente) após a picada do flebótomo infectado. Estas úlceras podem ser pequenas (< 0,25 cm) ou muito grandes (> 30 cm). Classicamente, a lesão apresenta bordas elevadas com o centro papuloso e úmido (Figura 4), porém pode manifestar-se em formas irregulares ou diferentes deste padrão (Figura 5). Em alguns casos ocorre comprometimento linfático, o que indica disseminação da enfermidade. Em certos casos, as lesões podem ser vegetativas ou verrucosas. Podem aparecer lesões satélites a partir de uma lesão primária. Conforme o agente etiológico, estas feridas podem curar-se espontaneamente, responder bem ao tratamento (Figura 6), ou serem difíceis de curar com medicamentos. Muitas vezes ocorre recidiva devido a um

tratamento incompleto ou mesmo não finalizado. Todas as leishmânias já isoladas no homem podem determinar LC, inclusive *Leishmania chagasi*.

A leishmaniose mucocutânea (LMC), também chamada de “espundia” manifesta-se por uma destruição severa das mucosas nasofaríngeas. Esta forma de leishmaniose normalmente não responde bem ao tratamento com medicamentos antimoniais e muitas vezes requer múltiplas séries de aplicações. A metástase aos tecidos mucosos pode ocorrer simultaneamente a uma lesão crônica de LC, ou pode apresentar-se até 24 anos depois da infecção original. Os agentes etiológicos isolados de pacientes com LCM são *L. braziliensis* e *L. panamensis*.

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma disseminada que afeta a maior parte do corpo de um paciente, semelhante à lepra lepromatosa. É rara (menos de 500 casos notificados em todo o mundo), e o paciente apresenta uma deficiência imunológica específica. A enfermidade é crônica recidivante (não existe cura) e todas as lesões são riquíssimas em parasitas. A incidência de LCD é baixa, mas são encontrados casos desde o México até o Brasil. Não é conhecida a fisiopatogenia, porém se estima que possa ser em consequência de uma deficiência imunológica específica em combinação com um parasito relativamente não imunogênico. As lesões não estão isoladas por uma “parede” de linfócitos como nas lesões clássicas de bordo elevado, e por este motivo não se ulceram a não ser que sejam traumatizadas. Desta maneira, os parasitos não estão restritos e podem dispersar-se pela superfície da pele, particularmente em partes com temperaturas mais baixas. Os agentes etiológicos associados com esta forma são *L. amazonensis* e *L. mexicana*.

Em hospedeiros como os cães, a evolução clínica da LTA, provocada por *L. braziliensis*, manifesta-se normalmente de forma crônica, sem comprometer o estado geral do animal (MADEIRA *et al.*, 2003). As lesões podem progredir em número e extensão, entretanto podem evoluir para cura clínica espontânea com recidivas, ou acometer tardiamente a mucosa nasal (PIRMEZ *et al.*, 1988; MADEIRA *et al.*, 2003). Em estudos realizados por MADEIRA *et al.* (2003) as alterações dermatológicas

sugestivas de LTA, posteriormente confirmada por isolamento do parasito, verificadas nesta espécie animal, estavam localizadas nas orelhas, bolsa escrotal e focinho, sendo, a maior parte delas caracterizada como lesões únicas, ulceradas ou úlcero-crostosas e de evolução crônica. Em trabalhos piloto realizados em campo por nossa equipe em cães residentes na Serra de Baturité e com lesões sugestivas de LTA (dados não publicados) foi observado padrão semelhante ao relatado por MADEIRA *et al.* (2003) sendo as lesões freqüentemente encontradas em orelhas, focinho (Figuras 7, 8 e 9), saco escrotal (Figura 10), alguns com comprometimento de testículos (Figura 11) e, interdígitos (Figura 12).

Em animais, o padrão clínico da LTA, principalmente em sua forma cutânea, parece ser semelhante a muitas afecções dermatológicas, porém ainda não claramente definidas. Dentre elas, podemos citar as afecções fúngicas como esporotricose, criptococose, paracoccidiodomicose e histoplasmose. Como afecções neoplásicas destacam-se os carcinomas epidermóides e de células escamosas e os fibrossarcomas. Destacam-se ainda as dermatites actínicas, granulomas eosinofílicos e pododermatite plasmocítica, bastantes freqüentes em felinos.

2.6 Alterações histológicas

Segundo MAGALHÃES *et al.* (1986), o quadro histopatológico geral da LTA é representado por um infiltrado celular histiolinfoplasmocitário, freqüentemente acompanhado por reação granulomatosa que compromete a derme ou o córion da mucosa.

A lesão inicial básica da LTA na forma cutânea é representada por um foco de proliferação de macrófagos na derme, alguns dos quais são infectados com amastigostas, sendo esta reação denominada por GRIMALDI-JR (1982) de histiocitoma. O infiltrado pode conter ainda, em proporções variáveis, outras células como mastócitos e eosinófilos. KENNER *et al.* (1999) salientam ainda a presença de acantose irregular com ou sem ulceração da epiderme.



Figura 4. Lesão de Leishmaniose Cutânea localizada na perna de um paciente humano de Baturité (CE-Brasil). Note as características da lesão com os bordos elevados, centro papuloso e úmido e com infecção secundária (pus).



Figura 5. Lesão de Leishmaniose Cutânea no couro cabeludo de uma criança de aproximadamente 6 anos de idade residente no município de Baturité (CE-Brasil).



Figura 6. Paciente humano de Baturité (CE-Brasil) com lesão de Leishmaniose cutânea em processo de cura após tratamento com antimoniais.



Figura 7. Cão residente no município de Pacoti (CE-Brasil) acometido por Leishmaniose Tegumentar Americana. Note a presença de pequenas úlceras circundando a região de narina.



Figura 8. Cão residente no município de Pacoti (CE - Brasil) acometido por Leishmaniose Tegumentar Americana apresentando severa lesão ulcerada no focinho.



Figura 9. Vista dorsal do focinho do cão da figura 8. Note a perda parcial do plano nasal direito.

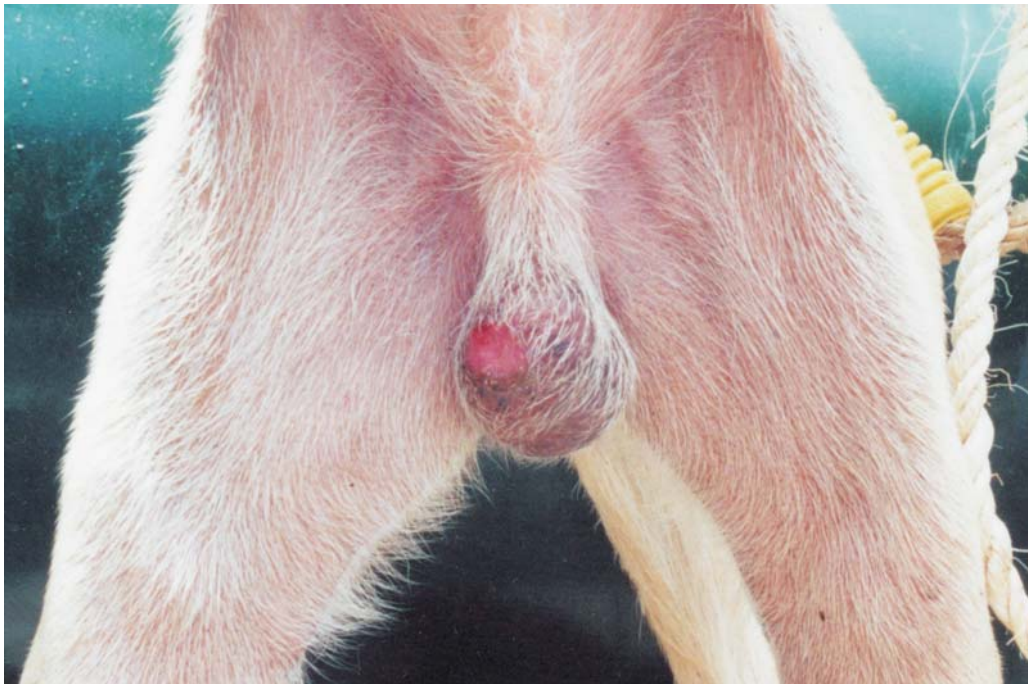


Figura 10. Cão residente no município de Baturité (CE - Brasil) exibindo lesão clássica de Leishmaniose Cutânea no saco escrotal.



Figura 11. Cão residente no município de Baturité (CE-Brasil) exibindo severa lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana em saco escrotal agravada por miíase secundária.



Figura 12. Lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana em região interdigital de um cão residente no município de Pacoti (CE - Brasil). Note que o nódulo apresenta uma característica vesículo-bolhosa.

Em casos de resolução espontânea há um considerável acréscimo de plasmócitos e linfócitos substituindo gradualmente os macrófagos infectados dando espaço para a formação de tecido fibroso (GRIMALDI-JR, 1982). MAGALHÃES *et al.* (1986) complementam que em preparações histológicas em que não são identificados os parasitos, a presença de plasmócitos no infiltrado celular das lesões, apesar da variação na frequência, tem sido um indicativo para sugerir o diagnóstico de LTA. Além disso, estes mesmos autores comentam que os mastócitos são mais predominantes na forma cutânea da doença do que na mucocutânea e frequentemente estão associados aos eosinófilos.

O padrão clássico auto-resolutivo descrito anteriormente não se assemelha às formas anérgicas e alérgicas encontradas em alguns pacientes. Nas formas anérgicas a reação é caracterizada por predominância de macrófagos vacuolados contendo parasitos e ausência completa de linfócitos (GRIMALDI-JR, 1982). MAGALHÃES *et al.* (1986) comentam ser uma reação desorganizada mais frequentemente relacionada à necrose tissular. Além disso, os macrófagos não possuem arranjo definido havendo presença de células gigantes do tipo corpo estranho e com diminuição da carga parasitária. Por outro lado, as formas alérgicas exibem escassez ou ausência de macrófagos contendo parasitos, com lesão básica constituída por um processo granulomatoso do tipo tuberculóide associada à infiltração de células linfocitárias e plasmocitárias (GRIMALDI-JR, 1982; MAGALHÃES *et al.*, 1986).

2.7 Diagnóstico

Diagnosticar a infecção de um hospedeiro por leishmânias dermatrópicas pode, em alguns casos, necessitar a confirmação por várias técnicas, associadas aos sintomas, história clínica, história de viagem e localização geográfica do paciente.

Pela praticidade, o diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa de parasitos. Para tanto podem ser realizadas a escarificação e/ou punção aspirativa ou biópsia para impressão (*imprints*) por aposição em lâmina de vidro e/ou

esfregação do bordo da lesão, todos procedimentos corados com Giemsa. A biopsia da lesão também pode ser submetida a outros exames como o histopatológico por coloração pela hematoxilina-eosina, cultivos *in vitro* (meio NNN bifásico) e *in vivo* (hamster). A histopatologia é uma técnica que raramente é positiva em casos de leishmaniose cutânea, sendo que os *imprints* corados com Giemsa ou as culturas consideradas mais sensíveis. Em geral, tanto os *imprints* quanto as culturas devem ser realizadas quando se deseja estabelecer um diagnóstico, desde que lesões negativas para esfregaços podem ser positivas em cultura (NAVIN *et al.*, 1990) e vice versa (WEIGLE *et al.*, 1987; NAVIN *et al.*, 1990). Por outro lado, a cultura de tecidos da forma mucosa da LTA parece ser mais sensível do que as técnicas de microscopia por coloração com Giemsa ou histologia (WEIGLE *et al.*, 1987).

Uma bateria de procedimentos imunológicos tem sido desenvolvida e adaptada para demonstrar as respostas imunes humoral e celular contra *Leishmania* para diagnósticos e levantamentos epidemiológicos. A especificidade e sensibilidade de tais métodos dependem do tipo, fonte e pureza do antígeno empregado evitando as reações cruzadas com outros microorganismos. As técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* têm sido empregadas com cerca de 23-90 e 83% de sucesso em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LMC), respectivamente (KAR, 1995).

A mensuração da resposta imune celular pode ser avaliada através de injeção intradérmica de antígenos do parasito, técnica conhecida como intradermorreação de Montenegro (IDM). A mensuração é feita pela medida da endureção formada em 48 a 72 horas. É considerada positiva a reação cuja área de endureção seja maior que 5mm (BASANO & CAMARGO, 2004). A IDM é altamente específica e sensível para diagnosticar leishmaniose cutânea e mucocutânea (WEIGLE *et al.*, 1991), sendo que o sucesso nos resultados tem alcançado cerca de 100 e 84%, respectivamente (KAR, 1995).

Em relação aos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, ao contrário do que ocorre com o diagnóstico da LV, em casos de LC, a sensibilidade (67%) e a especificidade (65%) são baixas para a Reação de Imunofluorescência Indireta - IFI (SANCHEZ *et al.*, 1992). Por outro lado, o teste de ELISA realizado em soros de cães tem alcançado índices médios de sensibilidade de 96% e especificidade de 89%, o que, segundo UCHOA *et al.* (2001), o torna uma ferramenta de análise bastante confiável. A reação em cadeia pela polimerase (PCR), por sua vez, tem sido utilizada como ferramenta em pesquisas epidemiológicas, bem como para identificação de espécies de *Leishmania* (DEGRAVE *et al.*, 1994).

Menos comumente utilizadas são as técnicas de linfoblastogênese e xenodiagnóstico que são destinadas, mais especificamente, à pesquisa experimental. Naquela são verificados o índice de estimulação de células T submetidas ao desafio *in vitro* com *Leishmania*. Nesta, é utilizado o vetor agindo como meio biológico para detecção de *Leishmania* após contato com um suposto hospedeiro (SCHENONE, 1999).

Na prática médica, a conduta mais utilizada é a pesquisa direta de parasitas e a intradermorreação (CAMARGO & BARCINSKI, 2003) aliadas ao aspecto clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico.

2.8 Controle

O programa de controle da LTA, em tempos em que a transmissão ocorria mais comumente em áreas rurais com florestas, era centrado basicamente no tratamento das pessoas acometidas, educação em saúde e auto-proteção contra a infecção. Entretanto, como o padrão de transmissão da LTA mudou, várias ações tiveram que ser reformuladas incluindo medidas mais diretas com relação ao vetor e aos reservatórios animais.

As estratégias de controle da LTA, citadas a seguir, são preconizadas pelo

Ministério da Saúde (LACERDA, 1994). Em relação ao homem são baseadas no: (1) diagnóstico precoce e acurado; (2) tratamento completo com as drogas preconizadas; (3) adequado acompanhamento do processo de cura do paciente. Já com relação aos reservatórios de *Leishmania (Viannia) braziliensis* como cães, roedores e eqüinos de áreas endêmicas, o procedimento deve ser: (1) levantamentos sorológicos de cães infectados e eliminação de qualquer animal positivo e com lesão de pele; (2) relocação de eqüinos peridomésticos para áreas livres de flebotomíneos; (3) eliminação ou redução de roedores domésticos e peridomésticos. Por outro lado, as estratégias de controle destinadas contra a ação dos vetores incluem: (1) borrifação das casas com inseticidas residuais, (2) proteção com telas de janelas e portas, (3) uso de repelentes quando em áreas de florestas; (4) utilização de vestimentas que deixem poucas áreas do corpo exposta à picada do vetor.

Recentemente, estudos têm sido voltados para o controle do vetor por utilização de coleiras impregnadas com deltametrina em cães (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997; DAVID *et al.*, 2001; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2002a; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2002b; DAVIES *et al.*, 2002; MAROLI *et al.*, 2002). Ademais, alguns trabalhos mostraram que houve diminuição da soroconversão em ambos os hospedeiros (cães e humanos) com a utilização desta coleira em cães de áreas endêmicas (BADARÓ *et al.*, 2002).

Em relação ao tratamento quimioterápico, KIRBY (1996) cita que o maior problema para desenvolver uma nova droga antiprotozoária é que estes microorganismos, diferentemente de bactérias patogênicas, apresentam muitos passos bioquímicos semelhantes aos de animais superiores. Desta forma, é muito difícil identificar compostos com seletividade suficiente para eliminar o parasito sem que causem danos às células do hospedeiro. Mesmo assim, alguns passos metabólicos dos tripanosomatídeos diferem dos mamíferos e são visados como alvos para a quimioterapia.

Da mesma forma que em casos de LV, a LTA também é submetida aos mesmos agentes quimioterápicos. Os maiores exemplos são os antimoniais pentavalentes, como o Glucantime[®], considerados de eleição para o tratamento de pessoas doentes. Porém, estas drogas estão associadas aos mais variados efeitos colaterais e a freqüentes recidivas devido à seleção de parasitos resistentes (GASSER *et al.*, 1994; BERMAN, 1997; GUPTA, 1998). Drogas de segunda linha como anfotericina B e pentamidinas são de limitada eficácia e causam alta toxicidade, além disso, são caras e devem ser administradas por via intravenosa (OLLIARO & BRYCESON, 1993). Os azóis como cetoconazol, fluconazol e itraconazol, são drogas que oferecem uma possibilidade de tratamento, entretanto necessitam de maiores estudos (WALI *et al.*, 1990; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2002).

2.9 Zoonoses e hospedeiros de agentes de doenças transmissíveis

Antes de adentrar no assunto específico de hospedeiros reservatórios de *Leishmania braziliensis* será feita uma breve abordagem sobre as mais diversas definições de zoonoses e de hospedeiros reservatórios. Essas definições, muitas das quais controversas, em muito contribuem para gerar confusões no entendimento da dinâmica de transmissão das mais variadas doenças de importância em saúde pública.

Segundo HUBÁLEK (2003) a fonte de infecção sempre foi considerada como um fator extremo em epidemiologia. Sendo assim, as doenças de comunicação humanas podem ser classificadas, de acordo com a fonte de infecção, em: (1) antropozoonoses quando a fonte é humana; (2) zoonoses quando a fonte é um animal; e (3) sapronoses quando a fonte é um substrato abiótico. A fonte de infecção é freqüentemente o reservatório ou, em termos ecológicos, o habitat onde o agente etiológico da doença prospera, cresce e replica.

BELL *et al.* (1988) definem zoonoses (grego “zoon” = animal) como doenças transmitidas de animais vivos para humanos. Antigamente, essas doenças eram chamadas de antropozoonoses. Além disso, as doenças transmitidas de homens

para animais eram chamadas de zooantroponoses. Entretanto, segundo HUBÁLEK (2003) muitos cientistas usavam estes termos no sentido reverso ou indiscriminadamente, e um comitê internacional de zoonoses resolveu abandonar estas terminologias e recomendar a utilização apenas de “zoonoses” e definindo como:

“Doenças e infecções as quais são naturalmente transmitidas entre animais vertebrados e o homem.”

(OMS, 1967)

As doenças zoonóticas também são classificadas de acordo com o ecossistema em que circulam, sendo consideradas como zoonoses sinantrópicas aquelas com um ciclo urbano (doméstico) na qual a fonte de infecção são animais domésticos e sinantrópicos. Como zoonose exoantrópica aquela que há um ciclo silvestre (feral ou selvagem) no foco natural fora do habitat humano (PAVALOVSKY, 1966).

Diante da breve explicação sobre terminologias das doenças transmissíveis, segundo TAYLOR *et al.* (2001), 62% de todos os patógenos humanos são classificados como zoonoses e, 77% de patógenos de animais de produção e 91% dos de carnívoros domésticos infectam múltiplos hospedeiros. Além disso, 57 das 70 doenças de animais, consideradas ser de grande importância internacional, infectam múltiplos hospedeiros. HAYDON *et al.* (2002) salientaram que patógenos que infectam mais de uma espécie hospedeira são, por definição, igualmente encontradas em várias populações hospedeiras, algumas das quais podem constituir reservatórios de infecção.

Diante disso, em busca de compreender o que é um reservatório de uma infecção e seu papel em doenças zoonóticas, uma série de definições, muitas delas também controversas, foram encontradas na literatura. HAYDON *et al.* (2002) listaram perfeitamente as diferentes características atribuídas a um reservatório encontradas em diversas publicações: (1) infecções em reservatórios são freqüentemente não patogênicas; (2) qualquer hospedeiro natural é um hospedeiro reservatório; (3) o reservatório deve ser uma espécie diferente; (4) reservatórios são

hospedeiros não importantes economicamente; (5) os reservatórios devem ser hospedeiros primários ou secundários. Além disso, os mesmos autores comentaram encontrar algumas definições que implicam como reservatório apenas uma espécie e outras que um sistema ecológico pode agir como reservatório. Por outro lado, segundo PEREIRA (2005, p. 445), é considerado como reservatório:

“Local onde o agente infeccioso se aloja ou se multiplica. Trata-se de ser humano ou animal, artrópode, planta, solo ou matéria inanimada (ou uma combinação destes) em que um agente infeccioso normalmente vive e se multiplica em condições de dependência primordial para a sobrevivência e no qual se reproduz de modo a poder ser transmitido a um hospedeiro suscetível.”

HAYDON *et al.* (2002) sugerem uma estrutura para definir e identificar reservatórios que, segundo eles, pode ser aplicada em qualquer sistema de doenças. Para estes autores, uma população alvo é aquela que é de interesse ou de preocupação em relação às doenças transmissíveis. Todas as outras populações de hospedeiros, potencialmente suscetíveis, que estejam epidemiologicamente conectadas, direta ou indiretamente, com a população alvo, são consideradas populações não-alvo e que podem potencialmente constituir toda ou parte dos reservatórios.

ASHFORD (1997) reconhece muito dos problemas no uso do termo reservatório e propôs a definição de que um reservatório é um sistema ecológico no qual um agente infeccioso sobrevive indefinidamente. Porém, para HAYDON *et al.* (2002) esta definição é falha já que não é considerada uma população alvo, sendo assim, não requer que um reservatório seja fonte de infecção para uma população alvo. Além disso, ASHFORD (1997), em outra publicação, define hospedeiro reservatório como aquele essencial para a manutenção do patógeno. Por outro lado, HAYDON *et al.* (2002) contra argumentam que reservatórios podem incluir hospedeiros não essenciais, uma vez que estes, apesar de não serem essenciais para a manutenção, podem desempenhar um papel importante na transmissão de um patógeno para a população alvo.

CHABLE-SANTOS *et al.* (1995) listaram cinco critérios que caracterizaram um hospedeiro reservatório primário: (1) superposição da distribuição geográfica e temporal dos reservatórios e vetores; (2) sobrevivência do hospedeiro reservatório suficientemente longa para garantir a transmissão; (3) prevalência da infecção entre os reservatórios em níveis superiores a 20%; (4) manutenção do parasito na pele ou sangue em quantidades suficientes para infectar facilmente o vetor; e (5) a espécie de parasito encontrada no reservatório e no homem ser a mesma.

Ademais, SHAW (1988) salienta que os hospedeiros podem ser classificados em três tipos: (1) hospedeiro reservatório primário como aquele responsável pela manutenção do ciclo do parasito na natureza; (2) hospedeiro reservatório secundário o que é infectado e serve como fonte de infecção para o vetor, porém não é capaz de manter o ciclo indefinidamente; (3) hospedeiro acidental, aquele que se infecta, mas não representa fonte de infecção.

Pelo exposto fica claro que algumas definições epidemiológicas se contrapõem, ou mesmo se complementam, e que qualquer que seja a definição, uma nova versão parece sempre insuficiente para supri-la.

2.10 Hospedeiros reservatórios de *Leishmania* dermatóptica

Diante de toda a explanação sobre os mais variados conceitos epidemiológicos sobre doenças transmissíveis, serão abordadas, neste texto a seguir, algumas publicações referentes aos hospedeiros de *Leishmania* considerados como reservatórios ou com potencialidade para tal, dentre eles, encontram-se animais silvestres e domésticos.

Há tempos se conhece que a prevalência da LTA, em suas diferentes espécies de *Leishmania*, está relacionada a certos aspectos ecológicos de seus transmissores e reservatórios silvestres (FALQUETO *et al.*, 1986). As várias espécies de flebotomíneos possuem habitats preferenciais o que parece determinar os diferentes

hospedeiros de *Leishmania* em diferentes ecótopos. Para se ter uma idéia, algumas espécies de flebotomíneos possuem biologia que lhes confere estarem presentes nas partes altas das árvores, ou seja, com ecologia arbórea definida. Outras espécies estão mais presentes próximas ao solo, demonstrando outra ecologia. Evidentemente, que em cada um desses níveis há diferentes faunas que irão servir de fonte alimentar do inseto, sendo considerados como reservatórios naturais (NEVES, 1997; CANTARINO, 1998). Sendo assim, no ambiente silvestre, a infecção natural com as espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA, tem sido relatada entre os marsupiais, edentatas, didelfídeos e roedores (NEVES, 1997).

Foram os trabalhos de FORATTINI (1960) e FORATTINI *et al.* (1972; 1973) que evidenciaram a importância de roedores silvestres como reservatórios de *Leishmania* da forma tegumentar da doença. Para se ter uma idéia, LAINSON & SHAW (1979) e BARBOSA (1985) relatam que das 43 espécies de mamíferos encontradas naturalmente infectadas por *Leishmania*, 27 pertencem à ordem Rodentia. Especificamente em relação à *Leishmania braziliensis*, NEVES (1997) comentou que já foram isoladas de exemplares das espécies dos roedores *Akodon cursor*, *Proechimys dimidiatus* e *Oryzomys* sp. CANTARINO (1998), por sua vez, salienta que muitos dos reservatórios primários de *Leishmania braziliensis* são animais que vivem em colônia, cujos hábitos fornecem condições para os flebotomos vetores picarem posteriormente a outro indivíduo, perpetuando, assim, o parasita naquela população.

PATZ *et al.* (2000) chamaram atenção para o fato de que as modificações ambientais ocorridos nos últimos tempos têm levado a modificações na biologia tanto dos vetores como dos parasitos zoonóticos, nos quais as Leishmanioses estão envolvidas. Sendo assim, a LTA, primariamente conhecida como enzootia de animais silvestres passou a apresentar características de transmissão peridoméstica e doméstica. Diante disso, os animais domésticos no Continente Americano também têm sido encontrados naturalmente parasitados por *Leishmania dermatópica*. Dentre eles podemos destacar os eqüídeos e os canídeos.

Em relação aos eqüídeos, MAZZA (1927), na Argentina, foi o primeiro a relatar o encontro de amastigotas em úlcera na região periocular de um cavalo (*Equus caballus*). Posteriormente, PONS & LONDRES, em 1968, assinalaram a freqüência de infecção pelo parasito em asnos (*Equus asinus*) da Venezuela, o que foi confirmado, posteriormente, por outros pesquisadores (AGUILAR *et al.*, 1979; BONFANTE *et al.*, 1979; BONFANTE *et al.*, 1981). Especificamente no Brasil, jumentos infectados com *Leishmania* sp foram relatados por ALENCAR (1959) no Ceará e, VEXENAT *et al.* (1986) na Bahia. Posteriormente, novos casos de eqüídeos portando *Leishmania* foram descritos na literatura ocorrendo em diferentes localidades do Brasil (AGUILAR & RANGEL 1986; AGUILAR *et al.*, 1986; AGUILAR *et al.*, 1987; FALQUETO *et al.*, 1987; YOSHIDA *et al.*, 1988; BARBOSA-SANTOS *et al.*, 1994).

Para alguns pesquisadores (FALQUETO *et al.*, 1986) o cão seria o elo essencial para a disseminação da LTA no ambiente doméstico. Por outro lado, em uma extensa revisão de literatura envolvendo mais de 90 estudos reportando LTA em cães (*Canis familiaris*), REITHINGER & DAVIES (1999) comentaram não existir evidências concretas para considerar os cães como hospedeiros reservatórios primários dos protozoários. Para eles, pelo fato da transmissão da LTA estar em amplo crescimento no meio doméstico e ainda, diante dos estudos reportando altas taxas de infecção de LTA em cães, há uma tendência em acreditar que eles também sejam hospedeiros reservatórios do protozoário desta doença. Por outro lado, BASANO & CAMARGO (2004) afirmaram que além de cães, cavalos e jumentos e até os gatos são hospedeiros de *Leishmania* e que podem estar implicados na transmissão peridoméstica.

2.11 A infecção de gatos por *Leishmania* spp

Diferentemente do que se acredita, desde o século passado, casos clínicos de Leishmaniose Felina (LF) vêm sendo diagnosticados em várias regiões do mundo. Além disso, os inquéritos epidemiológicos realizados com felinos, quer sejam pela busca do próprio protozoário, quer pela detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp,

têm demonstrado taxas consideráveis de infecção desta espécie animal pelo protozoário.

A revisão sobre Leishmaniose Felina abordada a seguir trata-se de uma compilação resumida de dois artigos de revisão sobre o assunto, de nossa autoria, publicados em Portugal: (1) Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias (v. 99, n. 550, 79-87, 2004) sob título “*Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown?*” (ANEXO I) e (2) Revista Todos os Gatos (v. 8, p. 22-23, 2005) intitulado “Leishmaniose em gatos domésticos: é bom manter-se informado!” (ANEXO II).

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas, de grande impacto em saúde pública mundial, causadas por diferentes espécies do protozoário difásico do gênero *Leishmania*. Como doença de ciclo indireto, o protozoário é transmitido pela picada de flebotomíneos, cujos gêneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, são encontrados no Velho e Novo Mundo, respectivamente (OMS, 2005). A diversificação das espécies de *Leishmania* é responsável pela forma da doença que manifesta em seu hospedeiro, dentre elas, destacamos as Leishmanioses Visceral (LV) e Cutânea (LC). Alguns canídeos, em especial os cães domésticos (*Canis familiares*), são incriminados como hospedeiros reservatórios dos protozoários *L. infantum* (= *L. chagasi* – MAURICIO *et al.*, 1999) para transmissão humana, ocasionando a LV. Além disso, em locais onde é endêmica, a LC humana vem crescendo, sendo atribuído ao cão também, o papel de hospedeiro reservatório, principalmente em casos de infecção por *L. (Viannia) braziliensis*. O cão, além de transmitir o protozoário ao vetor, também padece da doença (MADEIRA *et al.*, 2003).

Desta forma, com o intuito de evitar a infecção humana quanto canina, estudos tem sido voltados ao bloqueio da cadeia de transmissão, tendo como objeto alvo, os flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997; DAVID *et al.*, 2001; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2002a; OLIVEIRA-LIMA *et al.*, 2002b; DAVIES *et al.*, 2002; MAROLI *et al.*, 2002). Pesquisas de sucesso têm comprovado a diminuição da soroconversão em ambos hospedeiros com a utilização de coleiras impregnadas com

deltametrina em cães de áreas endêmicas para a enfermidade (BADARÓ *et al.*, 2002). Por outro lado, advindo deste promissor controle, associado ainda urbanização das leishmanioses (FRANKE, 1999; DESJEUX, 2002), tem sido especulado o possível papel de outros animais como hospedeiros reservatórios de *Leishmania* e/ou mesmo padecendo da enfermidade, uma vez que, ambos, vetor e protozoário, precisam manter suas sobrevivências em algum hospedeiro caso não encontrem mais ambiente propício nos cães. Assim, dentre os animais domésticos, o gato vem despontado como um provável candidato (KILLICK-KENDRICK, 2002, PENNISI, 2002, SIMÕES-MATTOS, 2002; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004b; SIMÕES-MATTOS, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, no prelo). Essa afirmação vem baseada em recentes relatos de casos clínicos de leishmaniose felina (LF). Logo, apesar da leishmaniose em gatos ser considerada um achado raro por alguns autores, casos de manifestações cutâneas e/ou implicação visceral, associados a esta doença, vêm sendo relatados na América, Europa, Ásia e África. Além disso, estudos de inquéritos epidemiológicos (sorológicos e parasitológicos) realizados em vários países, têm demonstrado taxas consideráveis de infecção nesta espécie animal (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a).

Historicamente, a LF começou a ser diagnosticada no início do século passado como casos esporádicos. Para se ter uma idéia, de 1927, quando o primeiro caso clínico de LF foi diagnosticado na Argentina por Salvador Mazza (BRUMPT, 1949), até os dias de hoje, a literatura mundial tem registros de um total de 30 (SIMÕES-MATTOS, 2005). Destes, 12 (40%) ocorreram no Novo Mundo e 18 (60%) no Velho Mundo. Entre os detectados no Novo Mundo, um foi na América do Norte e 11 na América do Sul. Para se ter uma idéia, o Brasil é detentor do maior número e mais recentes casos clínicos de LF do mundo, perfazendo seis no total. O primeiro deles foi encontrado pela equipe de Evandro Chagas no Estado do Pará (MELLO, 1940) quando pesquisavam, na região, os possíveis reservatórios de LV. A partir desta época, somente em 1996 retomamos mais um novo caso, desta vez, em Minas Gerais (PASSOS *et al.*, 1996). Posteriormente, um caso em São Paulo (SAVANI *et al.*, 2002; 2004), dois no Rio de Janeiro (SCHUBACH *et al.*, 2004) e um em Mato Grosso do Sul (de SOUZA *et al.*, 2005). Excetuando-se o caso paraense, em que a espécie de

Leishmania não foi identificada, e o paulista, por se tratar de cepa viscerotrópica, os demais foram identificados como infectados por cepas dermatrópicas.

No Velho Mundo, três casos de foram diagnosticados na Ásia, dois na África e 11 em países da Europa. Até o momento, a Suíça e Portugal com um caso cada, Espanha e França com três cada e, Itália, detentora de cinco do total de casos europeus.

Segundo SIMÕES-MATTOS (2005), o levantamento destes registros de LF permitiu avaliar alguns aspectos importantes com relação à manifestação da doença em felinos. Do total de casos clínicos de LF, 86,7% exibiram manifestações cutâneas, sendo que em 50% dos animais foi o único sinal observado. Além disso, foram encontradas taxas de 20% de linfadenopatia e 10% de visceromegalia associadas às manifestações cutâneas. Por outro lado, a linfadenopatia é pouco citada (3,3%) como única manifestação da doença. De forma interessante, as manifestações cutâneas também foram observadas na maioria dos casos de infecção por cepas de *Leishmania* viscerotrópicas. Os nódulos (39,5%) e as úlceras (31,6%) foram as lesões mais predominantes, seguidas por dermatite inespecífica (18,5%) e lesão vegetativa e pápulas, ambas com mesma frequência (5,2%). As manifestações clínicas observadas nos gatos com leishmaniose parecem ser similares àquelas que ocorrem em leishmanioses humana e canina naturais. Um dado importante é que, a cabeça (75%), e em particular, o nariz (48%), foram as áreas mais afetadas do corpo dos gatos. A orelha (26%) e região ocular (18,6%) despontam em seguida. Para alguns estudiosos, o maior acometimento de lesões nestas regiões anatômicas parece ser coerente com a habilidade dos flebotomíneos em picar áreas com menor quantidade de pelos (BONFANTE-GARRIDO *et al.*, 1996).

As técnicas de diagnóstico mais utilizadas para detectar leishmaniose nestes gatos foram citologia e/ou histologia, apresentando considerável percentagem de positividade. O meio de cultura, por sua vez, foi citado em um pouco mais da metade dos casos com sucesso parcial de isolamento de formas promastigotas. Ao contrário do

que ocorre com esta técnica, a citologia aspirativa é um diagnóstico viável na prática médica veterinária por ser barato e de fácil execução. As provas de biologia molecular, por sua vez, tiveram importância na identificação de alguns dos protozoários isolados, sendo encontrada, nos gatos doentes, infecção por *L. chagasi*, *L. venezuelensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, sub gênero *Viannia* e *Leishmania* sp.

Desde os primeiros relatos de infecção de gatos por *Leishmania* sp, os estudos epidemiológicos passaram a ser uma ferramenta importante na determinação da infecção natural em gatos, principalmente nos locais onde ocorreram casos da doença. Assim, de 1912 até 2002, estes estudos, realizados através de inquéritos parasitológicos (SERGENT *et al.*, 1912; GIORDANO, 1933; GIMENO ONDOVILLA, 1933; CHAGAS *et al.*, 1938; ALENCAR *et al.*, 1955; DEANE, 1956; MORSY *et al.*, 1980; SHERLOCK, 1996; PENNISI *et al.*, 2000), bem como por inquéritos sorológicos (SHERLOCK, 1996; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2001; SIMÕES-MATTOS, 2002; OLIVEIRA, 2002; MICHAEL *et al.*, 1982; MORSY *et al.*, 1988; MORSY & ABOUL el SEOUD, 1994; BEZ, 1992; MARECHAL, 1993; OZON *et al.*, 1999; PENNISI *et al.*, 1998; POLI *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 2002; PORTÚS *et al.*, 2002; MaC VEAN *apud* KIRKPATRICK *et al.*, 1984), mostraram que nenhum dos gatos que albergava os protozoários de *Leishmania* sp exibiam algum sinal ou sintoma de leishmaniose. De maneira similar, daqueles com sorologia positiva, apenas dois (1,5%) estavam doentes. Diante disso, as taxas médias obtidas, considerando todos os inquéritos sorológicos (18,2%) e parasitológicos (5,5%), permitem questionar qual o papel de gatos infectados por *Leishmania* sp na transmissão da doença em áreas endêmicas, uma vez que eles são infectados, mas não mostram sinal ou sintoma clínico compatível com a doença. No entanto, infelizmente, os sinais e sintomas de leishmaniose em gatos definitivamente ainda não são bem conhecidos.

Dessa maneira, na tentativa de entender o desenlace da doença nesta espécie animal, estudos avaliaram a suscetibilidade à infecção experimental. Porém, os primeiros trabalhos não obtiveram sucesso na reprodução da doença manifesta (LAVERAN, 1913; NICOLLE & BLAIZOT, 1912 *apud* MARECHAL, 1993;

GIORDANO, 1933; MELLO, 1940; DEANE, 1958; BARBOSA-SANTOS *et al.*, 1988). Em contra partida, mais recentemente, a infecção e doença em gatos, ocorridas pela inoculação experimental por *L. donovani*, *L. chagasi* (KIRKPATRICK *et al.*, 1984) e *L. (Viannia) braziliensis* (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2005), demonstraram a suscetibilidade da espécie felina. Especificamente, em relação aos trabalhos com *L. braziliensis*, agente da LTA, o que se pôde observar foi que os gatos exibiram lesões similares àquelas observadas em casos clínicos naturais de LC humana, canina e felina. Além disso, tiveram cura clínica espontânea por volta dos 10 meses de infecção. A resposta imune, por sua vez, demonstrou que os títulos de anticorpos ocorrem mais tardiamente à lesão, e mesmo após a auto-cura clínica, alguns poucos animais ainda apresentavam títulos até o final de 15 meses do experimento, o que permite suspeitar de persistência do parasito no hospedeiro.

Tendo em vista tanto os casos clínicos de LF quanto as taxas de infecção (sorológicas e parasitológicas), parece evidente que gatos são atrativos para certos flebotomíneos. Apesar dos poucos estudos objetivando conhecer a preferência alimentar de diferentes espécies de flebotomíneos, algumas pesquisas provaram haver alguma tendência preferencial dos flebotomíneos pelos gatos quando comparados a outras espécies animais (JOHNSON *et al.*, 1993; El SAWAF *et al.*, 1989; OGOSUKU *et al.*, 1994; COLMENARES *et al.*, 1995), e que a taxa de ingurgitamento destes insetos é alta quando expostos ao contato com este mamífero em condições laboratoriais (SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Para se ter uma idéia, utilizando *Lutzomyia migonei*, um dos principais vetores de *L.(V.) braziliensis* no nordeste do Brasil, a taxa de flebotomos ingurgitados, após sugar gato não infectado, foi de 90% (OLIVEIRA-LIMA, informação verbal), ficando evidente que a alimentação deste vetor brasileiro pode ser realizada nesta espécie animal. Entretanto, o xenodiagnóstico, técnica utilizada para detecção e isolamento de um patógeno usando seu vetor artrópode natural após contato com um provável hospedeiro, é a forma mais eficaz de comprovar se determinada espécie animal pode ser considerada como reservatório de *Leishmania* sp. Diante disso, nosso grupo de pesquisa obteve resultados positivos com o xenodiagnóstico quando encontrou *Lutzomyia migonei* infectado, após ter sugado um

gato experimentalmente inoculado com *L. braziliensis* (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004b). Com este achado, fica demonstrado que gatos são potenciais hospedeiros reservatórios de *L. braziliensis*. Assim, estudos semelhantes devem ser conduzidos com outras espécies de *Leishmania* e seus respectivos vetores naturais, principalmente em países da Europa onde a doença tem alta prevalência.

De forma interessante, alguns pesquisadores europeus, suspeitam que a preferência alimentar dos flebotomíneos estudados estejam, mais provavelmente, relacionada com a disponibilidade de hospedeiros do que com a atratividade particular de cada um deles. Assim, médicos veterinários e proprietários devem ficar alertas para a LF, já que a criação de gatos apresenta-se em plena expansão em todo o mundo. Assim, acreditamos que a alta densidade populacional desta espécie animal, de hábitos crepusculares e noturnos, similares aos vetores, associado ao maior controle da LV e da LTA canina sejam fatores que possam predispor estes animais à infecção por *Leishmania* em áreas endêmicas. Em alguns países em desenvolvimento, por exemplo, onde esta enfermidade é endêmica, os gatos, possuindo ou não proprietários, em sua grande maioria, não apresentam qualquer controle clínico, sanitário e epidemiológico sendo que, quase na totalidade destes, não é realizado nenhum tipo de exame de animais enfermos ou *post-mortem*. Além disso, a população de felinos de rua e semi-domiciliados é considerada grande, o que não difere tanto de alguns países da Europa. Advindo disso, a problemática reside no fato não só por ignorar a importância epidemiológica dos gatos domiciliados, como da falta destes dados, principalmente, em relação aos semi-domiciliados e aos de rua. É importante salientar que na maioria destes países, não só os cães, mas principalmente os gatos, não são freqüentes em clínicas veterinárias. Além disso, o diagnóstico clínico é considerado de eleição pelos profissionais da área, haja vista que exames complementares acarretam maiores custos aos proprietários dos animais. Um outro fator importante é que pelo fato das manifestações clínicas de LF não estarem ainda bem definidas, esta pode ser facilmente confundida com neoplasias e doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a). A confusão com infecção por fungos pode ser considerada a mais problemática, principalmente nos

casos de histoplasmose, esporotricose e criptococose. Além disso, o diagnóstico clínico de infecções fúngicas ao invés de leishmania, determina a prescrição de antimicóticos que podem causar cura temporária da leishmaniose, uma vez que algumas destas drogas têm relativo efeito contra *Leishmania* sp (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2002). Assim, percebe-se que somente as técnicas laboratoriais podem, por enquanto, evitar os enganos nos diagnósticos clínico/terapêutico. Diante desta breve explanação, acreditamos que a infecção por *Leishmania* spp, com ou sem sintomas clínicos, deve estar sendo sub-diagnosticada nos países onde a enfermidade é endêmica. Sendo assim, isso justificaria a discrepância verificada entre as altas taxas de infecção obtida nos estudos epidemiológicos e o baixo número de casos clínicos relatados em todo mundo.

Depois da publicação destes dois artigos de revisão (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004; SIMÕES-MATTOS, 2005) quatro novos casos clínicos de LF ocorreram em 2005: um na Espanha (LEIVA *et al.*, 2005), dois na Suíça (RÜFENACHT *et al.*, 2005) e um na França (GREVOT *et al.*, 2005). Diante disso, uma nova revisão aceita para publicação na Clínica Veterinária intitulada “Leishmaniose Felina: revisão de literatura” (ANEXO III), atualiza parte desses dados.

2.12 O gato (*Felis catus*): etologia e estimativas populacionais.

Desde a domesticação inicial pelos egípcios, o gato vem mantendo um contato próximo com o humano eliminando características selvagens. Porém, excetuando-se os gatos de raça, o gato comum vem mantendo a sua reprodução e adaptação ao ambiente independente do controle humano. Segundo BRADSHAW *et al.* (1999), desde esta domesticação, os gatos devem ter apresentado aproximadamente 4.000 gerações em contato com a espécie humana. No tocante à evolução natural da espécie felina, este número de gerações pode ser pequeno para proporcionar profundas modificações evolutivas. Por outro lado, pode ser considerado grande quando se trata da adaptação desta espécie ao ciclo de determinadas enfermidades zoonóticas.

Deve-se salientar que a criação de gatos apresenta-se em crescimento em todo o mundo. É estimado que nas próximas décadas, nos países do primeiro mundo, os felinos devem superar os cães em número de criadores (MANNING & SERPELL, 1994). Atualmente, o gato doméstico já é o animal de companhia mais numeroso nos Estados Unidos e em muitas partes da Europa, sendo considerado mais comum do que o cão (ANON, 1995 *apud* BRADSHAW *et al.*, 1999).

Na cidade de Recife, estudos demonstraram que os gatos são criados em 20% dos domicílios (LIMA Jr., 1999). Estes autores salientam que com o desenvolvimento econômico da região, é possível que este número cresça nas próximas décadas. Para se ter uma idéia, nos Estados Unidos, na década de 70, segundo FRANTI *et al.* (1974), há relatos da existência de animais de estimação, a maioria cães e gatos, em até 77% das residências de áreas investigadas. Segundo estes autores, no Estado da Califórnia, por exemplo, a criação destes animais parecia estar mais relacionada a fatores econômicos, ou seja, pessoas que criavam animais, tendiam a ter renda maior do que aquelas que não criavam, e a presença de crianças no domicílio aumentava a chance de existência de animais de estimação. No Brasil, ainda é observada a influência da Inquisição na população com relação ao gato, porém esta mentalidade tem mudado com o passar do tempo. No Ceará é observado que uma considerável parcela da população, especialmente na periferia das grandes cidades como Fortaleza, dão condições de sobrevivência e reprodução a estes animais, fornecendo-lhes restos de comida, freqüentemente nas calçadas das ruas. Porém, ao que parece, a estes "proprietários" de gatos de rua, é facultada a obrigação dos cuidados higiênicos e sanitários, permanecendo estes animais em contato com outros e com o homem podendo ocasionar sérias doenças zoonóticas.

Para LIMA Jr (1999) há diversos motivos para o desconhecimento dos problemas de saúde pública relacionados aos animais de estimação em nosso meio, sendo os mais importantes a falta de registro sistemático, a subnotificação dos eventos, além da falta de estudos e relatos. Além disso, o baixo nível de instrução de grande parcela da população e a falta do reconhecimento de muitas destas ocorrências como

problemas de Saúde Pública agravam ainda mais a situação. Porém, para este autor, o que efetivamente dificulta um adequado acesso às informações de interesse para os serviços de saúde pública é a falta de uma adequada caracterização das populações animais. Usualmente, os serviços oficiais utilizam apenas estimativas das populações animais, de precisão e confiabilidade desconhecidas para o planejamento e avaliação de atividades de Saúde Pública, incluindo o controle de zoonoses.

No Brasil, as campanhas de vacinação anti-rábica em pequenos animais são tradicionalmente planejadas e avaliadas considerando-se estimativas de população canina, calculadas com base em recomendações feitas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990) e pelo Instituto Pasteur de São Paulo (REICHMANN *et al.*, 1999). De acordo com essas instituições, a razão entre a população humana e canina (domiciliada) varia de 10:1 a 7:1. Além disso, a população felina é estimada em 10% da canina. Porém, esta estimativa é por muitas vezes de aplicabilidade equivocada, como pode ser observado a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Razão da população canina por habitante em diferentes localidades do mundo.

Localidades	Razão cão:habitante
Araçatuba (SP/Brasil)	1:3,57
Manhatan (EUA)	1:4,14
Zimbabiwe	1:6,5
Guayaquil (Equador)	1:7,2
Hermosillo (México)	1:8
Recife (PE/Brasil)	1:9,14
Tunísia	1:9,17
Lima e Callao (Peru)	1:10
Dumaguete (Filipinas)	1:11,2
Nigéria (área urbana)	1:21
Nigéria (área rural)	1:45

Fonte: Adaptado de LIMA Jr., 1999

Pela tabela ficou evidente a grande variação da população animal em relação à humana de acordo com a localidade. Além disso, LIMA Jr. (1999) cita que as

diferentes populações possuem tamanhos e composições variadas, e continuamente estão sujeitas a mudanças, resultantes da influência de múltiplos fatores, como biológicos e culturais. Desta forma, o conhecimento do tamanho de uma população e a estimativa de diversos atributos populacionais é importante para uma melhor compreensão dos fenômenos biológicos, e deve ser realizada utilizando técnicas adequadas, como o censo ou a amostragem.

Se as estimativas da população canina são equivocadas, para a felina é um fator ainda a se estudar. O Estado do Ceará é composto por 184 municípios sendo que o Núcleo de Endemias (NUEND) da Secretaria de Saúde do Estado os agrupa em 21 séries, ou também conhecidos como células regionais de saúde. Para se ter uma idéia, há uma discrepância considerável entre o cálculo preconizado para estimativa populacional de gatos e os dados oficiais obtidos nas campanhas anti-rábicas. Para o NUEND, a meta estimada de vacinação anti-rábica de animais de companhia é de aproximadamente 1.200.000 animais, sendo 900.000 cães e 300.000 gatos. Em relação aos cães, a estimativa populacional no Estado é baseada em 12,5% da população humana. Por outro lado, de acordo com o diretor do NUEND, Dr. Nélio Batista de Moraes, torna-se difícil estabelecer uma estimativa para a população felina, uma vez que esta tem se comportado ao longo do tempo de forma extremamente heterogênea nos diversos municípios do Estado (Figura 13).

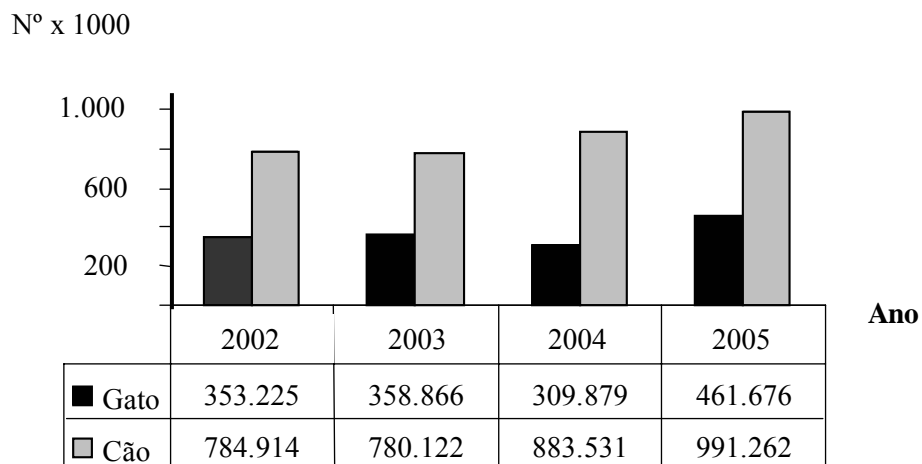


Figura 13. Populações felina e canina vacinadas contra o vírus da raiva no Estado do Ceará de 2002 a 2005.

A título de curiosidade, longe de se estabelecer dados concretos acerca das populações caninas e felinas em algumas localidades do Estado do Ceará, as tabelas a seguir exibem o comportamento populacional destas duas espécies animais no município de Fortaleza de 1998 a 2005 (Tabela 2) bem como no Maciço de Baturité de 2002 a 2005 (Tabela 3). Os cálculos foram baseados na população humana referente ao Censo Populacional do IBGE (2000), sendo de 123.814 habitantes no Maciço de Baturité e 2.138.234 habitantes em Fortaleza.

Tabela 2. Comportamento populacional canino e felino no município de Fortaleza (Ceará - Brasil) de 1998 a 2005.

População	Ano								Média
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
Canina	171.948	183.844	153.640	204.415	212.188	220.260	215.556	213.953	196.976
% da humana	8	8,6	7,2	9,6	9,9	10,3	10,1	10	9,2
Felina	45.099	56.647	52.679	73.463	74.844	89.286	74.372	74.305	67.587
% da humana	2,1	2,6	2,5	3,4	3,5	4,2	3,4	3,4	3,1
% da canina	26,2	30,8	34,3	35,9	35,2	40,5	34,5	34,7	34,0

Segundo BONAVIDES (informação verbal), o Centro de Controle de Zoonoses do município de Fortaleza questiona os motivos pelo quais, nas últimas vacinações, esteja havendo um considerável aumento no número de gatos, entre eles são citados: (1) aumento na população felina devido ao aumento de criadores no município; e/ou (2) maior conscientização por parte do proprietário da importância de também se vacinar felinos. Por outro lado, comenta também que a regional 2 de Fortaleza, regional esta que abrange os bairros nobres da cidade, sempre está aquém das expectativas de vacinação e que este fato poderia estar atribuído à prática de vacinação em clínicas veterinárias particulares, não sendo computados no censo vacinal.

Tabela 3. Comportamento populacional canino e felino no Maciço de Baturité (Ceará - Brasil) de 2002 a 2005.

População	Ano				Média
	2002	2003	2004	2005	
Canina	14.175	15.201	18.856	17.529	16.440
% da humana	11,5	12,3	15,2	14,1	13,3
Felina	8737	9076	8972	11750	9633
% da humana	7	7,3	7,2	9,5	7,8
% da canina	61,6	59,7	47,6	67	59

Levando-se em conta que os gatos possuem características territorialistas e que são dificilmente manejados para fora dos domicílios em que estão habituados, muitas pessoas não conseguem contê-los e levá-los às campanhas de vacinação. Além disso, muitos gatos vivem em condições de semiliberdade ou mesmo de forma pseudo-selvagem ou feral. Assim, pode-se acreditar que os dados numéricos da população felina ao longo do tempo denotam apenas uma pequena percentagem de gatos domiciliados e que ainda é um dado incoerente no tocante à estimativa da população felina de Fortaleza e do Maciço de Baturité uma vez que o número total de gatos domiciliados vacinados foi muito superior ao que se é preconizado pelos cálculos de estimativa populacional da OMS e do Instituto Pasteur.

Ademais, conforme a melhoria da qualidade de vida da população humana, especialmente no Nordeste, espera-se que a relação entre o homem e os animais domésticos (*pets*) siga, ou aproxime-se dos padrões atualmente observados em países desenvolvidos. Desta forma, pode-se acreditar que haverá uma tendência à maior criação de animais de estimação, maior proximidade e relação afetiva com eles, aumentando expectativa de vida destes. O aumento na longevidade, com menores taxas de mortalidade são decorrentes de um controle mais efetivo de doenças infecciosas e infecto-contagiosas. Porém, sabe-se que com isso, pode haver uma maior exposição a doenças de curso crônico, como no caso das Leishmanioses, podendo permanecer por um maior período de tempo, expostos aos vetores e seus parasitos. Além disso, na prática médica veterinária é observado que os gatos demonstram uma

grande facilidade em conviver com patologias por longos períodos, sem necessariamente exibir sinais e/ou sintomas, sendo a mesma condição não verificada em cães.

3 JUSTIFICATIVA

De acordo com o exposto, felinos domésticos podem infectar-se naturalmente e experimentalmente com o parasito causador das leishmanioses, apresentando ou não sinais e sintomas clínicos. A alta densidade populacional desta espécie animal, aliada ao seu estilo de vida como hábitos crepusculares e noturnos, associada ainda à urbanização da doença, e as estratégias de controle direcionadas aos cães, pode expor os gatos ao contato com o vetor em áreas endêmicas. Os gatos, em sua grande maioria, não apresentam qualquer controle clínico-patológico, não sendo realizado qualquer exame de animais enfermos ou *post-mortem*. Vale salientar que na maioria dos Estados da Federação, principalmente em regiões de baixo poder aquisitivo da população, não só os cães, mas principalmente os gatos não são freqüentes em clínicas veterinárias. Além disso, o diagnóstico clínico é considerado de eleição pelos profissionais da área, haja vista que exames complementares acarretariam maiores custos aos proprietários de animais. Diante dessas situações, podem não estar sendo diagnosticados casos de leishmaniose felina em regiões endêmicas.

Ademais, nas regiões endêmicas para leishmaniose, especialmente no Nordeste brasileiro, o poder público despense anualmente elevadas somas no tratamento de pessoas enfermas, controle de vetores e eliminação de hospedeiros reservatórios, além do grave prejuízo social que esta enfermidade ocasiona. Apesar disso, a incidência desta enfermidade permanece alta na região Nordeste. Em regiões de serras no Estado do Ceará, como o Maciço de Baturité, predomínio de LTA humana, bem como na capital Fortaleza, onde a LV é mais prevalente, observam-se gatos domésticos coabitando com humanos, cães, bem como outros animais, domésticos e selvagens. Diante da possibilidade de felinos domésticos estarem envolvidos na epidemiologia das leishmanioses humanas e caninas, tornam-se necessários estudos mais aprofundados, nesta espécie animal. Os estudos sobre a leishmaniose em gatos devem abranger principalmente à suscetibilidade à infecção

experimental, capacidade de albergar os parasitos, evolução clínico-imunopatológica, e poder de transmissão dos protozoários aos vetores. Por outro lado, caso sejam suscetíveis à infecção experimental, será possível sua utilização racional como modelo de estudos para leishmanioses. Caso apresentem cura espontânea da enfermidade, este trabalho poderá servir como base para novas pesquisas que visem a elucidação dos mecanismos patogénicos deste evento. Além disso, este experimento poderá auxiliar na elucidação da relação hospedeiro/parasito, no intuito de contribuir para uma possível profilaxia da leishmaniose humana.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencialidade do gato doméstico (*F. catus*) como hospedeiro reservatório de *Leishmania* spp.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a suscetibilidade do gato doméstico à infecção experimental com *L. (V.) braziliensis* isolado de caso humano de LTA;
- b) Avaliar a suscetibilidade do gato doméstico à infecção experimental com *L. (V.) braziliensis* isolada de caso de Leishmaniose Felina natural;
- c) Avaliar o aspecto clínico da infecção de gatos por *L. (V.) braziliensis*;
- d) Avaliar a ocorrência de disseminação visceral dos protozoários após infecção experimental;
- e) Avaliar a competência de gatos não infectados experimentalmente por *Leishmania* spp de servirem como fonte alimentar para flebótomos;
- f) Avaliar capacidade de gatos domésticos infectados experimentalmente com *L. (V.) braziliensis* em transmitir os protozoários ao vetor *Lutzomyia migonei*;
- g) Verificar a preferência alimentar de flebotomíneos a campo em relação a alguns hospedeiros conhecidos de *L. (V.) braziliensis* e ao gato;
- h) Avaliar a ocorrência de infecção natural por *Leishmania* spp, em gatos de áreas endêmicas do Ceará.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimento 1- Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com *L. (V.) braziliensis* isolada de paciente humano

5.1.1 Parasitos

Cepa de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/94/H-3227) isolada de pacientes com a forma cutânea da doença foi usada para infectar os gatos. Os parasitos, estocados em nitrogênio líquido, foram descongelados, lavados e cultivados como promastigotas a 26 °C em meio Schneider Drosófila (MSD – Sigma[®] Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo aquecimento, 2% de urina humana estéril, 2 mM L-glutamina (Gibco[®] BRL, Grand Island, NY) e antibióticos [100 UI/mL penicilina, 100 mg/mL sulfato de estreptomicina (Sigma[®])]. As subculturas foram preparadas durante a fase estacionária de crescimento e os parasitos utilizados até a 4^a passagem. Imediatamente antes da infecção, os parasitos foram recuperados das culturas, lavados em solução salina estéril (0,9%), contados em câmara de Neubauer e ajustados à concentração de 10⁷ promastigotas em 0,2 mL de solução salina.

5.1.2 Animais

Foram utilizados 13 gatos domésticos sem raça definida (SRD), obtidos no Centro de Controle de Zoonoses, de ambos os sexos, com idades aproximadas de 3 a 4 meses. Todos os animais foram alimentados com ração comercial (Eukanuba Chicken and Rice Formula[®] e Gatsy[®]) e água limpa à vontade. Passaram por um período de quarentena, e foram submetidos à vacinação contra panleucopenia, rinotraqueite, calicivirose e raiva, além da desverminação. Amostras do sangue dos animais experimentais foram submetidas ao laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para detecção do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) utilizando-se o *FeLV kit Detection Set*[®] (VMRD, Inc.). Durante todo o período experimental, os gatos tiveram acesso a um solário comunitário contendo material suficiente para

distração, descanso, sombra e sol, sendo o período de permanência de no mínimo 3 horas no período matutino e 2 horas no vespertino.

5.1.3 Infecção experimental

Os gatos foram previamente sedados com acepromazina 1% (1 mg/kg/SC - Acepran[®] - Univet S.A., São Paulo, Brasil) e anestesiados após 15 minutos com associação de xilasina 2% (1 mg/kg/IM – Anasedan[®] - Vetbrands Saúde Animal[®] – Paulínia, Brasil) e quetamina 10% (15 mg/kg/IM - Dopalen[®] - Vetbrands Saúde Animal[®] – Paulínia, Brasil). A seguir foram inoculados com uma concentração de 10^7 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em fase estacionária, em 0,2 mL de salina estéril a 0,9%. Três hamsters foram igualmente infectados com as mesmas cepas para avaliar a infectividade das formas promastigotas. Os sítios escolhidos foram o nariz e orelha direita, simultaneamente.

5.1.4 Avaliação das manifestações clínicas

Após a infecção experimental, os animais foram inspecionados diariamente até o aparecimento de lesão. Posteriormente, foram feitas medições quinzenais para cálculo da área das lesões. Para o cálculo da área, as lesões foram medidas nos diâmetros maior e menor e submetidos à fórmula $\pi r_1 r_2$, sendo considerado r_1 e r_2 , o maior e menor raio da lesão, respectivamente (WILSON *et al.*, 1979; AMARAL *et al.*, 2001). Foram avaliadas as características das lesões em sua evolução bem como qualquer sinal de aumentos de linfonodos, perda de peso, alopecias, bem como qualquer alteração clínica digna de nota. Estes gatos foram acompanhados e assistidos diariamente por uma equipe composta por pelo menos dois médicos veterinários. Em qualquer sinal de desconforto ou dor seriam imediatamente eutanasiados por *overdose* anestésica.

5.1.5 Isolamento de *Leishmania* spp dos tecidos

5.1.5.1 Citologia aspirativa das lesões das orelhas

A punção aspirativa das lesões das orelhas, utilizando agulha de 22G, foi realizada em nove gatos na 6^a semana pós-infecção (s.p.i.). Para este procedimento, os

animais foram anestesiados com o mesmo protocolo adotado no item 5.1.1.3. Após a anestesia estabelecida, o conteúdo aspirado foi incluído em tubos de ensaio contendo meio bifásico (ágar sangue + Schneider) e mantidos na estufa a 25°C. No final de cada semana, cerca de 50 µL do meio foram despejados em lâminas de vidro, recobertas por lamínula, para certificação, em microscopia óptica (aumento 400 ×), quanto da presença de formas promastigotas. Estas avaliações foram feitas até a 4ª semana, quando os meios foram desprezados.

5.1.6 Avaliação da produção de anticorpos.

Para este procedimento os gatos foram anestesiados com o mesmo protocolo adotado no item 5.1.1.3. De cada um dos animais, em média 1 mL de sangue foi coletado, e, a seguir centrifugado para a obtenção do soro. Os soros foram acondicionados em freezer a -20°C para posterior análise por ELISA (EVANS *et al.*, 1990 - modificado) para verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. As coletas e a sorologia foram realizadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 26, 32, 40 e 72 semanas pós-infecção. Caso algum animal apresentasse título de anticorpos anti-*Leishmania* sp, seria excluído das avaliações. A metodologia da técnica de ELISA seguiu as seguintes etapas:

1. Para sensibilização das placas de microtitulação de 96 poços (Immulon II[®], Dynatech Laboratories, Inc.), uma solução contendo 0,06M de tampão carbonato-bicarbonato de sódio (pH 9,6) e *L. braziliensis* inteiras (concentração de 10⁶ promastigotas por poço) foi pipetada e alíquotas de 50 µL foram distribuídas em cada poço.
2. As placas foram vedadas com *parafilm* e mantidas durante a noite (*overnight*) em geladeira (4°C).
3. A seguir as placas foram lavadas 3 vezes utilizando PBS a 0,01M, acrescido de 0,1% de Tween 20 (PBS-T), sendo secas, a cada lavagem, por vigorosos movimentos contra papéis filtros.

4. Para bloquear a placa, uma solução de soro fetal bovino – SFB a 1,5% (Laborclin[®], Brasil), acrescido em 0,01M de PBS, foi adicionada até recobrir todos os poços (exceto o poço “branco”), permanecendo por duas horas a temperatura ambiente.
5. As placas foram lavadas novamente conforme descrito no item “3”.
6. As amostras individuais de soro foram diluídas em PBS-SFB a concentração de 1:100 e incubadas a 37° C por 1 hora.
7. As placas foram lavadas novamente conforme descrito no item “3”.
8. Após secas, foram incubadas por 45 minutos a 37 °C, com 50 µL de Proteína A conjugada à peroxidase (Sigma[®] Chemical Co., St. Louis, Mo) na diluição de 1:8.000.
9. As placas foram lavadas novamente conforme descrito no item “3”.
10. Após secas, foram acrescidos, em cada poço, 200 µL do substrato 2-azinodio-3-etilbenzotiazolína a 0,055% (ABTS, Sigma[®] Chemical Co., St. Louis, Mo), em 0,1M tampão fosfato-citrato (pH 5,0) contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio (Sigma[®] Chemical Co., St. Louis, Mo) e incubadas por 15 minutos no escuro e a temperatura ambiente.
11. A reação foi bloqueada utilizando-se 2N de ácido sulfúrico (50 µL/poço) e a densidade óptica (DO) foi aferida a 405 nm utilizando um leitor de ELISA (Titerteck Multiskan, Helsinki, Finlândia), sendo considerados positivos os soros cujos títulos apresentaram DO acima de 0,100.

Como controles negativo e positivo das placas foram utilizados soros de hamsters (*Mesocricetus auratus*) sadios e experimentalmente infectados (com a mesma cepa de *Leishmania* sp), respectivamente.

5.1.7 Avaliação da ocorrência de disseminação visceral.

5.1.7.1 Citologia aspirativa e *imprints* de tecidos

Quatro gatos foram anestesiados, como previamente descrito, e submetidos à punção aspirativa de medula óssea utilizando agulha 22G nos tempos 4, 12, 16 e 24 s.p.i., e logo após este procedimento, foram humanitariamente sacrificados com 2 mL de cloreto de potássio a 10% (E.V.). Destes animais, *imprints* em lâminas de baço e fígado foram corados com a coloração de May-Grünwald-Giemsa e avaliados por microscopia óptica (1000 ×) para verificar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

5.1.7.2 Alterações anatomopatológicas

Todos os gatos, ou seja, os citados no item anterior, bem como os oito que permaneceram vivos por 15 meses, foram submetidos à avaliação anatomopatológica. Fragmentos de pele de orelha e de nariz infectados, linfonodos, baço, fígado, intestino (delgado e grosso), pulmão, rim, coração, adrenal, pâncreas e bexiga foram incluídos em formol tamponado 10%, sendo posteriormente submetidos ao processamento de histologia clássica para avaliação de alterações microscópicas, bem como para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. Todos os cortes foram corados pelo método da Hematoxilina & Eosina, e alguns, corados pelos métodos de Giemsa. Os achados histopatológicos receberam avaliação qualitativa, sendo atribuídos os escores +, ++, +++ para valores considerados como discretos, moderados e acentuados, respectivamente (MAGALHÃES *et al.*, 1986).

5.2 Experimento 2 - Comportamento da infecção experimental de gatos com *L. (V.) braziliensis* humana em períodos pré-estabelecidos.

5.2.1 Animais

Neste experimento foram utilizados 36 gatos, de ambos os sexos obtidos do nascimento de gatas pertencentes a um experimento de reprodução animal (Mattos, 2004). Os animais deste experimento foram submetidos ao mesmo manejo clínico-sanitário-nutricional que os gatos do experimento 1, com exceção do exame de *FeLV*.

5.2.2 Critério de inclusão dos animais experimentais.

Dois métodos foram assinalados como critério de inclusão de animais no experimento: linfoblastogênese e a sorologia por ELISA. A técnica de ELISA proposta para ser realizada neste experimento é semelhante a adotada no Experimento 1 (item 5.1.6), entretanto com modificações.

5.2.2.1 Avaliação da linfoblastogênese.

Foram coletados 2 mL de sangue total, em tubo heparinizado, de cada animal, previamente anestesiado conforme item 5.1.3. Cada amostra foi diluída a 1:10 com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Mo) suplementado com L-glutamina 2mM (Sigma-Aldrich[®]), HEPES 10mM (Sigma-Aldrich[®]), Penicilina/Estreptomicina (100 U/ml e 200 µg/mL, respectivamente - Sigma-Aldrich[®]) e SFB (10% - Seromed[®]). As amostras foram distribuídas em placas de 96 poços (Costar[®]), fundo redondo, 200 µL por poço, em quadruplicatas, assim distribuídas: (1) sem estímulo, (2) com promastigotas mortas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/87BA-125), na concentração 10⁶/mL final; (3) concanavalina A, na concentração de 5µg/ml final. A placa foi incubada a 37°C, 5% de CO₂, por quatro dias, sendo então acrescida timidina triciada (Amersham Pharmacia Biotech, UK) 0,1 µCi/poço e incubadas novamente a 37 °C, 5% de CO₂, por um pernoite. Após este período, as placas foram seladas e congeladas a -20 °C, até o momento da leitura. A incorporação radioativa no DNA foi determinada por espectrometria de cintilação líquida, avaliação esta realizada no Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA. Para este teste foi

preconizada a utilização dos resultados expressos por índice de estimulação (IE), ou seja, IE é igual à média da contagem por minuto (CPM) das células estimuladas, dividida pela média da CPM das células não-estimuladas. Sangue de animais com sorologia negativa para *Leishmania* sp foram utilizados como controle negativo.

5.2.2.2 Sorologia

A técnica sorológica proposta para este experimento é semelhante à citada anteriormente (5.1.6). Entretanto, pequenas modificações foram realizadas em relação aos soros controle (negativo e positivo). Como controles negativos foram utilizados 20 soros de gatos domiciliados pertencentes a regiões não endêmicas para Leishmaniose como os municípios de Lages em Santa Catarina e a capital de São Paulo. Como controles positivos foram adotados os soros em tempos aleatórios dos animais infectados no Experimento 1 e com reação positiva à presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Para determinação do limiar de positividade foi preconizada a fórmula *cut-off* igual à média dos controles negativos mais dois desvios padrão, sendo os dados expressos em porcentagem de positivos.

5.2.3 Infecção e grupos experimentais.

O inóculo e a cepa utilizados neste experimento foram os mesmos do Experimento 1, entretanto apenas com um local de inóculo (orelha esquerda). Os gatos experimentais foram distribuídos em dois grupos: G1 - infectados (n=18) e G2 - não infectados (n=18). Três hamsters foram infectados com a mesma cepa para avaliar a infectividade da mesma.

5.2.4 Tempos de avaliação.

Os meses de avaliação pré-determinados neste experimento foram escolhidos de acordo com os resultados obtidos no Experimento 1. Sendo assim, ficaram determinadas as avaliações como: mensuração de lesões, xenodiagnóstico, coleta de sangue para a sorologia por ELISA dos animais nos tempos 0, 1,5, 3 e 5 meses de infecção. Com exceção do tempo zero, logo após os procedimentos

preconizados, um grupo de 6 animais (3 controles e 3 infectados) foi humanitariamente sacrificado em cada tempo.

5.2.5 Excisão do linfonodo submandibular esquerdo: quantificação de carga parasitária e avaliação histológica

Logo após o sacrifício, os animais foram submetidos a uma ampla tricotomia e assepsia nas regiões de cabeça e pescoço utilizando para tanto, em seqüência, sabão neutro, álcool iodado (10%) e álcool (90%). Uma pequena incisão ventral ao arco da mandíbula foi realizada objetivando a excisão do linfonodo submandibular de drenagem da orelha esquerda inoculada. O linfonodo excisado, próximo ao bico de *Bunsen*, foi colocado em uma placa de Petri estéril previamente pesada e anotado em uma ficha peso da placa (PP). A placa de Petri contendo o linfonodo foi novamente pesada para obtenção do peso da placa com linfonodo inteiro (PPL). Com a mensuração destes pesos, foi possível calcular o peso do linfonodo ($PL=PPL-PP$). A placa foi então levada à câmara de fluxo laminar, onde o linfonodo foi seccionado em sua metade para destiná-lo à quantificação da carga parasitária e, a outra metade foi repartida novamente, sendo parte destinada para congelamento em tubos tipo *ependorfs* para posterior análise por PCR e, a outra parte, depositada em tubos de 15 mL contendo formol tamponado a 10% para análise histológica.

5.2.5.1 Quantificação da carga parasitária no linfonodo esquerdo

A mensuração da carga parasitária do linfonodo foi realizada pela técnica da diluição limitante segundo trabalhos prévios (TITUS *et al.*, 1985; TASWELL, 1986). Os fragmentos de linfonodos, anteriormente descritos, foram homogeneizados em 2 mL de meio Schneider. Após a remoção dos *debris* por sedimentação, por 5 minutos, a solução foi diluída seriadamente em meio Schneider suplementado com antibióticos (penicilina e estreptomicina), 10% de soro fetal bovino e 2% de urina humana estéril em placas de 96 poços contendo ágar sangue. Doze réplicas de cada diluição (100 μ L/poço) foram incubadas a 26° C por 3 semanas. Os poços foram examinados para a presença de motilidade parasitária, com 5 dias de intervalos, usando microscópio de lentes invertidas. Para a estimativa da quantidade de parasitos no fragmento foi

preconizada a utilização do software ELIDA[®] (TASWELL, 1986) através do χ^2 mínimo aplicado à distribuição de Poisson (TITUS *et al.*, 1985), sendo a carga parasitária estimada expressa em \log_{10} no linfonodo inteiro de cada gato.

5.2.5.2 Avaliação histológica do linfonodo esquerdo

Os linfonodos acondicionados em tubos de 15 mL foram submetidos à técnica e avaliação histológica de forma semelhante ao item 5.1.7.2.

5.2.6 Avaliação anatomopatológica

Posterior à coleta de material para quantificação da carga parasitária e histologia, os gatos foram submetidos à necropsia, sendo anotadas alterações macroscópicas. Fragmentos de baço, fígado, linfonodo direito e orelhas foram acondicionados em tubos de vidro contendo formol (10%) para análise histológica. Para o processamento e avaliação histológica dos tecidos coletados foi preconizada a mesma metodologia adotada no item 5.1.7.2.

5.3 Experimento 3- Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com cepa de *L. (V.) braziliensis* isolada de caso natural de Leishmaniose Felina.

5.3.1 Animais

Neste experimento foram utilizados 12 gatos (6 infectados e 6 controle), de ambos sexos. A origem destes animais é a mesma do Experimento 2.

5.3.2 Parasitos e procedimento

Neste experimento foi utilizada cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MFEL/BR/2003/809) isolada de caso natural de Leishmaniose Felina da cidade do Rio de Janeiro (SCHUBACH *et al.*, 2004). A cepa foi fornecida por pesquisadores da FIOCRUZ-Biomanguinhos. A maioria dos procedimentos adotados neste experimento (manutenção dos animais, quantidade do inóculo, via de inoculação, avaliação clínica, quantificação de carga parasitária, histologia de linfonodo e alterações anatomopatológicas) foi semelhante aos do Experimento 2. A manutenção da cepa

felina foi realizada de forma similar ao item 5.1.1, entretanto os parasitos foram inoculados quando se encontravam na 10^a passagem.

5.4 Experimento 4 - Capacidade e competência dos flebotomíneos como vetores de *L.(V.) braziliensis* em relação aos gatos.

5.4.1 Colônia de flebotomíneos

A primeira geração (F1) de *Lutzomyia migonei* foi usada para a mensuração da taxa de ingurgitamento (comportamento alimentar) e xenodiagnóstico. A colônia foi obtida de flebotomíneos selvagens capturados no município de Pacoti, estado do Ceará e foi mantida a 25-26°C (BOD) no laboratório de Entomologia da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA/CE).

5.4.2 Comportamento alimentar dos flebotomíneos em contato com gatos não infectados por *Leishmania sp*

Para este procedimento, foram utilizados 10 gatos adultos e inteiros sendo cinco fêmeas e cinco machos. Os animais foram sedados com acepromazina 1% (Acepran[®] - Univet S.A., São Paulo, Brasil), 1mg/kg, e anestesiados com quetamina 10% (Dopalen[®] - Vetbrands Saúde Animal[®] – Paulínia, Brasil), 15 mg/kg. O animal foi colocado inteiro dentro de caixas individuais (45 × 40 × 20 cm) cobertas por um pano escuro. Para cada procedimento, cerca de 100 flebotomíneos de *L. migonei*, sendo 75 fêmeas não alimentadas (2-3 dias após a emergência) e aproximadamente 25 machos, foram colocados dentro das caixas permanecendo por 2 horas. A cada 30 minutos, a caixa era levemente descoberta para observar o comportamento dos vetores. Ao final do tempo, um aspirador manual recolheu todos os flebotomíneos e estes foram transferidos a outra caixa com solução de açúcar e mantida a 70% de umidade relativa a 25-26° C (BOD) por dois dias quando foram mensurados, visualmente, os ingurgitados.

5.4.3 Xenodiagnóstico

Procedimento semelhante adotado para a avaliação da taxa de ingurgitamento foi realizado para o xenodiagnóstico. Para tanto, foram utilizados cinco gatos experimentalmente infectados com *L. braziliensis*, oriundos do Experimento 2, sendo três fêmeas (média de peso igual a 2,1 kg) e dois machos (média de peso de 3,7 kg). O xenodiagnóstico foi realizado em diferentes tempos de infecção dos gatos e utilizando-se de 50 a 150 flebotomíneos, sendo 75% de fêmeas por um período de 2 horas. Apenas a cabeça de cada gato foi colocada dentro da caixa (45 × 40 × 20 cm) coberta por um pano negro. Após este procedimento, os dípteros foram mantidos em BOD nas mesmas condições acima citadas por seis dias. Após este período, os flebotomíneos vivos foram retirados em grupos contendo aproximadamente 10 espécimes e colocados em uma placa de Petri contendo sabão líquido (detergente) e água. Cada flebotomíneo foi retirado da solução água + sabão líquido e levado a uma outra placa de Petri para ser dissecado em presença de uma gota de solução salina (0,9%). A dissecação foi feita utilizando-se equipamentos confeccionados manualmente adaptando-se uma agulha extra-fina a uma haste de madeira, sob estereomicroscópio, sendo eviscerado o trato digestório. Este foi gentilmente estendido sob uma lâmina e recoberto por lamínula e examinado em microscopia óptica para verificar a presença de formas promastigotas (aumentos de 40 e 100 ×).

5.5 Experimento 5 - Atratividade e preferência alimentar de flebotomíneos em relação a alguns potenciais hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis* em condições de campo.

5.5.1 Local do estudo

Esta avaliação foi realizada em uma área endêmica para leishmaniose cutânea devido à infecção por *L. (V.) braziliensis*, no município de Pacoti (Ceará). Esta área está incluída no Complexo da Serra de Baturité e é composta por floresta tropical primária e secundária. O foco escolhido fazia parte da área rural, próximo a uma casa onde várias pessoas apresentaram a forma cutânea da doença. Nesta área havia muitas árvores frutíferas como mangueiras, bananeiras, limoeiros, coqueiros e café, bem

como a presença de vários animais domésticos como suínos, galinhas, cães, gatos, evidências de roedores e asininos. Além disso, a área albergava uma grande população de *Lutzomyia* sp.

5.5.2 Animais e procedimento

O local escolhido para colocar as armadilhas *Disney* localizava-se a 40 m da casa citada, próximo a um rio e a um estábulo vazio. Foram estabelecidas quatro posições dentro desta seção, aproximadamente 7 metros de distância uma da outra. As armadilhas, sem luz, foram suspensas a 1 metro do chão e cada uma continha um potencial hospedeiro reservatório e, uma delas permaneceu vazia (controle). Neste experimento foram utilizados os seguintes animais como iscas: um cão (*Canis familiaris*), um gato (*F. catus*) e um roedor, o rato-de-junco (*Holochilus brasiliensis*). As armadilhas foram submetidas a uma sessão de quatro noites consecutivas e foi realizada a rotação dos animais em cada armadilha por noite para evitar a influência do local. Os animais foram deixados nas armadilhas 1 hora antes do anoitecer e retirados 2 horas após o amanhecer.

5.5.3 Identificação dos dípteros

Somente os dípteros presos ao óleo de rícino que, a olho nu, fossem semelhantes aos flebotomíneos foram retirados com auxílio de uma pinça e colocados em uma placa de Petri nomeada com respectiva espécie animal. Com o uso de um estereomicroscópio, foram selecionados somente os flebotomíneos e a identificação dos gêneros foi realizada pela morfologia da espermateca e cibarium nas fêmeas e pela genitália externa dos machos. A classificação sistemática destes dípteros foi feita segundo MARTINS *et al.* (1978).

5.6. Experimento 6 - Infecção natural de gatos por *Leishmania* spp

5.6.1 Inquérito sorológico

5.6.1.1 Amostras

Um total de 586 soros de gatos domiciliados, semi-domiciliados e ferais, foi obtido junto à Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Este órgão utiliza os soros de gatos como sentinelas da presença de anticorpos anti-*Yersinia pestis* em diferentes localidades do Estado. Foram obtidas amostras dos municípios de Acarape, Baturité, Capistrano, Guaiuba, Guaramiranga, Ipu, Maranguape, Mucambo, Pacoti, Palmácia, Pires Ferreira, Potengi, Redenção, Santana do Cariri, Tianguá e Ubajara (Figura 14).

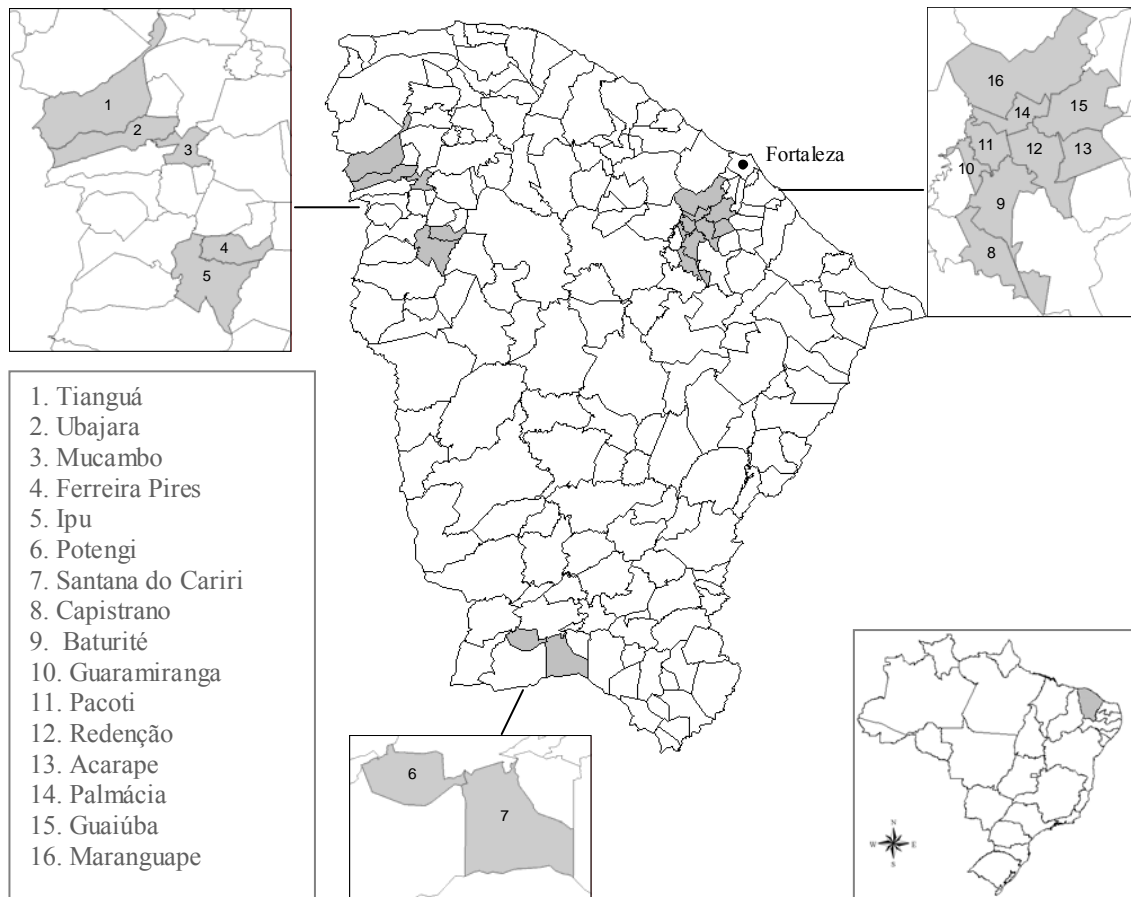


Figura 14. Municípios do Estado do Ceará incluídos no inquérito soropidemiológico para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp em gatos

5.6.1.2 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

A técnica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp preconizada para este inquérito foi a de ELISA, da mesma forma como descrita no item 5.2.2.2.

5.6.2 Investigação de casos clínicos suspeitos de Leishmaniose Felina

Esta etapa do trabalho configura os casos suspeitos de Leishmaniose em gatos da região de Baturité. O primeiro caso foi encaminhado pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Para o segundo, foi a nós requisitada a captura do animal por um médico do município de Baturité.

5.6.2.1. Caso 1 - Caso clínico e procedimentos.

Um gato macho, sem raça definida, de aproximadamente oito anos, nativo do município de Baturité (CE), nordeste do Brasil, foi encaminhado ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Fortaleza (CE) com suspeita clínica de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). O município de Baturité, localizado em região serrana do Estado, é considerado endêmico para LTA e em sua área rural há uma vasta vegetação nativa bem como a presença de árvores frutíferas, dentre elas, bananeiras, jaqueiras e mangueiras. O animal apresentava uma lesão nodular ulcerada na região dorsal do plano nasal medindo 10 x 6 cm caracterizada por uma massa circular, friável e de coloração róseo-avermelhada, protuindo da narina esquerda levando à obstrução completa, bem como da narina direita, com obstrução parcial (Figura 15). Também foram verificados linfadenopatia regional submandibular, caquexia, desidratação, pelagem opaca, alopecias multifocais, salivação intensa, desconforto nasal, estridor respiratório, engasgos e tosse. Não foram obtidas informações sobre o tempo de evolução das manifestações clínicas. Diante de minuciosa avaliação clínica, foi levantada a suspeita de se tratar de um caso de criptococose, requerendo confirmação laboratorial.

Após procedimento anestésico (xilasina-Anasedan[®] e quetamina-Dopalen[®]) o animal foi submetido à punção venosa e biópsia da lesão. O soro foi submetido à técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* segundo trabalhos

prévios (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2001). Parte dos fragmentos foi incluída em solução salina (0,9%) e encaminhados para isolamento em cultivo (Agar sangue + Schneider) de *Leishmania* sp. A outra parte foi destinada à análise micológica. Na micologia, em exame direto para a pesquisa de estruturas fúngicas, foi realizada homogeneização de material da lesão com uma gota de nigrosina (tinta da China). O isolamento, cultivo e quimiotipagem foram realizados como indicada pela literatura (MIN & KWON-CHUNG, 1986).

5.6.2.2. Caso 2 - Caso clínico e procedimentos

Um gato macho de três anos, nativo do município de Baturité, Ceará, Nordeste do Brasil foi investigado por suspeita de LTA felina. Há 4 meses o animal apresentava duas úlceras na cauda, próxima ao ânus, medindo aproximadamente 1.5 x 2.0 cm e histórico de perda gradual de peso. Além disso, a proprietária havia apresentado Leishmaniose Cutânea há 8 meses. A casa em que o gato vivia era circundada por uma vegetação composta por bananeiras, jaqueiras, mangueiras e outras árvores nativas. Outros animais como galinhas, pombos, cabras, case e outros gatos estavam também presentes no local. Próximo à residência havia muitas casas inabitadas, edificações antigas e cavernas que serviam como locais de repouso para vários morcegos. O animal foi mantido na Universidade Federal do Ceará, sob cuidados médico veterinário para pesquisa sorológica anti-*Leishmania*. O gato apresentou dois episódios de infecção do trato respiratório por longo período e foi submetido a terapia de suporte com antibióticos. Dois meses depois, foi anestesiado (xilasina e quetamina) para realização de excisão de biopsia. Nesta ocasião, o procedimento de tricotomia exibiu as duas úlceras com um padrão de bordos elevados separados apenas por um fino tecido de pele e com exuberante tecido de granulação (Figura 16). Além disso, a tricotomia proporcionou uma melhor avaliação clínica da pele, permitindo a visualização de uma grande quantidade de cicatrizes distribuídas de forma difusa pelo corpo. Diante disso, foi questionada a possibilidade de infecção fúngica, por inoculação, devido arranhaduras em brigas por reprodução e disputas territoriais com outros machos. Sendo assim, o diagnóstico clínico incluiu a possibilidade de se tratar de um caso de esporotricose.



Figura 15. Grande massa granulomatosa na região dorsal do plano nasal com tecido de mesma característica protuindo da narina.



Figura 16. Lesões ulceradas na cauda do gato exibindo um padrão de bordos elevados e exuberante tecido de granulação.

O gato então foi novamente anestesiado para coleta de sangue por via jugular e o soro submetido à pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por ELISA (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2001). Além disso, fragmentos dos bordos da lesão foram assepticamente coletados em solução salina estéril (0,9%) para isolamento de *Leishmania* e fungo em meios específicos, bem como para inoculação em hamsters (*M. auratus*) e histopatologia. Para inoculação nos hamsters, um pequeno fragmento da lesão foi cuidadosamente macerado em solução salina estéril (0,9%). Aproximadamente 0,1 mL desta solução foi injetada, via intradérmica, na pata direita de dois hamsters. Solução salina também foi injetada na pata esquerda como controle.

Fragmentos da lesão foram enviados assepticamente em solução salina (0,9%) para análise micológica. Fragmentos menores foram depositados em tubos com agar Sabouraud dextrose, com ou sem clarnfenicol bem como em agar Mycosel (SANOFI[®], France). As culturas foram incubadas a 28° C e examinadas diariamente por um mês.

5.7 Análise dos dados

No Experimento 1 os dados com relação ao tempo de evolução em semanas pós-infecção foram reportados como mediana, e a área da lesão como erro padrão da média (EPM). Foi realizada a regressão linear para comparar os parâmetros tamanho de lesão e densidade óptica (DO), sendo considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. As alterações histológicas nos tecidos dos animais deste experimento foram descritivas, assim como os dados dos Experimentos 2, 3, parte do 4 (referente ao xenodiagnóstico) e 5. A outra parte do Experimento 4, o número de flebotomos ingurgitados foi transformado em percentagem e expresso como média e erro padrão da média. Para o experimento 6 foi preconizada uma prevalência estimada de 30% (25,6-34,6%), com um intervalo de confiança de 95% (erro relativo de 15%).

6 RESULTADOS

6.1 Experimento 1 - Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com *Leishmania braziliensis*.

Os itens 6.1.1 a 6.1.5 deste trabalho fazem parte do artigo intitulado “The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*” publicado no periódico *Veterinary Parasitology*, v.127, p. 199-208, 2005 (ANEXO IV).

6.1.1 Estabelecimento da infecção e evolução clínica

A evolução das lesões nas orelhas e narizes encontra-se listada na tabela 4.

Tabela 4. Evolução das lesões nos gatos (*Felis catus*) experimentalmente infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Lesão	Frequência (%)		Mediana (Min-Max) em semanas pós-infecção			
			Início da lesão		Duração da lesão	
	Orelha ^a	Nariz ^b	Orelha	Nariz	Orelha	Nariz
Pápula	77	75	2 (1,5-3)	2 (1,5-3)	2 (0,5-3)	1 (0,5-2)
Nódulo	100	100	3,5 (2,5-5)	3 (2,5-10)	28 (11-34)	41 (34-47)
Lesões satellites	83,3 ¹	45,5 ²	4 (4-11)	6,5 (5-11)	2 (1-7,5)	2,5 (1-11)
Lesão grande ^c	91 ²	9,1 ²	6 (2-8)	10 (1-13)	-	-
Disseminação ^d	42,6 ¹	8,3 ²	8,5 (7,5-22)	7,5 (7,5-7,5)	3 (2-6,5)	2 (2-2)
Infiltração mucosa	-	88,9 ³	-	16 (6-22)	-	-
Ulceração	25 ¹	33,3 ²	10 (9-11)	7 (6-7,5)	9 (4-16,5)	4,5 (4-21)
Cura	87,5 ⁴	100 ⁵	32 (30-33)	40 (33-44)	38 (34-72)	29 (43-72)

^a n=13; ^b n=12; ^c Coalescência de pequenas lesões satélites; ^d Disseminação dérmica para outros sítios; ¹ Taxa calculada para 12 animais vivos; ² Taxa calculada para 11 animais vivos; ³ Taxa calculada para 9 animais vivos; ⁴ Taxa calculada para 8 animais vivos; ⁵ Taxa calculada para 7 animais vivos.

De forma geral, na orelha, a lesão primária foi uma pápula única (Figura 17), seguida pela emergência de pápulas satélites ao redor da lesão primária. Estas pequenas pápulas coalesceram e formaram um grande e irregular nódulo (Figura 18). Após, houve disseminação da lesão com emergência de novas lesões na superfície externa e marginal da orelha ipsilateral, e mais tarde na orelha contra-lateral (Figura 19). Na 10^a s.p.i, três gatos (25%) exibiram ulceração de alguns nódulos e as úlceras fecharam e abriram várias vezes. A evolução das lesões no nariz foi similar à da orelha (Figura 20). Além disso, a maioria dos animais teve infiltração da lesão na mucosa com obstrução parcial por volta da 16^a s.p.i. Em ambos locais, o tamanho da lesão tiveram um pico por volta da 10^a s.p.i, com posterior redução. A resolução total das lesões na orelha e nariz ocorreu na 10^a e 40^a s.p.i., respectivamente (Figura 21). Apenas um gato teve recidiva na orelha 4 meses após a auto-cura. Na 72^a s.p.i., apenas um gato mostrou uma cicatriz alopecica na orelha (Figura 22).

O aumento dos linfonodos regionais foi observado na 11 s.p.i. na maioria dos animais (92,3%), variando de 1,5 a 2 cm de diâmetro. Até as 72 s.p.i. o aumento dos linfonodos foi detectável em dois de oito gatos. Entretanto, neste período a doença apresentava-se sob controle em todos os gatos, apresentando-se clinicamente saudáveis. Quatro animais foram eutanasiados na 4^a, 12^a, 16^a e 24^a s.p.i. para avaliação histopatológica e um gato morreu na 24^a s.p.i., mas não pode ser submetido à avaliação *post-mortem* devido ao avançado grau de autólise. Oito gatos permaneceram vivos por um período de 15 meses após a infecção, sob observação clínica, para avaliar a probabilidade de ocorrência de recidiva de lesões cutâneas.

6.1.2 Detecção de parasito

O isolamento de parasitos foi obtido em meio NNN oriundos de aspirados da lesão primária de orelha de oito de nove gatos (89%) na 6^a s.p.i. As culturas e *imprints* de fígado, baço e medula óssea foram negativas em quatro gatos eutanasiados.

6.1.3 Comportamento da resposta sorológica anti-*Leishmania* e detecção de FeLV

Título de anticorpos IgG específicos de *Leishmania* foram detectados primeiramente em apenas 3 animais (23%) na 2ª s.p.i. ($0,09 \pm 0,02$). A concentração de anticorpos nos soros dos animais infectados foi baixa até a 12ª s.p.i. Neste período, foi observada a soroconversão média em 50% dos gatos ($0,10 \pm 0,01$). Na 20ª s.p.i., todos os gatos apresentavam sorologia positiva ($0,34 \pm 0,06$), e exibiram concentrações significativas de títulos de anticorpos específicos por volta da 26 s.p.i. ($0,45 \pm 0,07$). Após este período, houve significativa queda na produção dos anticorpos e na 72ª s.p.i., apenas 38% dos animais apresentavam anticorpos detectáveis ($0,08 \pm 0,02$). Em todos os gatos, os títulos positivos de anticorpos duraram 16 semanas (mediana). Com relação ao exame para detecção de FeLV, 9 dos 13 gatos (69,2%) foram positivos.

6.1.4 Correlação entre desenvolvimento da lesão e sorologia

A figura 21 mostra que a emergência das lesões precedeu a ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania*. Apesar da marcada redução no tamanho e número de lesões na 32ª s.p.i., os títulos de anticorpos continuaram altos. Na 72ª s.p.i., mesmo com cura clínica, três dos oito gatos (37,5%) ainda apresentavam títulos de anticorpos detectáveis. Não houve correlação entre a concentração de anticorpos anti-*Leishmania* no soro e lesão de orelha ao longo do experimento. Entretanto, houve correlação positiva entre lesão de nariz e sorologia na 12ª e 16ª s.p.i. ($r^2 = 36,6\%$, $p = 0,037$ e $r^2 = 44,12\%$, $p = 0,0258$, respectivamente).

6.1.5 Sinais inespecíficos

No período desde a manifestação de lesão até a auto-cura, 10 gatos tiveram espirros e/ou descarga nasal e foram tratados com enrofloxacina (2,5%, 5 mg/kg/IM). Além disso, os animais exibiram pelame opaco e úmido e pêlos frágeis. Entretanto, na 72ª s.p.i., apenas um gato mostrou alopecia bilateral, especialmente nas pernas, e outro, uma leve coriza. A perda de peso e a fraqueza foram observadas em cinco gatos durante as primeiras 32 s.p.i.



Figura 17. Pápula formada na orelha de um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de *Leishmania braziliensis*.



Figura 18. Um grande e irregular nódulo formado pela coalescência de várias pápulas satélites na orelha de um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

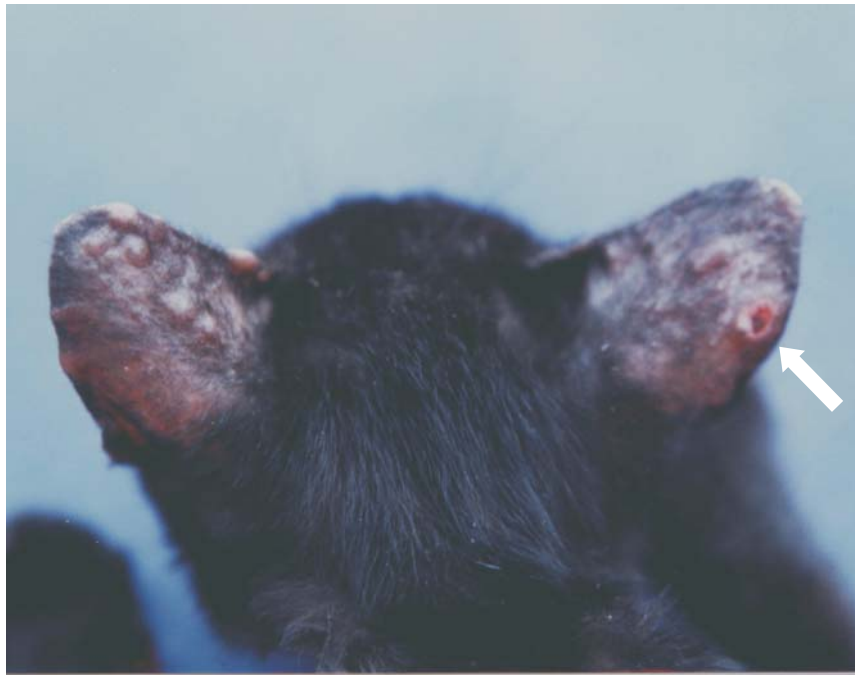


Figura 19. Ulceração (seta) de uma lesão primária e disseminação dérmica nas orelhas ipsilateral e contralateral em um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de *Leishmania braziliensis*.



Figura 20. Lesão ulcerada no nariz na 6^a s.p.i. em um gato experimentalmente infectado com 10^7 promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

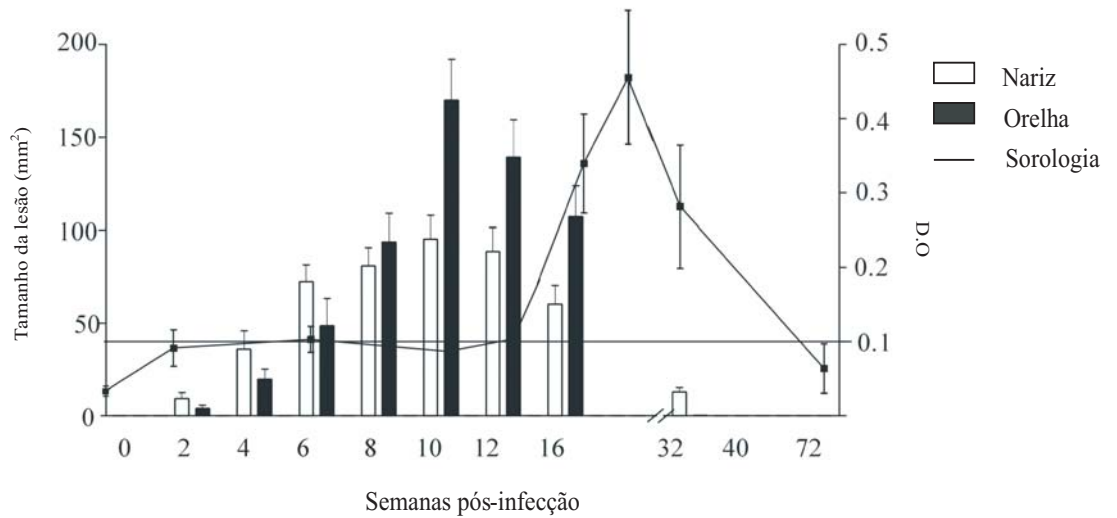


Figura 21. Evolução do tamanho da lesão em mm^2 (média \pm D.P.M.) e da resposta humoral em densidade óptica (D.O.[média \pm D.P.M.]) durante o período experimental em gatos infectados com 10^7 promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.



Figura 22. Cura de leão de leishmaniose felina experimental as 72 s.p.i. Mesmo gato da figura 19. Note uma pequena cicatriz no sítio de uma antiga úlcera (seta).

É importante ressaltar que este experimento estava composto por 14 animais, sendo que um deles foi excluído do trabalho por apresentar sorologia positiva antes de ser experimentalmente inoculado.

6.1.6 Avaliação anatomopatológica

A avaliação anatomopatológica realizada nos animais pertencentes a este estudo (Experimento 1) foi feita após o envio do artigo para publicação no periódico *Veterinary Parasitology*, motivo pelo qual tal a análise não consta nesta publicação.

No período de 15 meses, os gatos que permaneceram vivos e que tiveram cura espontânea das lesões, não exibiram qualquer sinal de reativação, havendo em apenas um deles uma pequena cicatriz na orelha no local de uma antiga úlcera. Em outro, um leve espessamento da derme infiltrando na mucosa nasal. Dos doze animais submetidos à necropsia, as alterações macroscópicas mais relevantes verificadas em três deles, foram o aumento e congestão esplênica.

Onze animais foram submetidos à avaliação histológica. De forma geral, em relação aos locais de inóculo realizados nos gatos, o padrão de reação inflamatória caracterizou-se por ser discreta em ambos locais em dois animais aos 1 e 3 meses de pós-infecção (m.p.i.). O animal avaliado aos 6 m.p.i. apresentou reação discreta no nariz, porém acentuada na orelha. No grupo sacrificado aos 15 m.p.i. (n=8), a frequência exibida no nariz foi de 12,5%, 62,5% e 25% para os padrões discreto, moderado e acentuado, respectivamente. Já nas orelhas, a frequência foi de 50% em ambos os padrões, discreto e moderado. De maneira geral, os infiltrados inflamatórios foram encontrados em situações muito equiparadas, ou seja, ora encontravam-se distribuídos na derme de forma focal ou difusa, ora em condições perivasculares focal ou multifocal.

Em relação aos tipos celulares encontrados nas reações inflamatórias de todos os animais, e em ambos locais de inóculo, destacam-se, com maior frequência, os plasmócitos (50%) e os linfócitos (37,5%), seguidos, em menor proporção, por macrófagos (6,3%), neutrófilos (3,1%) e células multinucleadas (3,1%).

Vale salientar que em um dos animais que apresentou intensa reação inflamatória na orelha (6 m.p.i), com predominância de macrófagos, plasmócitos e células multinucleadas distribuídos difusamente pela derme (Figura 23), mostrou também proliferação angiofibroblástica. Entretanto a coloração especial de Giemsa não evidenciou a presença de amastigotas nos tecidos ou em macrófagos neste animal. Além disso, apesar da intensa reação inflamatória no nariz, caracterizada macroscopicamente por ulceração severa, a histologia evidenciou apenas congestão local. Por outro lado, um animal em que as alterações macroscópicas no nariz caracterizavam-se por um espessamento da derme no momento do sacrifício (15 m.p.i), pela histologia foi possível verificar áreas da epiderme com hiperqueratose, bem como áreas focais e extensas do epitélio com ulcerações. Também neste caso, a coloração de Giemsa não evidenciou presença de amastigotas.

A título de ilustração, foram destacadas figuras de lesões nas orelhas de três animais sacrificados aos 15 m.p.i. A orelha de um deles exibia intenso infiltrado linfoplasmocitário perivascular na derme e uma área focal com quantidade moderada de linfócitos e plasmócitos ocupando toda a derme (Figura 24). A narina de outro gato, por sua vez, apresentando um foco inflamatório linfoplasmocitário intersticial na derme e perivascular (Figura 25). No mesmo tempo de infecção, um gato exibiu leve infiltrado linfoplasmocitário na derme da orelha (Figura 26).

Em relação aos outros tecidos coletados, o linfonodo e o baço merecem destaque. De todos os animais, nos diferentes tempos de infecção, os linfonodos de drenagem submandibulares apresentavam-se com intensa hiperplasia linfóide do centro germinativo dos folículos linfóides, e em alguns casos apresentando vários linfócitos apoptóticos. Ademais, alguns seios linfáticos apresentavam uma maior quantidade de macrófagos com o citoplasma bem evidente. O baço, por sua vez, também em todos os animais, exibia congestão acentuada e folículos ativados (Figura 27), e em sua maioria, apresentando uma maior quantidade de linfoblastos.

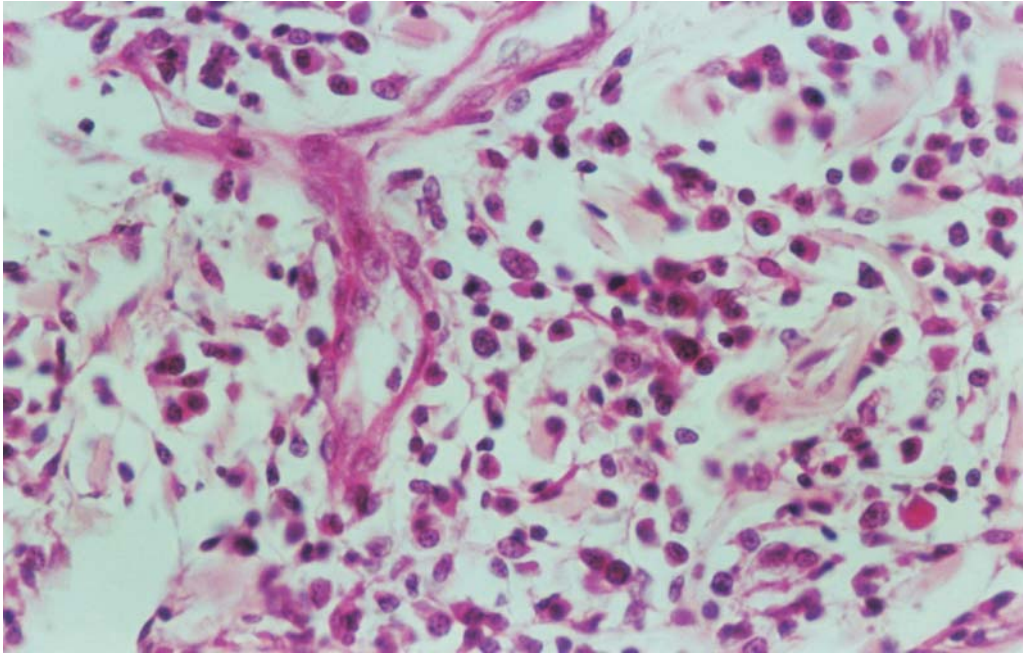


Figura 23. Corte histológico (5 μ m) de tecido de orelha de gato eutanasiado aos 6 m.p.i. Note uma reação inflamatória difusa na derme cujo infiltrado celular é composto predominantemente por plasmócitos, poucos linfócitos e macrófagos (H \times E - magnificação original \times 600).

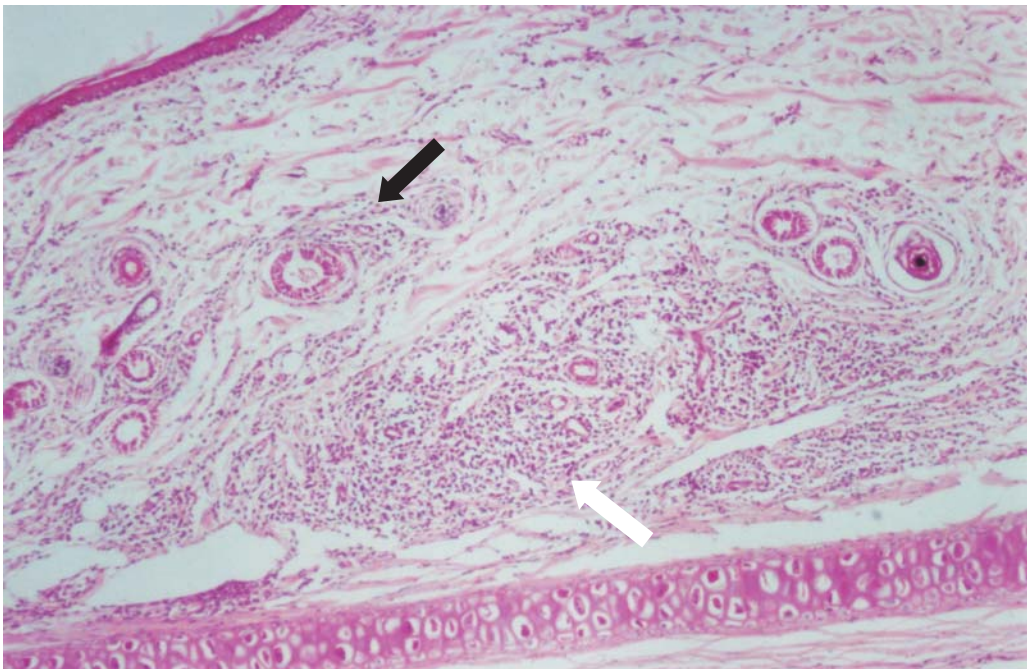


Figura 24. Corte histológico (5 μ m) de tecido de orelha de gato eutanasiado aos 15 m.p.i. Note que a derme exibe um intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular leve (seta preta) e uma área focal com quantidade moderada de linfócitos e plasmócitos (seta branca). (H \times E - magnificação original \times 100).

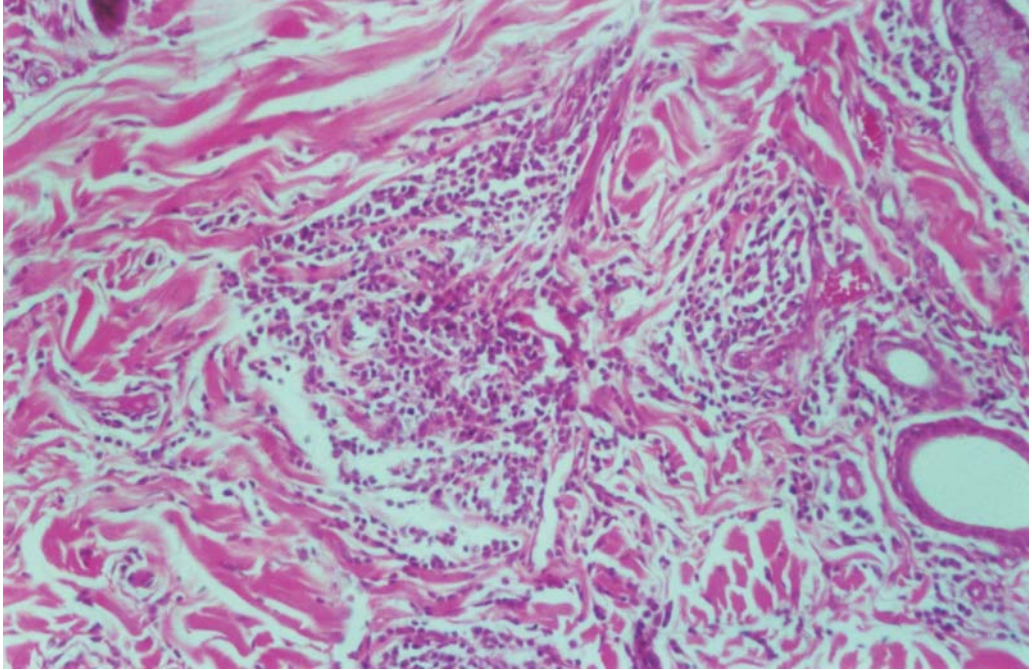


Figura 25. Corte histológico (5 μ m) de tecido de nariz de gato eutanasiado aos 15 m.p.i. Observe foco inflamatório linfoplasmocitário intersticial perivascular na derme (H×E - magnificação original \times 600).

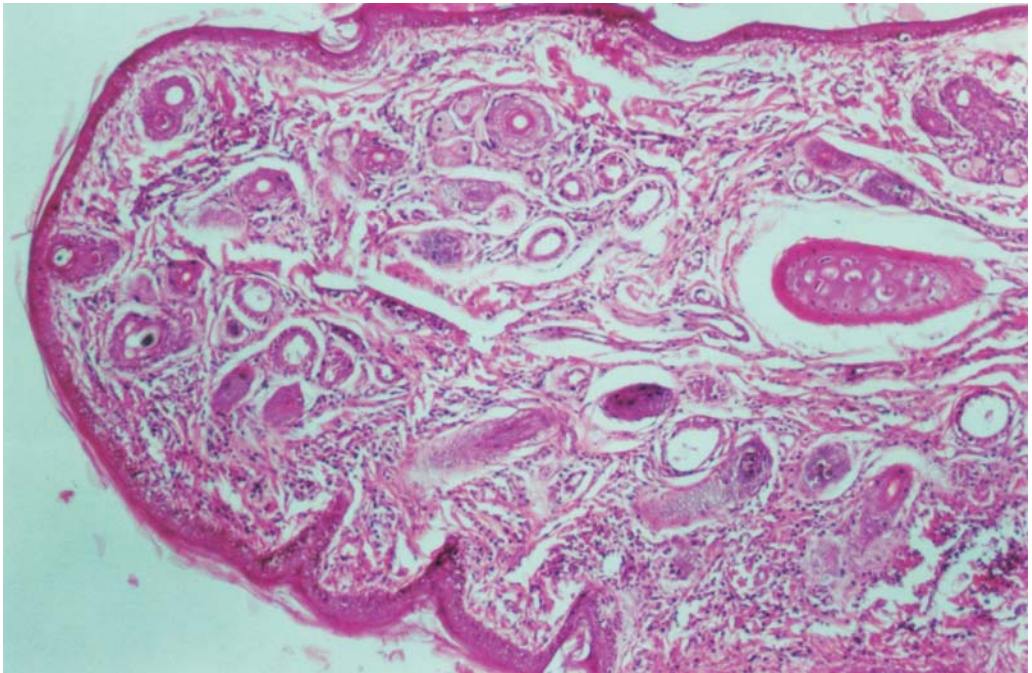


Figura 26. Corte histológico (5 μ m) de tecido de orelha de gato eutanasiado aos 15 m.p. I. exibindo leve infiltrado linfoplasmocitário na derme (H×E - magnificação original \times 600).

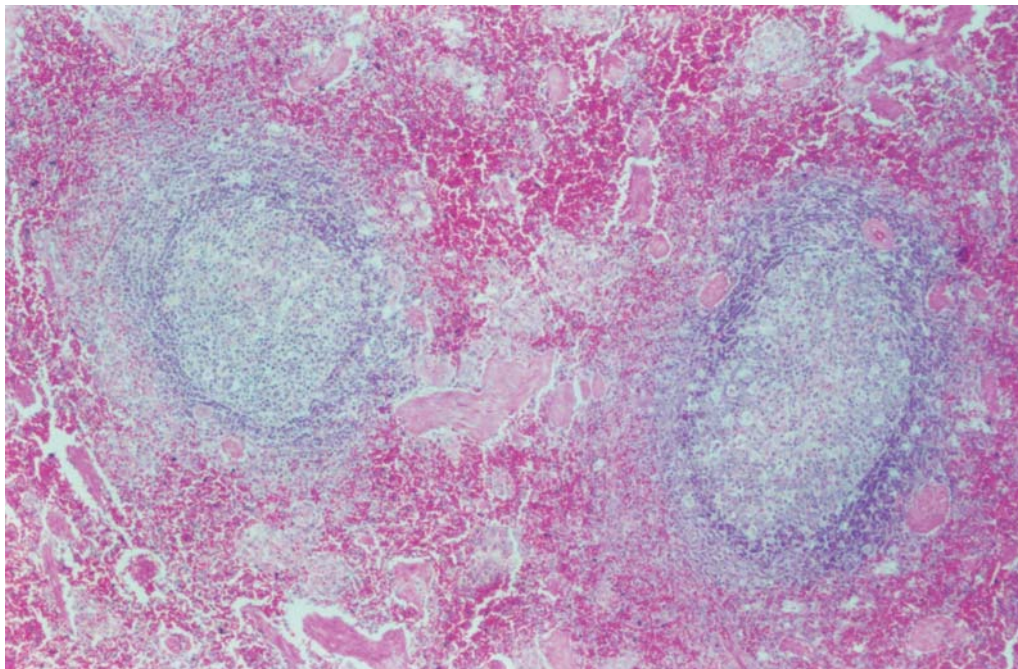


Figura 27. Corte histológico (5 μ m) de tecido esplênico de gato eutanasiado aos 15 m.p. i. exibindo intensa hiperplasia dos centros germinativos dos folículos linfóides (H \times E - magnificação original \times 200).

O fígado apresentou alterações histológicas em três animais sendo: (1) alguns espaços porta exibiam pequena quantidade de plasmócitos; (2) alguns poucos hepatócitos na área periportal com degeneração hidrópica; (3) leve infiltrado inflamatório multifocal composto por linfócitos. Os demais órgãos coletados e analisados não exibiram alterações dignas de nota.

6.2 Experimento 2 - Comportamento da infecção experimental de gatos com *L. (V.) braziliensis* humana em períodos pré-estabelecidos.

6.2.1 Considerações gerais sobre a linfoblastogênese, sorologia, histologia e quantificação da carga parasitária do linfonodo.

No momento de submeter as placas à espectrometria de cintilação líquida para avaliar a linfoblastogênese, após o descongelamento, foi observado que os poços contendo as soluções apresentavam-se escurecidos. Apesar de ter sido realizado todo o processamento normal da técnica, não foram obtidos resultados satisfatórios para serem expressos sob IE.

A quantificação da carga parasitária também resultou em insucesso, uma vez que a maioria das placas sofreu contaminação. Além disso, a BOD utilizada para este fim, por vezes, apresentou problemas na manutenção da temperatura ideal. Diante destes entraves, as placas foram descartadas mesmo antes do final de 1 mês, prazo este estipulado como limite para avaliação da presença de formas promastigotas.

As amostras tanto para sorologia quanto para histologia estão sendo processadas sendo que até o momento não foram obtidos resultados para serem incluídos nesta tese.

6.2.2 Avaliação clínica

No Experimento 2, o surgimento de lesão ocorreu em 16 dos 18 gatos infectados (88,9%) no período compreendido entre 2 e 8 s.p.i. As lesões iniciaram como pápulas eritematosas (Figura 28) em 14 gatos (77,8%), com tamanho médio de

$4,46 \pm 1,25 \text{ mm}^2$, sendo que em cinco deles, na 10^a s.p.i., estas evoluíram para nódulo ($75,63 \pm 11,76 \text{ mm}^2$). Observou-se disseminação local, com formação de pápulas satélites (Figura 29) em sete animais (38,9%), sendo que em quatro deles, as pápulas se fusionaram, aumentando o tamanho da lesão (Figura 30). Na 16^a s.p.i., as lesões atingiram seu tamanho máximo ($153,4 \pm 51,29 \text{ mm}^2$), e a partir de então decresceram ($103,2 \pm 40,4 \text{ mm}^2$). Durante o experimento, apenas um gato teve cura espontânea da lesão aos 3½ m.p.i. Houve aumento do linfonodo de drenagem em todos os animais. Não foi evidenciada a perda de peso e queda na qualidade do pelame dos animais.

6.3 Experimento 3 - Suscetibilidade de gatos domésticos à infecção experimental com cepa de *L. (V.) braziliensis* isolada de caso natural de Leishmaniose Felina.

6.3.1 Avaliação clínica

Os seis animais infectados não apresentaram alteração clínica após infecção experimental. Excetuando-se a avaliação clínica, as outras avaliações deste experimento foram realizadas simultaneamente ao Experimento 2. Sendo assim, os testes que estão sendo realizados encontram-se também em processamento.

6.4 Experimento 4 - Capacidade e competência dos flebotomíneos como vetores de *L.(V.) braziliensis* em relação aos gatos.

6.4.1 Comportamento alimentar dos flebotomíneos em contato com gatos não infectados por *Leishmania* sp

Neste experimento obteve-se uma taxa média de ingurgitamento dos flebotomíneos em contato com os gatos de $95,74 \pm 2,37\%$, não havendo diferença estatística entre gatos machos e fêmeas ($95,04 \pm 1,37\%$ e $93,44 \pm 4,57\%$, respectivamente). Quanto ao comportamento dos vetores, verificou-se predileção dos flebotomos pelos membros, pela cabeça (Figura 31), especialmente orelhas, nariz e lábios, bem como pela região escrotal dos gatos. Foi possível observar ainda, a cópula de alguns flebotomíneos quando em contato com os gatos.

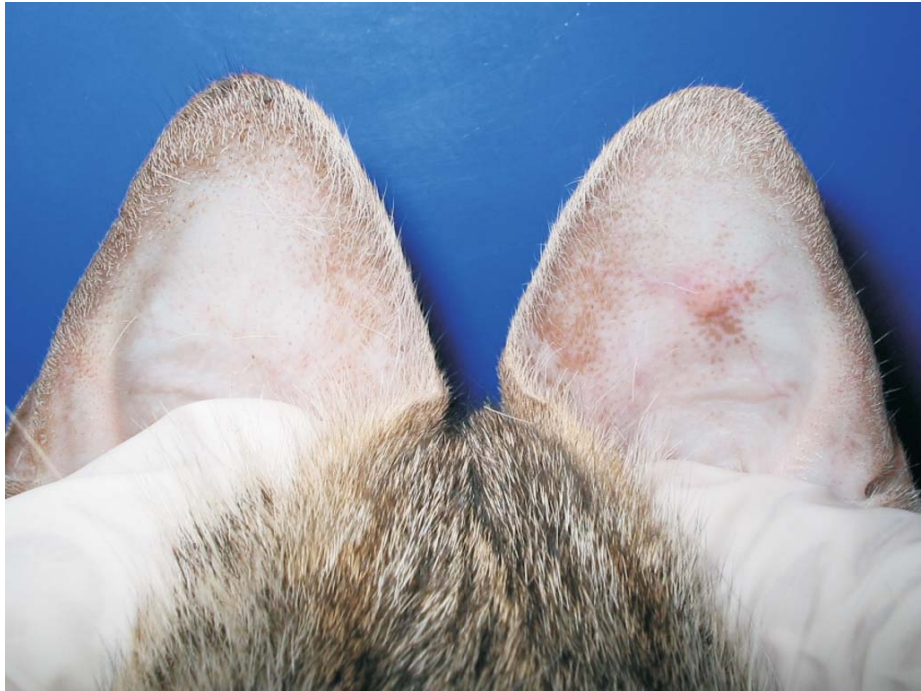


Figura 28. Orelha de gato experimentalmente infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Note uma pápula eritematosa originada no sítio de inóculo aos 15 dias da infecção.

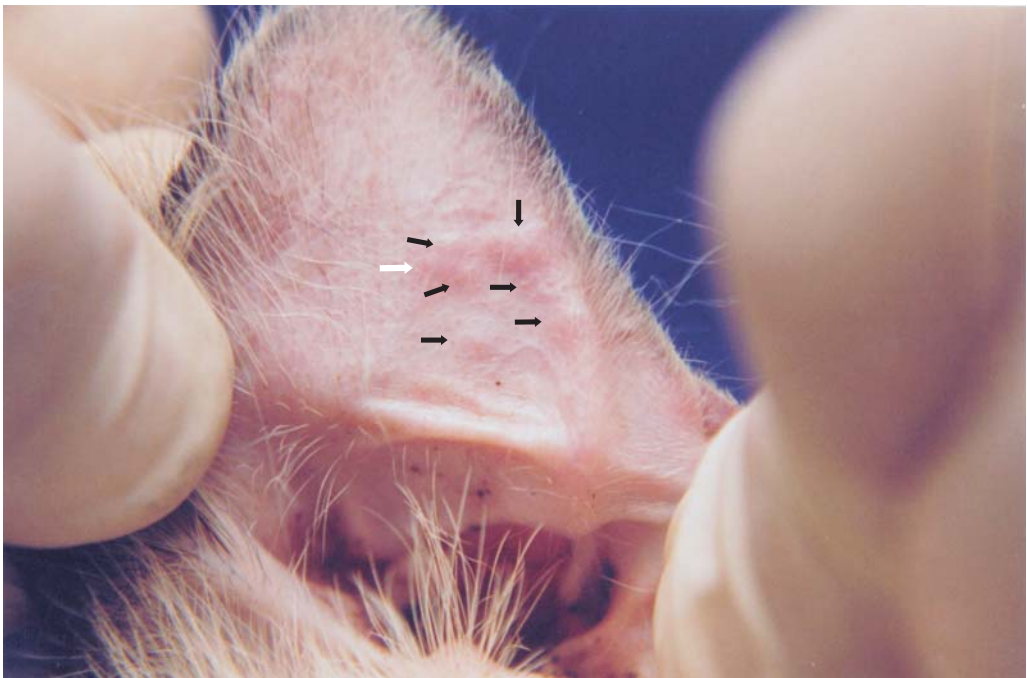


Figura 29. Orelha de gato experimentalmente infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Observe formação de pápulas satélites (setas pretas) ao redor da pápula inicial (seta branca).

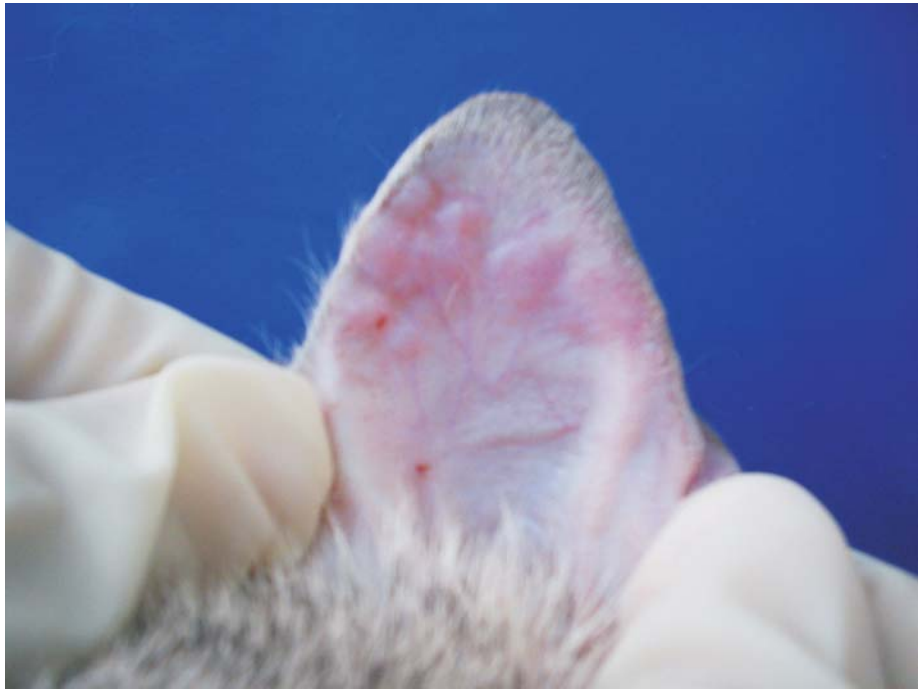


Figura 30. Nódulo formado da coalescência de pápulas satélites em orelha de gato experimentalmente infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

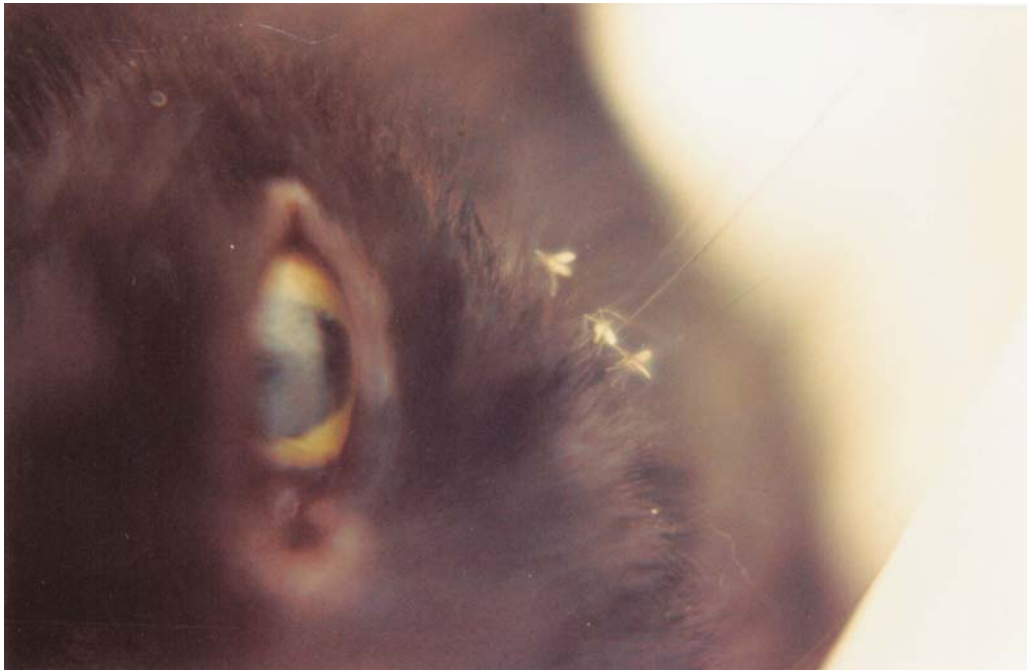


Figura 31. Flebotomíneos *Lutzomyia migonei* pousados na cabeça de gato experimentalmente não infectado com *Leishmania* sp.

6.4.2 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico (Figura 32) foi realizado em um mínimo de três e máximo de cinco por animal no período entre 20 e 90 dias p.i. Um total de 796 flebotomíneos fêmeas ingurgitadas (Figura 33) foi dissecado para pesquisa direta de formas promastigotas no tubo digestivo. No xenodiagnóstico de um gato foram encontradas promastigotas no tubo digestivo de um flebotomíneo (1/224) aos 2½ m.p.i. Estas formas apresentavam-se com movimentos ondulatórios de média a alta intensidade.

6.5 Experimento 5 - Atratividade e preferência alimentar de flebotomíneos em relação a alguns potenciais hospedeiros reservatórios de *L. (V.) braziliensis* em condições de campo.

6.5.1 Atratividade e preferência alimentar.

Os resultados preliminares deste item encontram-se listados na tabela 5.

Tabela 5. Flebotomíneos capturados em armadilhas *Disney* contendo potenciais hospedeiros reservatórios de *Leishmania braziliensis* em trabalho de campo realizado no município de Pacoti, Estado do Ceará, nordeste do Brasil.

Espécie	Isca										Total
	Cão		Gato		Roedor		Vazia		Total		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<i>L. whitmani</i>	0	14	0	8*	0	1 [§]	1	1	1	24	25
<i>L. migonei</i>	5	2	0	2 [†]	0	0	0	0	5	4	9
<i>L. shannoni</i>	0	5 [†]	0	0	0	0	0	0	0	5	5
<i>L. wellcomei</i>	2	7	0	0	0	0	0	0	2	7	9
Total	7	28	0	10	0	1	1	1	8	40	48
	35		10		1		2		48		

[†]Um flebotomíneo ingurgitado. *Cinco flebotomíneos ingurgitados. [§]Flebotomíneo ingurgitado.



Figura 32. Xenodiagnóstico realizado em gato experimentalmente infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Observe um flebótomo (*Lutzomyia migonei* - seta) realizando repasto sangüíneo na orelha infectada.

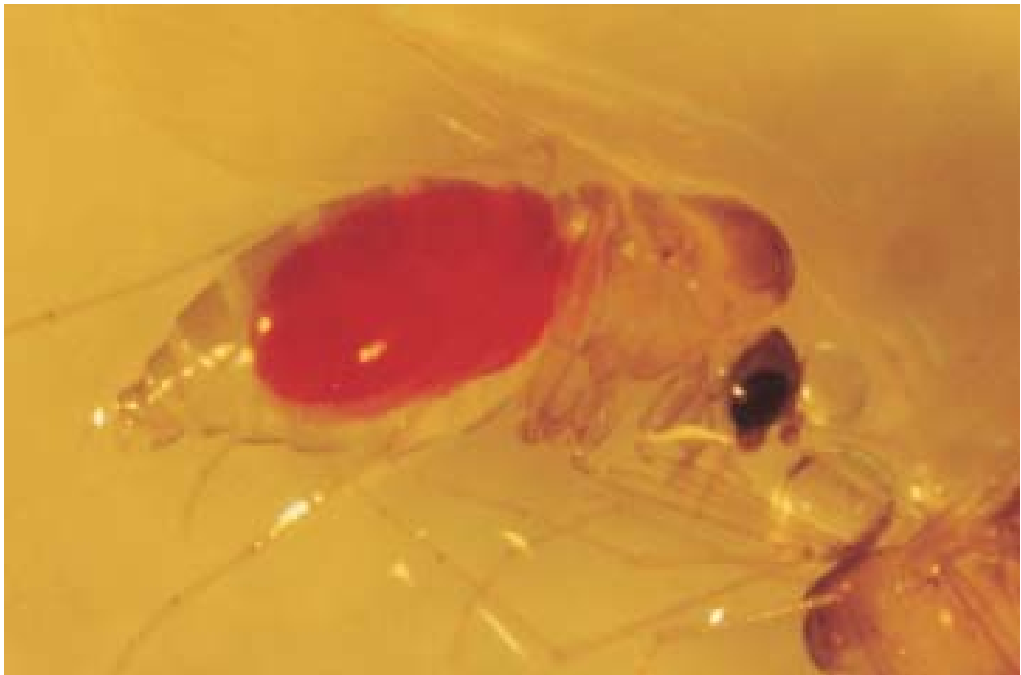


Figura 33. Fêmea de *Lutzomyia migonei* repleta de sangue logo após o xenodiagnóstico realizado em gato experimentalmente infectado com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Todas as iscas atraíram flebotomíneos (Figura 34) e, nas armadilhas dos três animais foi encontrado pelo menos um flebotomíneo ingurgitado. Entretanto, o número de vetores ingurgitados foi maior na armadilha em que estava o gato (60%) do que na que continha o cão (3,5%). É importante salientar que neste experimento, a superfície corporal dos potenciais hospedeiros reservatórios foi desconsiderada. Além disso, o flebotomíneo *L. whitmani* foi a principal espécie capturada.

Os dados referentes ao xenodiagnóstico e preferência alimentar estão redigidos sob a forma de artigo científico (ANEXO V) que se encontra em fase final de avaliação pelos co-autores. Os resultados referentes aos itens 6.2.2, 6.4.1 e 6.4.2 foram apresentados sob a forma de resumo no Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (ANEXOS VI, VII e VIII).

6.6 Experimento 6 - Infecção natural de gatos por *Leishmania* spp

6.6.1 Infecção natural de gatos por *Leishmania* spp

6.6.1.1 Inquérito sorológico

Da mesma forma como citado nos Experimentos 2 e 3 referentes à infecção experimental de gatos com *L. (V.) braziliensis* isoladas de caso humano e felino, respectivamente, o inquérito sorológico dos gatos semi-domiciliados encontra-se em fase de realização. Desta forma, até a presente data não foram obtidos os resultados para inclusão nesta tese.

6.6.1.2 Avaliação dos casos clínicos suspeitos de LTA felina

Os achados referentes às suspeitas clínicas de LTA em dois gatos da região do Maciço de Baturité encontram-se redigidos na forma de “relato de caso”. O artigo 6 (ANEXO IX) foi enviado para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Já o artigo 7 (ANEXO X) refere-se a outro relato de caso em fase de elaboração e será submetido para publicação tão logo sejam obtidas outras análises laboratoriais.

6.6.1.2.1 Caso 1 - Diagnóstico

As pesquisas de anticorpos anti-*Leishmania* sp no soro do animal e de *Leishmania* em cultivo resultaram negativas. Quanto aos testes micológicos, tanto o exame direto, como a cultura foram positivas para *C. neoformans*. Pelo exame direto foram visualizadas estruturas blastoconidiadas encapsuladas sugestivas de *Cryptococcus neoformans*, sendo as culturas positivas para *C. neoformans*. Pela quimiotipagem, o agente infectante foi identificado como *C. neoformans* variedade *neoformans* (LMM1071-IPEC/FIOCRUZ). A partir deste diagnóstico foi realizada a sorotipagem utilizando a técnica de aglutinação em lâmina (Kit Crypto Check Iatron RM 304-k (25), Iatron Laboratories, Tokio, Japão) que identificou o isolado como sorotipo A (fatores 1 e 7 positivos). Diante do diagnóstico e do estado clínico do animal, o proprietário solicitou a eutanásia (realizada conforme resolução número 714 de 20/06/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária).

6.6.1.2.2 Caso 2 - Diagnóstico

A sorologia anti-*Leishmania* foi negativa e cultivo em meio NNN contaminou com fungos. Além disso, quatro meses depois da infecção dos hamsters houve o aparecimento de lesão nodular (Figura 35) nos mesmos locais de inóculo. Os fragmentos das lesões foram submetidos à cultura micológica e histologia clássica e as lâminas confeccionadas, coradas por hematoxilina e esoina (H&E), Gomori-Grocott e reação de *periodic acid-Schiff* (PAS).

As culturas, oriundas de fragmentos de lesão do gato, cresceram moderadamente exibindo colônias aveludadas de coloração branca a amarelo-marrom. Microscopicamente, dois tipos de conídios foram visualizados pela coloração lactofenol *cotton blue*. Um conídio apresentou-se tuberculado e grande com aproximadamente 15 µm de diâmetro e, o outro, pequeno e liso com aproximadamente 3 µm. A identificação definitiva foi feita com a conversão do material da cultura em agar sangue Sabouraud. Neste meio, houve crescimento de *Histoplasma capsulatum*. Os fragmentos oriundos dos hamsters (linfonodos e patas) tiveram o mesmo crescimento em meio de cultura.

Após o diagnóstico, o gato foi tratado com itraconazol, 5 mg/kg/PO por 60 dias, sem qualquer regressão da lesão. Vinte dias após o tratamento, o animal exibiu um quadro agudo de letargia, apatia e inconsciência com evolução para a morte. A suspeita clínica foi de Síndrome Urológica Felina. Exames complementares, bem como o a avaliação histopatológica deste caso, estão em fase de avaliação.



Figura 34. Seleção de flebotomíneos na bandeja componente das armadilhas Disney.



Figura 35. Hamster exibindo formação de lesão nodular no mesmo sítio de inóculo de *Histoplasma capsulatum*.

7 DISCUSSÃO GERAL

A especulação do gato como potencial reservatório de *Leishmania* sp e conseqüente realização deste trabalho teve origem em pontos considerados cruciais relativos a esta espécie animal e às leishmanioses: (1) o padrão etológico do felino; (2) a sua alta densidade populacional; (3) às mudanças no padrão epidemiológico das leishmanioses. Diante desses pontos, considerados molas mestre para o estudo, associados ainda a existência de casos clínicos de LF em várias regiões do mundo, bem como de todos os trabalhos que envolveram esta espécie animal quer sejam por inquéritos epidemiológicos, quer por sua relação biológica com os vetores de *Leishmania* spp (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a; SIMÕES-MATTOS, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, no prelo) impulsionaram o início deste trabalho. Sendo assim, a avaliação da sua suscetibilidade à infecção experimental pelos protozoários foi considerada o gatilho do estudo. A escassa literatura acerca da reprodução da infecção experimental em gatos com leishmânia, sendo que, em sua maioria, utilizando espécies viscerotrópicas do protozoário e inóculos pouco estabelecidos, nos conduziu a estipular um protocolo considerado, aparentemente, satisfatório para este início. A opção por inocular os animais com a espécie *Leishmania braziliensis* se deu por quatro razões fundamentais: (1) a importância desta espécie do protozoário na saúde pública da América e, em especial, para o Brasil; (2) facilidade de avaliação da sanidade do animal após infecção devido à probabilidade de manifestações clínicas externas; (3) maior disponibilidade de materiais e métodos para avaliação do desenvolvimento da infecção no felino com esta espécie de protozoário; (4) larga experiência da equipe de trabalho em relação a LTA nos aspectos clínicos, imunopatológicos e epidemiológicos.

Diante disso, a primeira infecção experimental realizada neste estudo preconizou um inóculo baseado tanto em experiências prévias do grupo de trabalho quanto em clássicos estudos de infecção experimental em modelos como os hamsters (*M. auratus* – WILSON *et al.*, 1979). A escolha do sítio de inoculação, por sua vez,

como nariz e orelha simultaneamente, foi baseada nas manifestações cutâneas de casos clínicos de LF que acometeram, principalmente, as regiões de nariz (PENNISI, 1999), orelhas (CRAIG *et al.*, 1986) e em ambos locais (MACHATTIE, 1931; MELLO, 1940; BONFANTE-GARRIDO *et al.*, 1996).

No tocante ao desenvolvimento da doença experimental, o tempo de evolução e às características das lesões foram semelhantes às verificadas em LF natural (BARNES *et al.*, 1993; BONFANTE-GARRIDO *et al.*, 1996; LARUELLE-MAGALON & TOGA, 1996; OZON *et al.*, 1998; HERVÁS *et al.*, 1999; PENNISI, 1999) bem como em LTA humana (GRIMALDI Jr., 1982). No entanto, as úlceras parecem ser muito mais freqüentes em cães (PIRMEZ *et al.*, 1988) e em seres humanos (COSTA *et al.*, 1990) do que nos gatos deste estudo. A resolução das lesões dos gatos experimentalmente infectados foi levemente mais rápida do que foi observado em LTA humana (COSTA *et al.*, 1990). Entretanto, esta auto-cura pode não significar ausência total de parasitos. A presença de antígenos de *Leishmania* spp ou de amastigotas tem sido relatada em casos de lesões cicatriciais na pele de cães (OLIVEIRA-LIMA, 1996), seres humanos (SCHUBACH *et al.*, 2001) e, em modelo murino resistente à leishmaniose (BELKAID, 2001). Isto pode explicar a recidiva de lesão em um gato com leishmaniose sete anos depois da primeira lesão cirurgicamente excisada (BARNES *et al.*, 1993).

Neste estudo, cerca de 40% dos gatos tiveram disseminação dérmica para outros sítios. Aparentemente não houve disseminação visceral como indicado pelo não achado de amastigotas de *Leishmania* sp na medula óssea, baço e fígado. Pelo menos neste modelo experimental, o estabelecimento do parasito parece ter ficado restrito à pele. Entretanto, a disseminação de protozoários de *L. braziliensis* para vísceras tem sido relatada em infecção natural humana (SOUSA *et al.*, 1995), bem como em infecção experimental em hamsters (SINAGRA *et al.*, 1997).

Do ponto de vista imunológico, especialmente no que concerne à resposta imune humoral, é sabido que os anticorpos não promovem proteção eficiente contra os

parasitos intracelulares de *Leishmania* sp. Ademais, o que se conhece, pelo menos nam LV canina, é que os altos títulos de anticorpos têm sido relacionados com doença ativa (QUINNELL *et al.*, 2003) e, provavelmente, potencialidade de infecção dos vetores. Fazendo-se uma analogia do que se é verificado em cães, nesta primeira etapa experimental, o período no qual os gatos mostraram lesões que albergavam parasitas e com potencialidade de transmissão para os flebotomíneos, não pôde ser detectado pelos métodos sorológicos convencionais. A soroconversão média dos títulos de anticorpos ocorreu quando as lesões estavam em fase de resolução. Além disso, o pico de títulos de anticorpos foi verificado na 20^a semana pós-infecção, quando as lesões estavam em pleno declínio. Da mesma maneira, houve uma baixa correlação entre tamanho de lesão e títulos de anticorpos. Estes dados, em primeira instância, sugerem ser a sorologia um fraco marcador de LTA felina. Diante disso, do ponto de vista epidemiológico, a ausência de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de gatos com lesões cutâneas pode acarretar erros de diagnóstico com outras doenças que são diferenciais de LTA. Desta forma, a ausência de um diagnóstico precoce de LF em áreas endêmicas implicaria na permanência de um animal com potencial risco de transmissão de *Leishmania* sp para os vetores. Além disso, é importante ter em mente que estudos prévios mostraram que os gatos foram mais atrativos (JOHNSON *et al.*, 1993) e melhores fontes de alimentação (OGOSUKU *et al.*, 1994) do que os cães para algumas espécies de flebotomíneos. Além disso, em um ensaio prévio com *L. migonei*, um dos principais vetores de *L. braziliensis* no Brasil, cerca de 90% de fêmeas ingurgitadas foram recuperadas após o contato com gato em uma caixa (Oliveira-Lima, J.W., informação pessoal). Um outro achado importante deste estudo foi a taxa de 38% dos gatos que permaneceu com sorologia positiva aos 18 m.p.i. KIRKPATRICK *et al.* (1984) obtiveram dados semelhantes em gatos experimentalmente infectados com *L. chagasi* e *L. infantum*. Aparentemente, isto poderia indicar uma condição de infecção oculta (fase silenciosa) mais do que cura radical. Entretanto, a ausência de amastigotas nos tecidos dos gatos pela avaliação histológica realizada neste estudo pode, em parte, refutar tal condição. Por outro lado, é importante ter em mente sobre a dificuldade de se encontrar formas de *L. braziliensis*

tanto pela histologia quanto pelo isolamento em cultivo (WEIGLE *et al.*, 1987; NAVIN *et al.*, 1990).

A permanência de alguns animais vivos pelo período de 15 meses objetivou a avaliação de uma provável recidiva, uma vez que a alta taxa de infecção pelo vírus da leucemia felina entre os animais (69,2%) deste estudo foi considerada. Para ratificar esta permanência, foram considerados estudos prévios em que modelos murinos que apresentaram a co-infecção com o vírus da leucemia murina (MLV) e *L. major* mostraram importante aumento no desenvolvimento da doença (BARRAL-NETTO *et al.*, 1995). Sendo assim, seria possível que igualmente como MLV e HIV, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e FeLV bem como outras doenças mieloproliferativas e senilidade possam ser hábeis para promover a recidiva da leishmaniose nos gatos. Porém, até os 15 meses de estudo, os gatos que permaneceram vivos não apresentaram sinais evidentes de recidivas permanentes. Ademais, ratificando o que já foi discutido anteriormente, a histologia não evidenciou a presença de formas amastigotas nos tecidos lesados. Por outro lado, de forma geral, o padrão de reação inflamatória, exibido nos locais de inóculo dos animais experimentais, apresentou uma relativa ascendência através do tempo de infecção, indo de discreto a acentuado. Entretanto, devido ao pequeno número de animais experimentais, algumas variações no padrão inflamatório podem ser atribuídas à suscetibilidade individual de cada indivíduo.

De forma geral, a avaliação histológica dos tecidos de ambos locais de inóculo dos gatos mostrou que nas reações inflamatórias, os tipos celulares mais freqüentemente encontrados eram de 90% de plasmócitos e linfócitos, seguidos, em menor proporção, por macrófagos, neutrófilos e células multinucleadas. Este padrão de freqüência celular é citado por GRIMALDI JR (1982) em casos de resolução espontânea de lesões humanas em que há um considerável acréscimo de plasmócitos e linfócitos substituindo gradualmente os macrófagos infectados dando espaço para a formação de tecido fibroso. Este fato ainda é complementado por MAGALHÃES *et al.* (1986) quando se refere à presença de plasmócitos em casos em que não são

verificadas a presença de amastigotas, de ser um forte indicativo para o diagnóstico de LTA.

Com relação ao gato que foi descartado do Experimento 1 por apresentar sorologia positiva antes da inoculação, acreditamos ser interessante tecer alguns comentários. Durante o experimento, a lesão que se apresentou tanto na orelha como no nariz, foi imensurável, desaparecendo a da orelha em 3 dias. Por outro lado, o animal apresentou intenso prurido no nariz e conseqüente lesão crostosa por auto-mutilação iniciando regressão em aproximadamente 7 dias. Aos 15 m.p.i., a alteração histológica era composta por reação inflamatória contendo leve infiltrado linfoplasmocitário. A apresentação clínico-patológica deste caso difere dos demais animais do mesmo experimento. Neste caso, em especial, podemos especular que a baixa patogenicidade do agente neste hospedeiro poderia ter sido determinada pela exposição prévia à infecção pelo protozoário em condições naturais.

Em relação a outros tecidos avaliados dos animais experimentais, o fato de não terem sido encontradas formas amastigotas, não permite afirmar que as reações inflamatórias se devam, especificamente e unicamente à infecção pelo protozoário, uma vez que muitas das possíveis afecções clinicamente inaparentes dos animais poderiam induzir tais respostas inflamatórias. Neste ponto, pode ser considerado como avaliação importante para certificar a presença destes protozoários, as técnicas de imunohistoquímica e PCR, porém, mesmo assim, permaneceria a dúvida da viabilidade dos protozoários em diferentes tempos de infecção.

Diante disso, em se questionando a viabilidade de *L. (V.) braziliensis* em gatos experimentalmente infectados, tornou-se necessária a realização de mais uma etapa experimental. Sendo assim, o Experimento 2 objetivou avaliar tanto a suscetibilidade do gato à infecção experimental pela mesma cepa, porém utilizando apenas um local de inóculo, quanto à viabilidade dos protozoários *in vivo* de infectar os vetores. O que se pode verificar nesta etapa foi que as primeiras lesões se apresentaram, em média, em relação ao tempo de manifestação (“período de

incubação”), da mesma maneira que o Experimento 1, ou seja, por volta de 2 semanas. Porém, este início, em alguns animais, foi retardado em até 8 semanas, o que difere da primeira etapa experimental em que, em média, no máximo em 3 semanas todos os animais apresentavam lesão. Outro ponto interessante está relacionado também ao tempo do pico máximo de tamanho de lesão que se deu na 16ª s.p.i o que também difere do Experimento 1 em que o pico foi na 10ª s.p.i. Diante desta evolução no tempo, o que se pode afirmar é que o início insidioso de lesão ocorreu, em média, de forma similar ao Experimento 1 (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2005), entretanto em toda a sua evolução apresentou um retardo.

Em relação às características das lesões, excetuando-se dois animais que não apresentaram sinal evidente de infecção, talvez por erro de manipulação no momento da inoculação, 16 gatos mostraram lesões nos períodos, de forma similar ao ocorrido no Experimento 1 (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2005). Por outro lado, às lesões, no que concerne ao tamanho e características em sua evolução, parecem ter sido levemente mais brandas do que no Experimento 1, inclusive com a ausência de úlceras. Provavelmente, esta pequena diferença no desenvolvimento da doença nos gatos pode ser atribuída às diferenças na inoculação. No Experimento 1 foram utilizados dois sítios de inóculo, enquanto no segundo experimento, apenas um. Variações no desenvolvimento de lesões já foram observadas em outros modelos de infecção experimental por diferentes espécies de *Leishmania* devido a diferenças na dose e sítios do inóculo (NABORS & FARREL, 1994; ETGES & MULLER, 1998).

Um fato importante foi comentado no trabalho de infecção experimental em gatos realizado KIRKPATRICK *et al.* (1984). Estes autores especularam que uma cepa de *Leishmania* sp originalmente isolada de caso natural de LF poderia, ou estar mais adaptada ao gato ou, ainda, expressar maior virulência nesta espécie animal. Esta especulação culminou na realização do Experimento 3, utilizando uma cepa de *L.(V.) braziliensis* isolada de LF natural (SCHUBACH *et al.*, 2004). Entretanto, os resultados deste experimento não foram fidedignos para a certificação da virulência e patogenicidade da cepa felina em infecção experimental dos gatos, uma vez que a

inoculação foi feita após a 10ª passagem em meio de cultivo. Estas sucessivas passagens em meio de cultivo se deram pela baixa motilidade das formas promastigotas quando chegaram ao laboratório, bem como pela tentativa de mantê-las vivas até a realização do experimento. Diante disso, é prudente não afirmar que houve baixa (ou nula) virulência/patogenicidade uma vez que estas propriedades do agente podem ter sido perdidas nestas sucessivas passagens em meio de cultivo. Por outro lado, a avaliação histopatológica, ainda em fase de elaboração, poderá nortear alguma evidência.

Apesar de todas as especulações, nenhum trabalho foi encontrado na literatura que tenha avaliado a viabilidade dos protozoários em gatos naturalmente ou experimentalmente infectados por *Leishmania* spp para os flebotomíneos. Sendo assim, até agora, a suposição da potencialidade de gatos como hospedeiros reservatórios dos protozoários não tem sido mais do que mera especulação. Recentemente, esta suposição tem emergido, estando centrada, principalmente, nas recentes evidências sorológicas, parasitológicas e clínicas de acometimento de infecção de gatos por diversas espécies de leishmânia em focos endêmicos (KILLICK-KENDRICK, 2002; PENNISI, 2002; MANCIANTI, 2004; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a; SIMÕES-MATTOS, 2005). Entretanto, vários quesitos são indispensáveis para considerar uma espécie animal como suspeito de ser um hospedeiro reservatório para doenças de ciclo indireto: (a) encontro de casos naturais de infecção pelo biogante; (b) ser suscetível à infecção experimental e abrigar o bioagente por um período; (c) ser atrativo para o vetor e hábil em infectá-lo. Assim, cada uma dessas considerações deve ser verdadeira quando se avaliam os gatos como potenciais hospedeiros reservatórios de *Leishmania* spp.

Neste contexto, há tempos que casos de LF vêm ocorrendo no mundo (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004a; SIMÕES-MATTOS, 2005; DANTAS-TORRES *et al.*, no prelo). Nos últimos anos, estes casos têm aumentado, principalmente no Brasil (PASSOS *et al.*, 1996; SAVANI *et al.*, 2004; SCHUBACH *et al.*, 2004; de SOUZA *et al.*, 2005), Venezuela (BONFANTE-GARRIDO *et al.*, 1991; 1996), França (OZON *et*

al., 1998; GREVOT *et al.*, 2005), Itália (POLI *et al.*, 2002; PENNISI *et al.*, 2004), Portugal (COSTA DURÃO *et al.*, 1994), Espanha (HERVÁS *et al.*, 1999; LEIVA *et al.*, 2005) e Suíça (RÜFENACHT *et al.*, 2005). Além disso, a infecção experimental de gatos com *L. (V.) braziliensis* tem demonstrado resultados semelhantes aos casos humanos e caninos (SILVA *et al.*, 2004; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2005). Outro fator importante a ser salientado é que nestes estudos formas amastigotas viáveis foram isoladas destes animais em meios de cultivo, pelo menos no início da infecção (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2005).

Em se tratando da atratividade do hospedeiro, de forma geral, a atração dos gatos pelos vetores de *Leishmania* spp é indiscutível, uma vez que se pode comprovar pelos casos de ocorrência natural da doença nestes animais e dos levantamentos epidemiológicos (PENNISI, 2002, MANCIANTI, 2004; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004, SIMÕES-MATTOS, 2005). Além disso, trabalhos de campo avaliando a atratividade de diversos potenciais hospedeiros de *Leishmania* spp mostraram que os felinos são atrativos para as mais variadas espécies de flebotomíneos (El SAWAF *et al.*, 1989; JOHNSON *et al.*, 1993; OGOSUKU *et al.*, 1994; COLMENARES *et al.*, 1995). Ademais, os flebotomíneos se alimentam de sangue felino em condições laboratoriais (SÁNCHEZ *et al.*, 2000). Em nosso experimento para avaliar a taxa de ingurgitamento após contato com gatos não infectados experimentalmente por *Leishmania* spp também foi comprovada a ocorrência de repasto das fêmeas de flebotomíneos de *L. migonei* exibindo altas taxas de ingurgitamento ($95,74 \pm 2,37$). Vale salientar, que se notou melhores taxas de oviposição, eclosão e sobrevivência destes dípteros quando alimentados com sangue felino do que com o sangue de hamsters (de SOUZA, informação verbal), animais rotineiramente utilizados para a manutenção das colônias no laboratório de Entomologia da FUNASA, onde foi realizado este experimento.

Durante a avaliação do ingurgitamento de fêmeas de flebotomíneos, observou-se uma predileção à realização do repasto em membros, saco escrotal e cabeça, especialmente na orelha, nariz e lábios. Em casos de LF, uma maior frequência

de lesões cutâneas é observada na cabeça, especialmente nariz, orelha e área ocular. Por outro lado, membros e lábios apresentaram-se com baixa prevalência e, não havendo registros de ocorrência de lesões no saco escrotal (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004; SIMÕES-MATTOS, 2005). Ao contrário do que já foi observado no município de Marica, Rio de Janeiro (MADEIRA *et al.*, 2003), bem como nossas observações em trabalhos de campo na Serra de Baturité no Ceará, o saco escrotal é uma parte comumente afetada por lesões em casos de LTA canina.

Há tempos os cães são incriminados como os principais reservatórios da forma visceral da doença. No trabalho de campo realizado (Experimento 5) em região endêmica para a LTA humana, os flebotomíneos alimentaram-se tanto nos gatos (60%) quanto nos cães (3,5%). Este resultado preliminar denota uma provável potencialidade dos felinos serem infectados por *L. (V.) braziliensis*, caso os vetores, *L. migonei* e *L. whitmani* estejam infectados. Ademais, *L. whitmani* foi a principal espécie capturada no local o que ratifica os trabalhos realizados na região em 1994 por QUEIROZ e colaboradores.

Finalmente, o último e mais importante quesito para um animal ser incriminado como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania* é a sua capacidade de transmitir o bioagente ao vetor. Para tanto, este evento pode ser provado pela técnica de xenodiagnóstico. Desta forma, este estudo foi o primeiro a realizar o xenodiagnóstico em gatos experimentalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* e ainda do qual o vetor, *L. migonei*, foi infectado. De forma interessante, como os trabalhos de campo mostram baixo número de flebotomíneos infectados na natureza (QUEIROZ *et al.*, 1994), o fato de ser encontrado um vetor infectado entre 796 avaliados demonstra a capacidade desta espécie animal em transmitir *L. (V.) braziliensis* ao vetor *L. migonei*. Entretanto, um fato importante a salientar é que a metodologia empregada para este estudo pode ter subestimado os dados. Esta suposição foi comentada por POMPEU (informação verbal) ao verificar que quando os flebotomíneos eram retirados, em número de 10 em média, das caixas de contenção para serem submetidos à excisão do tubo digestório, permaneciam por longo período

de tempo embebidos na solução de água e detergente líquido, diminuindo o encontro de promastigotas vivas. Em xenodiagnóstico realizado em cães, modificando-se esta metodologia, ou seja, retirando apenas um flebótomo por vez para avaliação, certificou-se um aumento considerável de animais positivos. A hipótese é de que, provavelmente, a longa permanência dos flebótomos nesta solução, levaria a morte de promastigotas no tubo digestório, inviabilizando a visualização das mesmas em microscopia óptica, acarretando resultados falso-negativos.

Em relação ao inquérito epidemiológico por sorologia em gatos dos municípios do Estado do Ceará, acredita-se que será um importante sinalizador da possível ocorrência de infecção destes animais em áreas de ocorrência da LTA humana e canina. Por outro lado, a busca ativa de gatos acometidos por leishmaniose parece ser uma prática bastante difícil, uma vez que as manifestações clínicas que as várias espécies de leishmânia desencadeiam não são elucidativas podendo facilmente ser confundidas com neoplasias e, principalmente, doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários ou fungos. As infecções por fungos são as mais prováveis de determinar erros de diagnóstico clínico, principalmente em casos de histoplasmose, esporotricose e criptococose. É importante ter em mente que quando se faz um diagnóstico clínico de infecção fúngica ao invés de *Leishmania* spp, o tratamento à base de antifúngicos pode resultar em cura transitória da leishmaniose, uma vez que algumas destas drogas possuem relativo efeito contra *Leishmania* spp (WALI *et al.*, 1990; SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2002). Como a prática médica veterinária de felinos ainda está aquém das necessidades desta espécie animal no Brasil, principalmente no nordeste do país, casos de LF podem estar sendo sub-diagnosticados. Associados a este fato, outro importante fator é a possível ignorância dos clínicos veterinários da existência da leishmaniose em gatos, creditando apenas a ocorrência da mesma em cães. Desta forma, todos estes fatores contribuem para a falta de diagnóstico de LF, fazendo acreditar que seja incomum. Desta forma, somente as técnicas de laboratório, com visualização das formas do protozoário, podem ajudar a prevenir o erro de diagnóstico, principalmente, em áreas endêmicas para as leishmanioses.

Para exemplificação desta dificuldade de diagnóstico de doenças que acometem gatos, tivemos dois felinos em que nos foi apresentando como prováveis casos de LTA felina. Nas duas situações, os animais eram oriundos de região endêmica para LTA humana, o município de Baturité. Além disso, as lesões eram sugestivas de LTA de acordo com os casos clínicos de LF descritos na literatura (SIMÕES-MATTOS *et al.*, 2004; SIMÕES-MATTOS, 2005). Porém, todos os exames laboratoriais relacionados à leishmaniose descartaram tal possibilidade ficando confirmados o diagnóstico de Criptococose e Histoplasmose. Assim, fica claro que o diagnóstico laboratorial, com identificação do agente, é o que em última análise será conclusivo sobre a suspeita clínica primária.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De antemão, os dados obtidos até o momento, mostram claras evidências de muitos dos pontos obscuros que circundam os gatos em vários aspectos das leishmanioses. Sendo assim, conclui-se que os gatos domésticos são modelos parcialmente suscetíveis à infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*. Eles mostram manifestação clínica compatível com a enfermidade, títulos de anticorpos anti-*Leishmania* sp, lesões albergando parasitas e cura clínica espontânea. Além disso, são fontes de alimentação para os flebotomíneos *L. migonei* e *L. whitmani* e quando experimentalmente infectados por *L. (V.) braziliensis* podem transmitir o protozoário ao vetor *L. migonei*.

Os dados deste trabalho associados aos achados da literatura permitem especular que os gatos domésticos agregam todas as condições de um potencial reservatório de *Leishmania (V.) braziliensis*. Por outro lado, os inquéritos epidemiológicos são necessários para avaliar o real papel dos gatos na transmissão da LTA em áreas endêmicas, especialmente quando são adotadas estratégias de controle. Além disso, estudos experimentais, em modelos felinos infectados com várias espécies de *Leishmania* poderão contribuir para um melhor conhecimento da LF natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C.M.; FERNANDEZ, R.; FERNANDEZ, E.; DEANE, L.M. Animales domésticos y leishmaniasis tegumentária americana. *Acta Científica Venezuelana*. v. 30, p. 121, 1979.
- AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F. Leishmaniose tegumentar em uma mula (*Equus caballus* x *Equus asinus*) em área endêmica no Estado do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 81, p. 239-240, 1986.
- 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*. v. 81, p. 471-472, 1986.
- AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GRIMALDI FILHO, G.; MOMEN, H. Human, canine, and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 82, p. 143, 1987.
- ALENCAR, J.E. Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*. In: Congresso Brasileiro de Higiene, 14, Niterói, 1959.
- ALENCAR, J.E.; HOLANDA, D.; CAVALCANTE, J.D.N. Calazar no vale do Jaguaribe, Ceará, 1955. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. v. 8, p. 33-47, 1956.
- ALVAR, J. *Las leishmaniasis: de la biología al control*. 2. ed. Salamanca: Intervet, 236p., 2001.
- ANJILI, C.O.; GITHURE, J.I. Refractoriness of domestic cats to infection with a Kenyan strain of *Leishmania donovani*. *East African Medical Journal*. p. 322, 1993.
- AMARAL, V.F.; TEVA, A.; PORROZZI, R.; SILVA, A.J.; PEREIRA, M.S.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; GRIMALDI-JR., G. *Leishmania (Leishmania) major*-infected Rhesus macaques (*Macaca mulata*) develop varying levels of resistance against homologous re-infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 96, p. 795-804, 2001.

- ANDERSON, R.M.; MAY, R.M. Infectious Diseases of Humans. Oxford: Oxford Science Publication, 1992.
- ARIAS, J.; BELTRAN, F.; DESJEUX, P.; WALTON, B. Epidemiologia y control de la leishmaniasis en las Americas, por país o territorio. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C.: E.U.A. 56 p., 1996.
- ASHFORD, R.W. When is a reservoir not a reservoir? Emerging Infectious Diseases. v. 9, p. 1495-1496, 2003.
- AZULAY, R.D. Leishmaniose Tegumentar. Tese (Livre-Docência em Clínica Dermatológica e Sifiligráfica). Universidade do Distrito Federal. 1952.
- BADARÓ, R.; NETTO, E.M.; FREIRE, M.; TRIGO, J.; NAKATANI, N.; STRAATMANN, A.; DAVID, J.; KILLICK-KENDRICK, R. Preliminary results of a field trial in Bahia State, Brazil, to reduce the risk of human visceral leishmaniasis by controlling CanL with deltamethrin-impregnated collars. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, p. 97, 2002.
- BARBOSA, M.D.M.S. Roedores da região neotropical e patógenos de importância para o homem. São Carlos: UFSCar. 1985.
- BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOCHI, M.C.A.; CONCEIÇÃO, N.F.; SILVA, P.C.T.; SILVA, V.L. Vaccination and experimental infection of cats (*Felis domesticus*) with *Leishmania*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 83, p. 159, 1988.
- BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOCHI, M.C.A.; FURTADO, W.; QUEIRÓS, F.; CHICARINO, J.; PACHECO, R.S. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 89, p. 217-220, 1994.
- BARNES, J.C.; STANLEY, O.; CRAIG, T.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. Journal American Veterinary Medical Association. v. 202, p. 416-418, 1993.
- BARÓ, T.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; MENDONZA, M.H.; MORERA, Y.; ALÍA C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*

- isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 36, p. 458-461, 1998.
- BARRAL-NETTO, M.; SANTANA DA SILVA, J.; BARRAL, A.; REED, S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *American Journal of Pathology*. v. 146, p. 635-642, 1995.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 7, p. 328-337, 2004.
- BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.; SACKS, D.L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of Experimental Medicine*. v. 194, p. 1497-1506, 2001.
- BELL, J.C.; PALMER, S.R.; PAYNE, J.M. The zoonoses (infections transmitted from animals to humans). London: Arnold, 1998.
- BERGEON, M.P. Un cas de leishmaniose chez le chat. *Bulletin de la Société Vétérinaire de Lyon*. v. 30, p. 92-93, 1927.
- BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years (review article). *Clinical Infectious Diseases*. v. 24, p. 684-703, 1997.
- BEZ, M. La leishmaniose chez le chat; enquête séro-épidémiologique dans les Alpes-maritimes. Thèse Docteur Vétérinaire. ENVL. n° 46, 110p., 1992.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; MELENDEZ, E.; TORRES, R.; MORILLO, N.; ARREDONDO, C.; URDANETA, I. Leishmaniasis equine en Venezuela. In: Congreso Latino-Americano de Parasitología, Buenos Aires, p. 237, 1979.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; MELENDEZ, E.; TORRES, R.; MORILLO, N.; ARREDONDO, C.; URDANETA, I. Enzootic equine cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 75, p. 471, 1981.

- BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 85, p. 53, 1991.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDIVIA, O.; TORREALBA, J.; GRACÍA, M.T.; GARÓFALO, M.M.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI-JR., G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Revista Científica FCV-LUZ*. v. 6, p. 187-190, 1996.
- BOSELUT, H. Um cas de leishmaniose générale du chat. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*. v. 26, n° 1, 1948.
- BRADSHAW, J.W.S.; HORSFIELD, G.F.; ALLEN, J.A.; ROBINSON, L.H. Feral cats: their role in the population dynamics of *Felis catus*. *Applied Animal Behaviour Science*. v. 65, p. 273-283, 1999.
- BRUMPT, E. In: *Parasites Animaux, Précis de Parasitologie.*: E. Brumpt (Editor), 6^a ed. Masson et Cie Boulevard Saint-Germain: Paris, p. 248-256, 1949.
- CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*. v. 1, p. 34-37, 2003.
- CANTARINO, L.M. Leishmaniose Tegumentar Americana: uso de técnicas da biologia molecular (PCR) no diagnóstico de infecção em roedores de coleção do Museu Nacional – UFRJ. Dissertação. ENSP – FIOCRUZ. Rio de Janeiro. 70p., 1998.
- CHABLE-SANTOS, J.B.; WYNSBERGHE, N.R.V.; CANTO-LARA, S.B.; ANDRADE-NARVAEZ, F.J.. Isolation of *Leishmania (L.) mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 53, p. 141-145, 1995.
- CHAGAS, E.; FERREIRA, L.C.; DEANE, G.; DEANE, L.; GUIMARÃES, F.N. Leishmaniose visceral americana. II. Aspectos epidemiológicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 33, p. 138-206, 1938.
- CLINKENBEARD, K.D.; COWELL, R.L.; TYLER, R.D. Disseminated

- histoplasmosis in dogs: 12 cases (1981–1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 193, p. 1443-1447, 1988.
- COLMENARES, M.; POTÚS, M.; BOTET, J.; DOBAÑO, C.; GÁLLEGO, M.; WOLFF, M.; SEGUÍ, G. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Biotin/Avidin Method. *Journal of Medical Entomology*. v. 32, p. 229-233, 1995.
- COSTA, J.M.L.; VALE, K.C.; FRANÇA, F.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, J.O.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D.; MAGALHÃES, A.V.; SILVA, C.M.P.; NETO, A.S.; GALVÃO, C.E.S. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania Viannia braziliensis* em lesões cutâneas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 23, p. 205-208, 1990.
- COSTA DURÃO, J.F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; SIMÕES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. v. 89, p. 140-144, 1994.
- CRAIG, T.M.; BARTON, C.L.; MERCER, S.H.; DROLESKEY, B.E.; JONES, L.P. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 35, p. 1100-1102, 1986.
- DAVID, J.R.; STAMM, L.M.; BEZERRA, H.S.; DE SOUSA, R.N.; KILLICK-KENDRICK, R.; OLIVEIRA-LIMA, J.W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 96, p. 839-884, 2001.
- DAVIES, C.R.; MAZLOUMI GA VGANI, A.S.; HODJATI, M.H.; MOHITE, H. Impact of insecticide impregnated dog collars on the incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs and childrens. *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*. In: *Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, 2002, p. 87-90, 2002.
- DAVIES, C.; TROY, G.C. Deep mycotic infections in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v. 32, p. 380-391, 1996.
- De SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.N.; MARIN,

- C.R.B.; NUNES, V.L.B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 128, p. 41-45, 2005.
- DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. (Tese) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 162 p., 1956.
- DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. v. 10, p. 431-450, 1958.
- 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.
- DENUZIÈRE, C. Un chat 'leishmanien'. *La Semaine Vétérinaire*. n. 32, p. 1-2, 1977.
- DESJEUX, P. Urbanisation of the leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: *Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, 2002, 49-55, 2002.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sangüinea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública*. v. 19, p. 1373-1380, 2003.
- DIETZE, R., ALENCAR, J.E., NEVES, J. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R.: *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8ed. Rio de Janeiro, Guanabara: Koogan. p. 706-717, 1991.
- DUNAN, S.; MARY, C.; GARBE, L.; BRETON, Y.; OLIVON, B.; FERREY, P.; CABASSU, J.P. A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la region Marseillaise. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*. v. 7, p. 17-20, 1989.
- EL SAWAF, B.M.; MANSOUR, N.S.; EL SAID, S.M.; DABA, S.; YOUSSEF, F.G.; KENAWY, M.A.; BEIER, J.C. Feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodiade) in El Agamy, Egypt. *Journal of Medical Entomology*. v. 6, n. 5, p. 497-498, 1989.

- ETGES, R.; MÜLLER, I. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *Journal of Molecular Medicine*. v. 76, p. 372-390, 1998.
- EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.O.; TEIXEIRA, M.J.; McAULLIFE, I.; LOPES, U.G.; PERSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine visceral leishmaniasis in Northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 42, p. 118-123, 1990.
- FALQUETO, A.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI-FILHO, G.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; JESUS, A.C.; ALENCAR, J.T.A. Participação do cão no ciclo de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Vianna, estado do Espírito Santo, Brasil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. v. 31, 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 Espírito Santo, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. v. 82, p. 433, 1987.
- FERNANDES, O.F.L.; COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SOARES, A.J.; PEREIRA, A.J.S.C.; SILVA, M.R.R. *Cryptococcus neofarmans* isolados de pacientes com AIDS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 33, p. 75-78, 2000.
- FORATTINI, O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. v. 2, p. 195-203, 1960.
- FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.G.; RABELLO, E.X.; FERREIRA, C.A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v. 6, p. 255-261, 1972.
- FORATTINI, O.P.; PATTOLI, D.B.G.; RABELLO, E.X.; FERREIRA, C.A. Nota sobre a infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v. 7, p. 181-184, 1973.
- FORTES, S.T.; LAZÉRA, M.S.; NISHIKAWA, M.N.; MACEDO, R.C.L.; WANKE B. First isolation of *Cryptococcus neofarmans* var. *gattii* from a native jungle tree

- in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses*. v. 44, p. 137-140, 2001.
- FRANKE, R.C. Ecologia da *Leishmania*. In: 4º Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, Recife (Pernambuco), 1999, p. 35-38, 1999.
- FRANTI, C.E.; KRAUS, J.F.; BORHANI, N. Pet ownership in a suburban-rural area of California, 1970. *Public Health Reports*, v. 89, p. 473-484, 1974.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE-FUNASA/MS. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília – 62 p., 2000.
- GASSER, R.A.; MAGILL-JR.; A.J.; OSTER, C.N.; FRANKE, E.D.; GROGI, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. v. 18, p. 83-90, 1994.
- GIMENO ONDOVILLA, A. Contribución a la epidemiologia del kala-azar. *Tropical Disease Bulletin*. v. 30, p. 752, 1933.
- GIORDANO, A. Le chat dans la transmission de la leishmaniose viscérale de la méditerranée. *Bulletin Sezione Italiana de la Societe Internazionale de Microbiologie*. v. 5, p. 300-332, 1933.
- GOULART, E.G.; LEITE, I.C. Histoplasmose. In: *Parasitologia e Micologia Humana*. Cultura Médica: Rio de Janeiro. p. 480-483, 1978.
- GRIMALDI JR., G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 77, p. 195-215, 1982.
- 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 FeIV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite*. v. 12, p. 271-275, 2005.
- GUIMARÃES, F.N.; AZEVEDO, M.; DAMASCENO, R. Leishmaniose tegumentar - zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 66, p. 151-168, 1968.

- GUPTA, A.K.; DEL-ROSSO, J.Q.; C.W.; LYNDE, G.H. BROWN, SHEARS, N.H. Hepatitis associated with terbinafine therapy: three case reports and a review of the literature. *Clinical and Experimental Dermatology*. v. 23, p. 64-67, 1998.
- HAY, R.J. Histoplasmosis. *Dermatology*. v. 12, p. 310-314, 1993.
- HAYDON, D.T.; CLEAVELAND, S.; TAYLOR, L.H.; LAURENSEN, M.K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*. v. 8, p. 1468-1473, 2002.
- HERVÁS, J.; CHACON-MANRIQUE De LARA, F.; LOPEZ, J., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; GUERRERO, M.J., MORENO, A. Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. *Veterinary Record*. v. 149, p. 624-625, 2001.
- HERVÁS, J.; CHACON-MANRIQUE De LARA, F.; SÁNCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILHO, J.A.; GAMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 1, p. 101-105, 1999.
- HILL, FL. Cryptococcosis in a North Island Brown Kiwi (*Apteryx australis mantelli*) in New Zealand. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. v. 33, p. 305-309, 1995.
- HODGES, R.D.; LEGENDRE, A.M.; ADAMS, L.G.; WILLARD, M.D.; PITTS, R.P.; MONCE, K.; NEEDELS, C.C.; WARD, H. Itraconazole for the treatment of histoplasmosis in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 8, p. 409-413, 1994.
- HOOGSTRAAL, H.; DIETLEIN, D.R. Leishmaniasis in the Sudan Republic: recent results. *Bulletin of the World Health Organization*. v. 31, p. 137-143, 1964.
- HUBÁLEK, Z. Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. *Emerging Infectious Diseases*. v. 9, p. 403-404, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [IBGE]. Sinopse preliminar do Censo Demográfico 2000. Rio de Janeiro: IBGE; 2001. Volume 7. 415p.
- JACOBS, G.J.; MEDLEAU, L. Cryptococcosis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 2nd edition, W.B. Saunders: Philadelphia, p. 383-390, 1998.

- JOHNSON, R.N., NGUNBI, P.M., NWANYUMBA, J.P., ROBERTS, C.R. Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Medical Veterinary Entomology*. v. 7, p. 216-218, 1993.
- KAGAWA, Y.; AOKI, S.; IWATOMI, T.; YAMAGUCHI, M.; MOMIYAMA, N.; HIRAYAMA, K.; TANIYAMA, H. Histoplasmosis in the skin and gingival in a dog. *Journal of Veterinary Medical Science*. v. 60, p. 863-865, 1998.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 21, p. 123-152, 1995.
- KENNER, J.R.; ARONSON, N.E.; BENSON, P.M. Advances in military dermatology. The United States military and leishmaniasis. *Dermatology Clinics*. v. 17, p. 77-92, 1999.
- KILLICK-KENDRICK, R. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: *Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, 2002, 5, 2002.
- KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*. v. 11, p. 105-111, 1997.
- KIRBY, G.C. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. v. 90, p. 605-609, 1996.
- KIRKPATRICK, C.E.; FARRELL, J.P.; GOLDSCHMIDT, M.H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Experimental Parasitology*. v. 58, p. 125-131, 1984.
- KOWALEWICH, N.; HAWKINS, E.C.; SKOWRONEK, A.J.; CLEMO, F.A. Identification of *Histoplasma capsulatum* organisms in the pleural and peritoneal effusion of a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 202, p. 423-426, 1993.
- LACERDA, M.M. The Brazilian Leishmaniasis Control Program. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 89, p. 489-495, 1994.

- LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Biology of the Kinetoplastida. LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A. (Eds.). London: Academic Press. p. 1- 116, 1979.
- LARUELLE-MAGALON, C.; TOGA, I. Un cas de leishmaniose féline. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. v. 31, p. 255-261, 1996.
- LAVERAN, A. Infections du cobaye, du lapin et du chat par la *Leishmania infantum*. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique*. v. 6, p. 110-114, 1913.
- LAZÉRA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M.N.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*. v. 38, p. 379-383, 2000.
- LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T.; ROURA, X. Ocular and visceral leishmaniasis in a domestic cat. *Veterinary Ophthalmology*, v. 5, p. 285, 2005.
- LIMA JÚNIOR, A.D. Caracterização da população canina para o controle da raiva e outros problemas de saúde pública. *Ciência Veterinária nos Trópicos*. v. 2, p. 65-78, 1999.
- MACHATTIE, C; MILLS, E.A.; CHADWICK, C.R. Naturally occurring oriental sore of the domestic cat in Iraq. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 25, p. 103-106, 1931.
- MACKIE, J.T.; KAUFMAN, L.; ELLIS, D. Confirmed histoplasmosis in an Australian dog. *Australian Veterinary Journal*. v. 75, p. 362-363, 1997.
- MADEIRA, M.F.; UCHOA, C.M.A.; LEAL, C.A.; SILVA, R.M.M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, p. 551-555, 2003.
- MAGALHÃES, A.V.; MORAES, M.A.P.; RAICK, A.N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania Leishmania braziliensis*. 3. Reação celular nos tecidos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 28, p. 300-311, 1986.
- MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*. v. 46, p. 203-206, 2004.

- MANNING, A.; SERPELL, J. *Animals and Human Society: Changing Perspectives*. Routledge: London. 199p., 1994.
- MARECHAL, M. *La leishmaniose féline: cas sporadique ou réalité encore ignorée? (étude dans la région marseillaise)*. Thèse Docteur Vétérinaire. ENVL. n° 87, 68p. 1993.
- MAROLI, M.; MIZZONI, V.; BALDI, L.; OLIVA, G.; GRADONI, L. The control of canine leishmaniasis of Scalibor[®] protectorbands in southern Italy: pilot field studies. *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*. In: *Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, 2002, 81-86.
- MARTINS, A.V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A.L. *American sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae)*. Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, Brazil. 195 p., 1978.
- MATTOS, M.R.F. *Resposta ovariana, qualidade embrionária e retorno à atividade reprodutiva natural em felinos domésticos (*Felis catus*) submetidos a diferentes tratamentos hormonais para indução do estro e ovulação*. (Tese). Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. 156 p., 2004.
- MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. v. 119, p. 237-246, 1999.
- MAZZA, S. *Leishmaniasis cutanea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro*. *Boletín del Instituto Clínico Quirúrgico*. v. 3, p. 462-464, 1927.
- MELLO, G.B. *Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania**. *Brasil Médico*. v. 54, p. 180, 1940.
- MICHAEL, S.A.; MORSY, T.A.; ABOU EL-SEOUD, S.F.; SALEH, M.S.A. *Leishmaniasis antibodies in stray cats in Ismailiya Governorate Egypt*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. v. 12, p. 283-286, 1982.
- MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. *Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis*. In: *International Canine Leishmaniasis Forum, 1999, Barcelona*. *Proceedings of Barcelona Intervet, 1999*. p. 46-53, 1999.

- MIN, K.H.; KWON-CHUNG, K.J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. v. 261, p. 471–480, 1986.
- MORSY, T.A.; ABOU EL SEOUD, S.M.F. Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. v. 24, p. 199-204, 1994.
- MORSY, T.A.; AL-DAKHIL, M.A.; EL-BAHRAWY, A.F. Natural *Leishmania* infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. v. 29, p. 69-74, 1999.
- MORSY, T.A.; MICHAEL, S.A.; EL DISI, A.M. Cats as reservoir hosts of human parasites in Amman, Jordan. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. v. 10, p. 5-18, 1980.
- MORSY, T.A.; MICHAEL, S.A.; MAKHLOUF, L.M.; EL SIBAI, M.M. *Leishmania* infection sought in non human hosts in Suez governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. v. 10, p. 539-545, 1988.
- NABORS, G.S.; FARREL, J.P. Site-specific immunity to *Leishmania major* in SWR mice: the site of infection influences susceptibility and expression of the antileishmanial immune response. *Infection and Immunity*. v.62, p. 3655-3662, 1994.
- NAVIN, T.R.; ARANA, F.E.; de MIRADA, A.M. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 42, p. 36, 1990.
- NAUCKE, T.J. Leishmaniose bei katzen. *Rundschreiben*, n. 4, 2000. Capturado em 05 jan. 2004. Disponível on line: <http://members.aol.com/TJNaucke/letter04.html>
- NEVES, D.P. *Parasitologia humana*. 9ª Ed. Atheneu: São Paulo. 524p., 1997.
- NISHIKAWA, M.M.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, G.G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B.R.; MACEDO, R.C.L.; BEZERRA, C.C.F.; PÉREZ, M.A.; CARDARELLI, P.; WANKE B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, p. 73-77, 2003.

- OGOSUKU, E.; PEREZ, J.E.; PAZ, L.; NIETO, E., MONJE, J.; GUERRA, H. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Annual Tropical Medicine Parasitology*. v. 88, p. 329-335, 1994.
- OLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today*. v. 9, p. 323-328, 1993.
- OLIVEIRA, A.P. Inquérito sorológico de *Leishmania* sp em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Guaratiba, município do Rio de Janeiro, Brasil. (Trabalho de Conclusão de Curso) Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”. 33p., 2002.
- OLIVEIRA-LIMA, J.W. Transmission of cutaneous leishmaniasis in Brazil. (Tese). Harvard School of Public Health, Boston, USA. 1996.
- OLIVEIRA-LIMA, J.W.; DAVID, J.R.; STAMM, L.M.; BEZERRA, H.S.; SOUSA, R.N.; KILLICK-KENDRICK, R. Scalibor® protectorbands protect dogs from bites of two species of Neotropical sand flies. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 77-80, 2002a.
- OLIVEIRA-LIMA, J.W.; SOUSA, R.N.; TEIXEIRA, M.J.; POMPEU, M.M.L.; KILLICK-KENDRICK, R. AND DAVID, J.R.,. Preliminary results of a field trial to evaluate the value of deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis in northeast Brazil. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 92-95, 2002b.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Joint WHO/FAO expert committee on zoonoses. 2nd report. WHO Technical Report Series n° 169, Geneva; 1959. 3rd report, WHO Technical Report Series n° 378, Geneva: The Organization; 1967.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Guidelines for dog population management: Geneva, 1990.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Divisão de Controle de Doenças Tropicais. Disponível on line: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>. 2005.

- OZON, C.; MARTY, P.; LEVIÈVRE, A.; BIORGALLI, J.; CORNIGLION, A.; GIACOMO, A.; LAMOTHE, J.; MATHIEU, F.; PIERRE, M.; YHOMAZO, F.; VILLEMIN, V.; HAAS, P. Le chat reservoir de *Leishmania infantum* dans le sud de la France? In: Proceedings of 24th WSAVA Congress, Lyon 23rd-26th September 1999.
- OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LEVIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Veterinary Parasitology*. v. 75, p. 273-277, 1998.
- PASSOS, V.M.A.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (Viannia) in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 91, p. 19-20, 1996.
- PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*. v. 30, p. 1395-1405, 2000.
- PAVLOVSKY, E.N. Natural nidity of transmissible diseases. Urbana: University of Illinois Press. 1966.
- PEREIRA, M.G. Epidemiologia: Teoria e Prática. In: Doenças Infeciosas. Ganabara & Koogan: Rio de Janeiro. 8^a ed., p. 419-448, 2005.
- PENNISI, M.G. Case report of *Leishmania* spp. infection in two cats from Aeolian Archipelago (Italy). In: Proceedings of the 24th WSAVA Congress. Lyon 23rd-26th September 1999 (CD-Rom), 1999.
- PENNISI, M.G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, p. 39-48, 2002.
- PENNISI, M.G.; MASUCCI, M.; CATARSINI, O. Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in FIV⁺ gatti che vivono in zona endemic area. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. v. 52, p. 265-266, 1998.
- PENNISI, M.G.; MAXIA, I.; VITALE, F.; MASUCCI, M.; BORRUTO, G.; CARACAPPA, S. Studio dell'infezione de *Leishmania* mediante PCR in gatti che

- vivono in zona endemica. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie. v. 54, p. 215-216, 2000.
- PENNISI, M.G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; LO GIUDICE, S. Case report of leishmaniasis in four cats. Veterinary Research Communications. v. 28, p. 363-6, 2004.
- PESSÔA, S.B.; BARRETO, M.P. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Educação e Saúde. 527p., 1948.
- PESSÔA, B.S.; MARTINS, A.V. Parasitologia Médica. 11^a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 66-124, 1988.
- PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P.; GRIMALDI-JR.; G. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 38, p. 52-58, 1988.
- 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.
- PONS, F.; LONDRES, H. Leishmaniasis tegumentaria en el asentamiento campesino de Zipayare. Aspectos epidemiológicos, clínicos y inmunológicos. Su importancia en el reforma agrária. Kasma. v. 3, p. 5-59, 1968.
- PORTÚS, M.; GÁLLEGO, M.; RIERA, C.; AISA, M.J.; FISA, R.; CASTILLEJO, S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). Revista Ibérica de Parasitología. v. 62, p. 72-76, 2002.
- QUEIROZ, R.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; PESSOA, F.A.C.; SOUSA, R.N.; DAVID, J.R. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 50, p. 693-698, 1994.
- QUINNELL, R.J.; COURTNEY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine

- visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 91, p. 161-168, 2003.
- RAMOS, J.J.Z.; SARASA, I.A.; OCHOA, P.G.; HERNANDEZ, J.A.C.; SALINAS, M.J.G.; AMELLA, M.J.M. Serological evidence of leishmaniasis in cats in Aragon, Spain. In: Proceedings of 27 WSAVA. On line: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2860&Category=475>. 2002
- RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Flebotomíneos no Brasil. Fiocruz: Rio de Janeiro. 368p., 2003.
- REICHMANN, M.L.A.B.; PINTO, H.B.F.; NUNES, V.F.P. Vacinação contra raiva de cães e gatos (Manuais, 3). Instituto Pasteur: São Paulo. 1999.
- REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiares*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical Review of the current evidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 6, p. 530-541, 1999.
- REY, L. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. 3. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 856p., 2001.
- RODRIGUEZ, J.H.; AREVALO, J.P.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; FERNANDEZ, J.L.; BOISO, A.M.; GOMEZ VILLAMANDOS, J.C. Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. In: World Small Animal Veterinary Association Congress, 27, 2002, Granada. Proceedings of Granada: WSAVA, 2002. Capturado em 10 jan. 2004. Disponível on line: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2754>.
- ROSICKY, B. Natural foci of diseases. In: Infectious diseases: their evolution and eradication. Cockburn, A. (Ed.). Charles N. Thomas Publishers: England. p. 108-126, 1967.
- RÜFENACHT, S.; SAGER, H.; MÜLLER, N.; SCHAEERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M.M.; ROOSJE, P.J. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *The Veterinary Record*. v. 156, p. 542-545, 2005.

- SABROZA, P.C. Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar americana no Rio de Janeiro. Relatório de Pesquisa, Ministério da Saúde, 1983.
- SANCHEZ, J.L.; DINIEGAR, B.M.; SMALL, J.W.; MILLER, R.N.; ANDREJAR, J.N.; WEINER, P.J.; LAWYER, P.G.; BALLON, W.R.; LOVELACE, J.K. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 47, p. 47-54, 1992.
- SÁNCHEZ, M.A.; HERVÁS, H.; CHACÓN, F.; GÓMEZ, J.C.; LUICENTES, J.; CASTRILLO, J.; PÉREZ, R.; PASCUAL, F. Evaluación del gato común (*Felis catus domesticus*) como reservorio de la leishmaniose en la cuenca mediterranea. *Pequeños animales*. v. 24, p. 46-54, 2000.
- SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; D'ÁUDRIA, S.R.N.; ZAMPIERI, R.A.; FLOETER-WINTER, L.M. Primeiro caso de leishmaniose felina causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na América. In: Proceedings of Congresso Científico Anual do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 181. Disponível on line: <http://www.icb.usp.br/resumo/res-epi.html>. 2002.
- SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁUDRIA, 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 domestic cat (*Felis catus*) from Cotia county, São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 120, p. 229-233, 2004.
- SCHAWALDER, P. Leishmaniose bei Hund und Katze: autochtone Falle in der Schweiz. *Kleintier-Praxis*. v. 22, p. 237-246, 1977.
- SCHENONE, H. Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 94, p. 289-294, 1999.
- SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; ARAÚJO, M.L.; SOUZA, W.J.S.; HADDAD, F.; PEREZ, M.A.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; COSTA, S.C.G. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary

- leishmaniasis patients. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 96, p. 987-996, 2001.
- 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.; SCHUBACH, A.O. 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, p. 165-167, 2004.
- SERGEANT Ed. et Et.; LOMBRAD, J.; QUILICHINI, M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. Bulletin de Société de Pathologie Exotique. v.5, p.93-98, 1912.
- SEVERO, L.C.; MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A.T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. Revista Iberoamericana de Micologia. v. 16, p. 152-154, 1999.
- SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situation and their importance in the epidemiology of the disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 83, p. 486-490, 1988.
- SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. Journal of Feline Medical and Surgery. v. 3, p. 193-209, 2001.
- SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 91, p. 671-683, 1996.
- SILVA, F.M.O.; SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO, C.L.B.; De SOUSA, R.N.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; LIMA, J.W.O. Comportamento alimentar de flebotomíneos em contato com gatos domésticos não infectados por *Leishmania* sp. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 13, p. 344, 2004a.
- SILVA, F.M.O.; SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO, C.L.B.; FRUTUOSO, M.S.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, I.C.B.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; POMPEU, M.M.L. Leishmaniose felina experimental. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 13, p. 237, 2004b.

- SIMÕES-MATTOS, L. Estudo da infecção natural por *Leishmania ch agasi* pela técnica de ELISA em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Fortaleza, Ceará. (Monografia). Escola de Saúde Pública do Ceará. 56p., 2002.
- SIMÕES-MATTOS, L. Leishmaniose em gatos domésticos: é bom manter-se informado! Revista Todos os Gatos. n. 8, p. 22-23, 2005.
- SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; POMPEU, M.M.L. Feline leishmaniasis: uncommon or unknown? Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 99, p. 79-87, 2004a.
- SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; RODRIGUES, T.P.; PRATA-JÚNIOR, J.R.C.; TEIXEIRA, M.J.; SILVA, T.F.P.; HOLANDA C.M.; PEREIRA, B.S.; LOPES, C.A.P.; POMPEU, M.M.L. Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza (Ceará, Brazil). Ciência Animal. v.11, p. 79-81, 2001a.
- SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; HOLANDA, C.M.; PRATA-JR, J.R.C.; RODRIGUES, T.P.; BASTOS, K.M.S.; LIMA, J.W.O.; POMPEU, M.M.L.; COÊLHO, I.C.B. Experimental American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in domestic cats (*Felis catus*). Ciência Animal. v. 11, p. 194, 2001b.
- SIMÕES-MATTOS, L., MATTOS, M.R.F., TEIXEIRA, M.J., HOLANDA, C.M., PRATA-JR., J.R.C., RODRIGUES, T.P., LIMA, J.W.O., POMPEU, M.M.L., COÊLHO, I.C.B. Cutaneous Manifestations in Domestic Cats (*Felis Catus*) Experimentally Infected by *Leishmania braziliensis*. In: Anais do II CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA (CD-Row). Rio de Janeiro: Microservice Microfilmagens e Reproduções Técnicas Ltda. 2001c.
- SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; BEVILAQUA, C.M.L.; PRATA-JR., J.R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.; BASTOS, K.M.S.; COÊLHO, Z.C.B.; COÊLHO, I.C.B.; BARRAL, A.; POMPEU, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. v. 127, p. 199-208, 2005.
- SIMÕES-MATTOS, L.; SILVA, F.M.O.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO, C.L.B.; DE SOUSA, R.N.; COÊLHO,

- I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; LIMA, J.W.O. Gatos domésticos como reservatórios de *Leishmania braziliensis*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 13, supl. 1, p. 237, 2004b.
- SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M. J., COSTA, D. C., PRATA-JR., J. R.C. ; BEVILAQUA, C.M.L., SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). Veterinary Parasitology. v. 103, p. 207-216, 2002.
- SINAGRA, A.; RIARTE, A.; LUNA, C.; CAMPANINI, A.; SEGURA, E.L. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 57, p. 115-118, 1997.
- SOUSA, A.Q.; PARISE, M.E.; POMPEU, M.M.L.; VASCONCELOS, I.A.B.; COELHO FILHO, J.M.; OLIVEIRA, E.G.; VASCONCELOS, A.W.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Bubonic Leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 53, p. 380-385, 1995.
- TASWELL, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. III. Validity tests for the single-hit Poisson model. Journal of Immunological Methods. v. 72, p. 29-40, 1986.
- TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Risk factors for human disease emergence. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Science. v. 356, p. 983-989, 2001.
- TITUS, R.G.; CEREDIG, R.; CEROTTINI, J.C.; LOUIS, J.A. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. Journal of Immunology. v. 135, p. 2108-2114, 1985.
- TOLEDO, L.M. O espaço do cólera: determinantes sociais e regulação ambiental dos caminhos de uma epidemia. (Tese). Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1996.
- VALIM, C. Transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Ceará. Características da transmissão em diferentes formações paisagísticas com

- particular referência ao local de transmissão para o homem. (Dissertação). Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1993.
- VARTON E.N.; ROBERTS, L.; INOC, W.E. Cutaneous histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome - A case report of three cases from Trinidad. *Tropical Geographic Medicine*. v. 40, p. 153-57, 1988.
- VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C.O.; SALES, C.C.; MAGALHÃES, A.V. Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania Leishmania braziliensis*, Bahia, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 81, p. 237-238, 1986.
- WALLI, J.P.; AGGARWAL, P.; GUPTA, U.; SALUJA, S.; SINGH, S. Ketoconazole in treatment of visceral leishmaniasis. *Lancet*. v. 336, p. 810-811, 1990.
- WEIGLE, K.A.; de DAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAIVA, N.G.; D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 36, p. 489-496, 1987.
- WENYON, C.M. A further note of a case of dermal leishmaniasis from South America with the results of inoculation experiments. *Journal of the London School of Tropical Medicine*, v. 2, p. 117-119, 1913.
- WILSON, H.R.; DIECKMANN, B.S.; CHILDS, G.E. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Experimental Parasitology*. v. 47, p. 270-283, 1979.
- WOLF, A.M. Fungal disease of the nasal cavity of the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. v. 22, p. 1119-1132, 1992.
- WOODS, J.P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment, review. *Fungal Genetics and Biology*. v. 35, p. 81-97, 2002.
- YOSHIDA, E.L.A.; MARQUES, S.A.; STOF, H.O.; BARSOTTI, L.A.; BUÊNO, M.M.F.; SOGA YAR, R. Infecção natural de *Equus caballus* por *Leishmania* sp – São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 30, p. 79-80, 1988.

ANEXOS

Anexo I

Artigo 1

Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown?

Situação: publicado na Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias

v. 99, n. 550, p. 79-87, 2004

Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown?

Leishmaniose Felina: rara ou desconhecida?

Lucilene Simões-Mattos*^{1,a} Claudia Maria Leal Bevilaqua^{1,a}, Marcos Renato Franzosi Mattos^{1,b},
Margarida Maria de Lima Pompeu²

¹ Faculdade de Veterinária (FAVET), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil. ² Núcleo de Medicina Tropical (NMT) - Faculdade de Medicina (FM) - Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil

Summary: Although feline leishmaniasis (FL) is considered to be a rare occurrence, in the past few years there has been an increase in the number of cases reported around the world. Current advances in diagnostic techniques as well as greater pet care, mainly in developed countries, have probably led to the larger number of cases reported. Nonetheless, FL is still poorly studied in terms of several aspects such as prevalence, clinical manifestations, parasite transmission to the vector, and protozoan species involved. In addition, there is little information about the real susceptibility and importance of cats in the transmission of *Leishmania* spp. All of these factors may contribute to the idea that FL is uncommon. Thus, the objective of the present study was to discuss the infection of domestic cats with *Leishmania* spp by reviewing case reports and epidemiological investigations, as well as experimental infection, and the attraction and host-feeding preference of some phlebotomines for cats.

Keywords: *Leishmania*, Leishmaniasis, Leishmaniosis, cat, phlebotomine sand flies, epidemiology, serology, parasitology, experimental infection

Resumo: Apesar da Leishmaniose Felina (LF) ser considerada de rara ocorrência, nos últimos anos, houve um aumento no número de casos relatados em todo o mundo. Atualmente, o avanço nas técnicas de diagnóstico bem como a maior preocupação com a saúde dos animais de companhia, principalmente em países desenvolvidos, devem ter favorecido este aumento. No entanto, a LF é ainda pouco estudada em vários aspectos tais como prevalência, manifestações clínicas, transmissão do parasita ao vetor e espécies dos protozoários envolvidos. Além disso, há pouca informação sobre a real suscetibilidade e importância dos gatos na transmissão de *Leishmania* spp. Todos estes fortes factores podem levar a acreditar que a LF não seja comum. Assim, a presente revisão tem por objetivo discorrer sobre a infecção de gatos domésticos por *Leishmania* spp, incluindo relatos de casos clínicos e inquéritos epidemiológicos, bem como infecção experimental, e atratividade e preferência alimentar de alguns flebotomíneos com relação aos gatos.

Palavras-chave: *Leishmania*, Leishmaníase, Leishmaniose, gato, flebotomíneo, epidemiologia, serologia, parasitologia, infecção experimental

Introduction

Leishmaniasis are a group of diseases of great impact on public health which are endemic in 88 countries around the world (WHO, 2004). They are caused by several species of *Leishmania* protozoa and transmitted to humans and animals by the bite of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). In human beings, the clinical disease can occur in the visceral, cutaneous and mucosal forms. Several mammals are implicated as host reservoirs of the protozoa in the *Leishmania* spp cycle, including wild and domestic animals. Among domestic animals, dogs are involved in the domestic transmission to human beings, mainly in cases of visceral leishmaniasis by *L. chagasi* infection (sin. *L. infantum* – Mauricio *et al.*, 1999). However, due to the marked urbanization of the leishmaniasis (Franke, 1999; Desjeux, 2002), together with the fact that canine leishmaniasis can be significantly controlled with deltamethrin collars (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; David *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002; Maroli *et al.*, 2002; Oliveira-Lima *et al.*, 2002a; Oliveira-Lima *et al.*, 2002b), other domestic species may become infected and sick, and may even be included in the epidemiology of the disease in endemic foci (Killick-Kendrick, 2002; Pennisi, 2002; Simões-Mattos, 2002).

In a historical context, the leishmaniasis have been extensively investigated since the beginning of 20th century. At that time, the role of some host mammals as *Leishmania* reservoirs was poorly known. When the first cases of feline leishmaniasis (FL) were reported, among other animal species, some researchers speculated that domestic cats (*Felis catus*) might play a role in the epidemiology of the leishmaniasis. Thus,

*Corresponding author: Universidade Estadual do Ceará
- Faculdade de Veterinária – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Av. Paranjana, 1700 – Fortaleza – Ceará – Brazil - CEP 60.740-000. Tel.: +55-85-299-2760. Fax: +55-85-299-2740. E-mail address: lsmattos@yahoo.com

^aCNPq fellowship

^bFUNCAP fellowship

epidemiological investigations (Sergeant *et al.*, 1912; Gimeno Ondovilla, 1933; Giordano, 1933; Chagas *et al.*, 1938) and experimental reproduction of the disease (Laveran, 1913; Nicole and Blaizot, 1912 cited by Marchal, 1993; Giordano, 1933; Mello, 1940) were carried out in cats. However, uncertain findings led investigators to rule out this hypothesis and the studies were abandoned. Nonetheless, by the end of the 20th century, the larger number of FL cases diagnosed, mainly by molecular biology techniques, as well as the improved knowledge concerning the host/parasite/vector relationship, led some researchers to speculate again about the role of cats as *Leishmania*-reservoir hosts in endemic foci (Johnson *et al.*, 1993; Pennisi, 2002; Simões-Mattos, 2002). However, the studies are still few and insufficient and this and other questions have not been elucidated. On the other hand, FL is a real fact and we speculate that it is still under-diagnosed.

Although *Leishmania* infection has been already detected in wild felids (Hoogstral and Dietlein, 1964; Morsy *et al.*, 1999), the aim of this review was to consider only the infection of domestic cats (*Felis catus*), and to discuss the case reports and epidemiological investigations, as well as the experimental infection, the feeding preference and engorgement rate of some phlebotomine sand flies for feline species.

***Leishmania* spp infection in domestic cats**

Clinical case reports

Clinical cases were considered to be cats who exhibited to a greater or lesser extent some signs of systemic or cutaneous manifestations of different diseases. In most of these cases, the cats' owners sought professional care to obtain a conclusive diagnosis of the disease that affected their animals and *Leishmania* protozoa were demonstrated by different techniques. In this respect, up to now, it seems that 28 clinical cases of FL have been reported around the world (Figure 1). Eleven of them (39.3%) occurred in the New World, and 17 (60.7%) in the Old World. Among the cases detected in the New World, ten were diagnosed in South America.

In 1927, Salvador Mazza (Brumpt, 1949) reported in Argentina what was probably the first clinical case in the world of a cat infected with *L. braziliensis* that showed an ulcer in the orbital region. In Venezuela, Bonfante-Garrido *et al.* (1991, 1996) isolated *L. (L.) venezuelensis* from large nose and ear nodules of four cats. Still in South America, five clinical cases were reported in Brazil. The first report mentioned a cat with cutaneous ulcerations in the ears and nose without identification of *Leishmania* species (Mello, 1940). The second one occurred in a queen infected with *Leishmania (Viannia)* sp that presented a vegetative lesion in the pelvic limb (Passos *et al.*, 1996). Savani *et al.* (2002) recorded the third case of a cat with a nodular lesion in the nose whose scratches were

found to be positive for *Leishmania* organisms. On the other hand, culture medium was negative for spleen and liver samples. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of spleen material permitted to conclude that this was a *L.(L.) infantum chagasi* infection (Savani *et al.*, 2004). To our knowledge, still in Brazil, Schubach *et al.* (2004) reported the two most recent clinical cases of FL in the world. Both cats lived with two dogs and one man with cutaneous leishmaniasis. The first case, a queen, showed a cutaneous ulcer on the nose that had been present for six months and two additional small ulcers on the face. The other case, another female cat, had been showing a papule on the nose and a vegetative lesion on the nasal mucosa for the last three months. A *Leishmania* diagnosis by histopathology and culture was positive, and the protozoa were characterized by isoenzyme electrophoresis as *L. (V.) braziliensis*.

Only one North American FL case was diagnosed in the state of Texas (Craig *et al.*, 1986). Interestingly, the animal was evaluated by Barnes *et al.* (1993) for seven years. This cat had several nodules on the ear with aspirates showing protozoa morphologically compatible with *L. mexicana*, and later characterized by isoenzyme analysis. After radical pinnectomy, the animal had lesion recurrence in both the pinnectomized ear and in the nose. A survey for feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) and a skin test (i.e. Montenegro test) for *Leishmania* were negative. The cat was euthanatized when it was 13 years old due to a mediastinal lymphoblastic lymphosarcoma. Histological examination of tissues did not reveal *Leishmania* dissemination to the viscera.

Of 17 FL cases reported in the Old World, three were diagnosed in Asia, two in Africa and twelve in Europe. In Asia, the first case occurred in Vietnam in a cat that showed an ulcer on the thorax (Bergeon, 1927). Later, in Iraq, culture material and smears from papules, nodules and ulcers on the nose and ears of two cats revealed organisms morphologically compatible with *L. tropica* (Machattie *et al.*, 1931).

In Africa, at the end of the 1940 decade, microscopic examination of material collected from lip and ear ulcers confirmed a case of FL in Algeria (Bosselut, 1948). Another one occurred on Reunion Island in 1976. This cat had only swelling of lymph nodes whose aspirates showed protozoal organisms (Denuzière, 1977).

Europe has the largest number of clinical cases of FL reported in the world. The first European case occurred in Switzerland in 1977 in an animal that presented cutaneous lesions all over its body (Schawalder, 1977). Nonetheless, according to author, the infection supposedly had occurred in Spain. France has three cases recorded. The first had developed over a period of five months and was characterized by pruriginous erythema and pustules on the elbow, skull and lumbar area. Later, the cat showed weight loss and emesis when it was euthanatized. The first clinical suspicion was eosinophilic granuloma, but *Leishmania* infection was confirmed by



Figure 1 - Worldwide distribution of feline leishmaniasis reported from 1927 to 2004.

microscopy (Dunan *et al.*, 1989). In the second case, an old queen showed crusty and pruriginous dermatitis, diffuse alopecia in the ears and ulcerative periocular lesions, in addition to a nodule on the nose. FIV and FeLV surveys were negative, but serology and parasitology tests on smears and culture medium as well as the PCR applied to bone marrow were positive for *Leishmania* infection (Laruelle-Magalon and Toga, 1996). The most recent French case occurred in a cat that showed lesions throughout the body, alopecia, seborrheic-ulcer-crusty dermatitis and evident emaciation. FIV, FeLV and feline infectious peritonitis (FIP) exams showed negative results. The FL diagnosis was confirmed by histology of a cutaneous biopsy, smears from bone marrow aspirates, direct agglutination, and Western Blot. The protozoa were characterized as *L. infantum* by electrophoresis technique (Ozon *et al.*, 1998).

Only one FL case has been reported in Portugal, involving a queen with a cutaneous nodule in the orbital area. A clinical picture of asymmetric and non-pruriginous alopecia was reported before the emergence of this lesion. Histopathological findings of the extirpated nodule confirmed *Leishmania* infection, and lesion recurrence was observed above the other eye (Costa Durão *et al.*, 1994).

In Spain, one case of feline visceral leishmaniasis (VL) and one case of cutaneous leishmaniasis (CL) were diagnosed by Hervás *et al.* (1999). The visceral form affected a queen with severe jaundice and emesis which died after hospitalization. Post-mortem examination revealed enlargement of spleen and liver. Classic histology and electron microscopy showed *Leishmania* spp forms in the liver, spleen, stomach and large intestine. The second form occurred in another queen with a history of abortions and recurrent alopecia of the abdomen and head, together with ulcerations of bone protrusions and enlargement of popliteal lymph nodes. Aspirates from these lymph nodes as well as indirect

fluorescent antibody test (IFAT) were found to be positive for *Leishmania* infection. Nonetheless, FIV and FeLV showed negative results.

Italy recorded five cases of European FL. The first two cases occurred in a male cat and a female cat. The former showed a small crusty ulcer on the nose and a cystic lesion in the parietal region. Serological assays for FeLV and coronavirus were negative, in contrast to FIV and *Leishmania*. Protozoal amastigotes were seen on smears from both lesions. Seven months before the diagnosis of leishmaniasis, the adult male had presented bleeding lesions on the neck, cachexia and generalized alopecia. Later, it showed submandibular lymphadenia and diarrhea. FIV, FeLV and coronavirus tests showed negative results, but anti-*Leishmania* antibodies were positive. *Leishmania* were detected by microscopy, culture and PCR of aspirates of submandibular lymph nodes (Pennisi, 1999; Pennisi, 2002). Two more cases of FL reported by Pennisi (2002) occurred in a male cat and a female cat. The physical examination of the male cat with abscesses due to fight with other cats showed also popliteal lymphadenopathy. Survey for anti-FIV and anti-*Leishmania* antibodies, as well as PCR of blood and lymph node, showed positive results. Three years later, this cat showed a small bloody cyst on the edge of the ear, and the popliteal lymph nodes were still enlarged. *Leishmania* amastigotes were observed in smears from aspirates of the cyst and the lymph node. In addition, the isolation of the protozoa in culture medium was obtained only from the lymph node, but PCR carried out on blood, lymph node and lesion was positive. The other case occurred in a female cat who had no skin lesions but showed nonspecific signs of leishmaniasis such as anorexia, weight loss, depression, ocular complications, generalized lymphadenopathy and hepatomegaly. Positive titers were found for FIV, *Toxoplasma* and *Leishmania*. In addition, cytology and culture medium of the mate-

rial isolated from lymph nodes permitted the visualization of *Leishmania* organisms. In these four FL cases, the *Leishmania* species was not identified. Finally, the fifth Italian case was of an animal with an ulcerated nodule on the eyelid as well as a history of lethargy. In addition, the cat showed weight loss, dysorexia, severe ulcerative stomatitis, lymphadenopathy, and spleen enlargement. Serological assays for FIV, FeLV and *Leishmania* were positive. Smears of material from lesions and lymph nodes raised the suspicion of *Leishmania* infection. Electron microscopy, immunohistochemistry and culture revealed the presence of *Leishmania* organisms. Finally, PCR allowed the identification of the protozoa as *L. infantum* (Poli *et al.*, 2002).

Of all countries that presented FL cases, Vietnam and Reunion Island were the only two exceptions of endemic regions for leishmaniasis. Thus, the feline leishmaniasis reported in these two countries were probably not autochthonous.

In summary, of 28 clinical cases of FL, 92.8% exhibited cutaneous manifestations which were the only sign in 57.7% of them. On the other hand, a 17.4% rate of lymphadenopathy and a 4.3% rate of visceromegaly were cited in association with the cutaneous manifestations. In addition, very few cases presented lymphadenopathy (7.7%) and visceromegaly (3.8%) as the single disease manifestation. Interestingly, cutaneous manifestations were observed in most cases of infection with the viscerotropic *Leishmania* strain.

Concerning to the type of cutaneous lesions, nodules and ulcers were predominant (Figure 2). These lesion types reported in FL cases are similar to those occurring in human and canine leishmaniasis. In addition, the head, and the nose in particular, was the most affected area in the body (Figure 3). This affected region seems to be coherent with the ability of phlebotomines to bite areas with little hair.

Several diagnostic techniques, alone or in combination, have been applied for *Leishmania* spp surveys in clinical FL cases. The presence of amastigotes, by cytology and/or histology, was assayed in 82% of all clinical cases, with 95.6% of positivity. On the other hand, culture medium was cited in 71.43% of cases, with successful promastigote isolation in 85% of the attempts. The infrequent use of culture medium may be due to its unavailability in veterinary clinical practice. Among the diagnostic techniques cited, aspirate cytology seemed to be the best and the most frequently used method, probably because of its easy execution and low cost. Survey of *Leishmania*-specific antibodies was carried out in only nine ill cats and the method most frequently used was IFAT, which showed positive titers in all cases. In addition, *Leishmania* and FIV/FeLV co-infection was evaluated in eleven animals and was found to be present in one FIV/FeLV+ cat and three FIV+ cats. In some cases, the researchers also surveyed the *Leishmania* co-infection with other agents; however we emphasize FIV and FeLV because

of their considerable deleterious implications on host immunity.

Since the FL report by Barnes *et al.* (1993), isoenzymes, electrophoresis, indirect radioimmune assay (RIA) and PCR have been performed to identify *Leishmania* organisms. Thus, in 15 of 28 clinical cases for which molecular biology techniques were used for *Leishmania* identification, it was possible to obtain species classification in 11 (73.3%), subgenus classification in one (6.7%), and genus classification in three (20%) cases. These techniques allowed to diagnose in the New World one cat infected with *L. chagasi*, four with *L. venezuelensis*, one with *L. mexicana*, two with *L. braziliensis* and another with the subgenus *Viannia*. In the Old World, three cats were classified as being infected with *L. infantum* and three with *Leishmania* sp. The remaining FL cases were diagnosed by conventional methods, and the classification attributed to *Leishmania* species may be due to epidemiological findings and geographical localization.

Parasitological and serological epidemic investigations

Parasitological and serological investigations have been conducted after the emergence of some clinical cases of FL, or even in endemic regions for leishmaniasis. Thus, to our knowledge, since 1912, twenty-four epidemiological investigations were carried out in the Old World and the New World, and *Leishmania* parasites and specific-*Leishmania* antibody surveys were conducted using several techniques (Tables 1 and 2).

Of all epidemiological investigations, those carried out by Pennisi *et al.* (1998 and 2000) are particularly important not only because of the techniques employed, but also because of the nature of the findings. In these studies it was possible to establish a correlation between PCR and IFAT, as well as between *Leishmania* and FIV co-infection. Although there was no significant difference between the two diagnostic methods, FIV infection had a significant positive influence on anti-*Leishmania* antibodies.

In all epidemiological studies, none of the animals that harbored *Leishmania* parasites showed any sign or symptom suggestive of leishmaniasis. Similarly, among cats with positive serology only two (0.95%) were sick. The parasite rates (5.5%) and the serological (16.6%) surveys lead us to ask which role these infected cats may play in the transmission of disease in endemic areas. Since they were infected but showed no sign or symptom of leishmaniasis, they may represent the condition of a healthy carrier, or of a healed case or they may still become ill. To test this assumption, in a study involving experimental infection of cats with *L. braziliensis*, we observed that anti-*Leishmania* antibody titers appeared later than lesions, showing that serology was not a good marker of clinical disease (Simões-Mattos *et al.*, in press).

Table 1 - Epidemiological investigation of domestic cats by parasitological methods in different countries from 1912 to 2000.

Country	Technique/source	Positive/examined (%)	Reference
Algeria	Undefined/bone marrow	1/1 (100)	Sergent <i>et al.</i> (1912)
Brazil	Cytology/liver	1/202 (0.5)	Chagas <i>et al.</i> (1938)
	Cytology/liver	0/142 (0.0)	Deane (1956)
	Cytology/liver	0/214 (0.0)	Alencar <i>et al.</i> (1955)
	Cytology*/ear	1/53 (1.9)	Sherlock (1996)
Italy	Cytology and histology/spleen, liver and bone marrow	0/120 (0.0)	Giordano (1933)
	PCR*/blood	54/89 (60.6)	Pennisi <i>et al.</i> (2000)
Jordan	Cytology/spleen and liver	16/78 (20.5)	Morsy <i>et al.</i> (1980)
Spain	Undefined/undefined	1/495 (0.2)	Gimeno Ondovilla (1933)
Total		74/1394 (5.3)	

* associated with IFAT.

Table 2 - Epidemiological investigation of domestic cats by serological methods in different countries from 1982 to 2002.

Country	Technique	Positive/examined (%)	Reference
Brazil	IFAT	0/53 (0.0)	Sherlock (1996)
	ELISA	9/84 (10.7)	Simões-Mattos <i>et al.</i> (2001a)
	ELISA	43/106 (40.5)	Simões-Mattos (2002)
	IFAT	45/89 (50.5)	Oliveira (2002)
Egypt	IHA	3/80 (3.7)	Michael <i>et al.</i> (1982)
	IHA	1/28 (3.6)	Morsy <i>et al.</i> (1988)
	IHA	2/60 (3.3)	Morsy and Aboul el Seoud (1994)
France	IFAT	1/174 (0.6)	Bez (1992)
	WB	14/110 (12.7)	Marechal (1993)
	WB	12/97 (12.4)	Ozon <i>et al.</i> (1999)
Italy	IFAT	55/93 (59.1)	Pennisi <i>et al.</i> (1998)
	IFAT	1/110 (0.9)	Poli <i>et al.</i> (2002)
Spain	DAT	21/50 (42.0)	Ramos <i>et al.</i> (2002)
	ELISA	2*/117 (1.7)	Portús <i>et al.</i> (2002)
USA	DAT	1/10 (10.0)	Mac Vean cited by Kirkpatrick <i>et al.</i> (1984)
Total		210/1261 (16.6)	

IHA= indirect hemagglutination assay; DAT= direct agglutination test; IFAT= indirect fluorescent antibody test; WB=western blot; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay. * Low antibody titers.

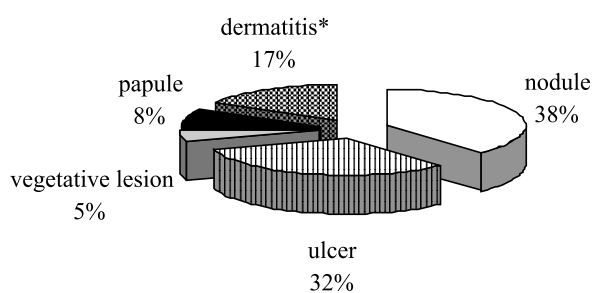


Figure 2 - Frequency of lesion type in case reports of feline leishmaniasis from 1927 to 2004. *Dry or humid, pruriginous or non-pruriginous, cluster, alopecic, erythematous and/or pustular.

Experimental infection of domestic cats with *Leishmania* spp

In an attempt to explain the occurrence of natural cases of FL, some investigators have evaluated the susceptibility of cats experimentally infected with *Leishmania* spp. Different routes and undetermined amount of inoculum were used in the first studies. Hepatic pulp from a dog with VL (Laveran, 1913), a culture of *L. infantum* (Nicolle and Blaizot, 1912 cited by Mare-

chal, 1993), material from the spleen of a child with VL (Giordano, 1933), material from ulcers of cat with natural FL (Mello, 1940), and a visceral emulsion from a dog with VL (Deane, 1958) were inoculated in cats without successful reproduction of the disease.

In 1984, Kirkpatrick *et al.* established an infection protocol with *L. donovani* and *L. chagasi* for cats. *Leishmania* organisms were detected at different times in blood, liver, spleen and bone marrow up to the 16th week post-infection (w.p.i.). In Brazil, Barbosa-Santos *et al.* (1988) inoculated 10^6 *L. braziliensis* promastigotes on the nose of cats, half of which had been previously injected intraperitoneally with 10^3 antigens of the same *Leishmania* species. Without apparent lesion in either group, a new challenge with 10^6 *L. amazonensis* promastigotes was performed at the same site of infection. *Leishmania* isolation in culture medium was obtained from the lesions of animals that had not been injected with *L. braziliensis* antigens by the intraperitoneal route. On the other hand, dissemination and visceralization were not observed. Nonetheless, the protocol used by Anjili and Githure (1993) with 10^6 promastigotes of *L. donovani* did not lead to the detection of parasites over a period of six months.

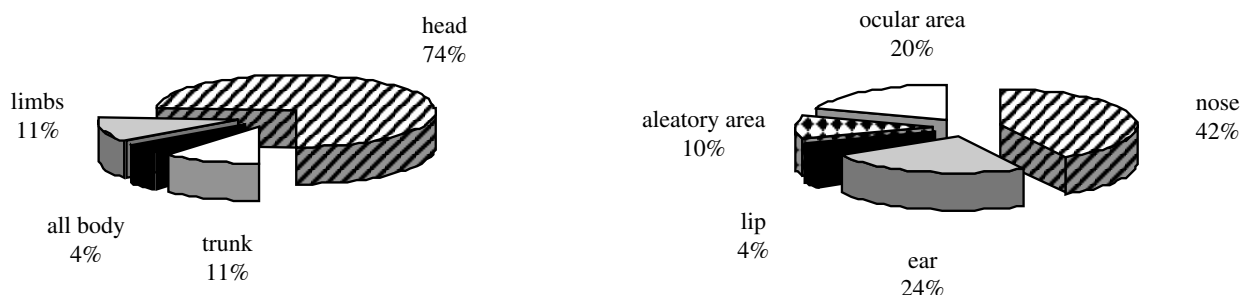


Figure 3 - Frequency of localization of the cutaneous lesions for the body (left), and specifically in the head (right) in cases report of feline leishmaniasis from 1927 to 2004.

As previously mentioned, we carried out an experimental infection with 10^7 promastigotes of *L. braziliensis* simultaneously inoculated on the ear and nose of cats and followed up the animals for two years and three months. The animals showed lesions similar to those observed in human beings with cutaneous leishmaniasis, which fully regressed by about 32 and 40 weeks post-infection in the ear and nose, respectively (Simões-Mattos *et al.*, 2001b). Concerning the immune response, antibody titers formation occurred later than lesion formation, and even after self-healing some cats still remained serologically positive at the end of the study. Thus, we concluded that domestic cats were partially susceptible to experimental infection with *L. braziliensis*, showing chronic clinical manifestations, anti-*Leishmania* antibody titers, lesions harboring parasites, and spontaneous healing of the lesions (Simões-Mattos *et al.*, in press).

Attractiveness/host feeding preference and engorgement rate of phlebotomine sand flies

In view of the occurrence of FL, cats seem to be attractive for some phlebotomines species. However, there are still few experimental studies on the attractiveness or host feeding preference and engorgement rate of different phlebotomines in which cats were included.

In Brazil, Deane (1956) studied the attractiveness of several animal species for *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *L. chagasi*-agent of VL, and observed that the cat was the only mammalian species not used by phlebotomines as a blood meal source. Nonetheless, the author commented that he had seen a sandfly feeding on a cat inside the house. On the other hand, in Kenya, *Phlebotomus guggisbergi* was much more attracted by cats than by dogs (Johnson *et al.*, 1993).

Supporting Deane's findings (1956), more recently Dias *et al.* (2003) also evaluated the cat among other domestic and wild animals as blood meal sources for same phlebotomine. In the cited study, the use of the precipitin test applied to the gut of *L. longipalpis* also led to the conclusion that this sand fly had not fed on cats. In Egypt, El Sawaf *et al.* (1989) studied by immunoelectrophoresis blood meals from *P. papatasi* and *P. langeroni* collected indoors and outdoors. Both phle-

botomines fed predominantly more on humans than on dogs, cats or rats. On the other hand, similar studies were carried out in Peru using bloodmeal analysis by precipitin in *L. verrucarum* and *L. peruensis* sandflies (Ogosuku *et al.*, 1994). The findings of this study are quite interesting, mainly regarding the mixed bloods detected in these sandflies both when collected indoors and outdoors, which showed that they had fed on at least two different hosts. In indoor collections, the most common multiple feeding involved human and cat blood detected in *L. verrucarum*. Although for the sandflies collected outdoors cows and cats were the most frequent sources of the same phlebotomine, cat blood was the most frequent for *L. peruensis* (Ogosuku *et al.*, 1994). Colmenares *et al.* (1995) tested host-feeding patterns of *P. perniciosus* by the competitive ELISA biotin/avidin method at four sites in Spain. At least in Barcelona, the blood meals of these phlebotomines were found to originate from dogs (33%), humans (25%), cats (25%) and mice (17%).

Some studies have determined the rate of engorgement of female sandflies after contact only with cats. In the Mediterranean, Sánchez *et al.* (2000) exposed one cat to the bite of *P. perniciosus*, and observed a 93% rate of engorged females of these sandflies. In a similar study using *L. migonei*, one of the main vectors of *L. braziliensis* protozoa in Brazil, we detected a 90% rate of engorged female sandflies after contact with a cat in a cage (unpublished data).

Final considerations

Even though FL is considered to be a rare occurrence, cases have been reported in America, Europe, Asia and Africa, and more frequently since the 90's. This may be due in part to the boom of this disease in the past few years, to the advances of diagnostic techniques, to the increased breeding of cats, mainly in developed countries, and/or partly to the greater health care devoted to pets. However, in spite of the increased numbers of FL cases, we believe that they are still under-diagnosed possibly because of the difficulties in clinically distinguishing leishmaniasis from other diseases that affect cats. In addition, veterinarians may be unaware that cats can be infected with *Leishmania* spp and can develop leishmaniasis. Furthermore, cats are

less frequent visitors than dogs to veterinary clinics, at least in developing countries where leishmaniasis are common. Also, the clinical manifestations of FL are still unclear, so that the disease may be easily confused with neoplasms and mainly with infectious diseases caused by viruses, bacteria, protozoa and fungi. Fungal infections are the most dangerous, mainly in cases of histoplasmosis, sporotrichosis and cryptococcosis. It is important to keep in mind that when a clinical diagnosis of fungal infection rather than of *Leishmania* infection is made, treatment with antifungal drugs may result in temporary healing, since these drugs have some effect against *Leishmania* spp. All of these factors contribute to the lack of FL diagnoses, falsely leading to the belief that FL is uncommon. Thus, laboratory techniques may help prevent misdiagnosis, mainly in endemic areas for leishmaniasis.

In summary, it is clear that domestic cats are truly infected with several *Leishmania* species, that they may or may not become ill, that they harbor the protozoa and that they are also attractive as a blood meal source to some phlebotomines. Thus, from an epidemiological point of view, it is important to elucidate several questions. Are the cats occasionally infected or are they reservoir hosts of these protozoa? Are they frequently healthy carriers of *Leishmania* spp and potential transmitters of protozoa to the vectors? Does FIV and/or FeLV co-infection promote FL? The answers to these questions will permit us to understand the consequences of this disease for feline health and to determine the risk factors of human populations exposed to cats infected with *Leishmania* spp.

Acknowledgements

The studies concerning Feline Leishmaniasis accomplished by our group are supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP (Process number 419/02) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência – PRONEX/CNPq. We wish to thank CNPq and FUNCAP for fellowships. We are also indebted to Dr. T.J. Naucke, Institute for Medical Parasitology, University of Bonn, Germany, for his generous cooperation with this review. Thanks are extended to Dr. M.G. Pennisi, Department of Medicine and Veterinary Pharmacology, Messina, Italy. In addition, we would like to dedicate this review to all researchers, especially those who began the studies about leishmaniasis in Brazil and left their invaluable works to us: Drs. Evandro Chagas, Leônidas Deane, Maria Paugartem Deane and Joaquim Eduardo de Alencar.

References

Alencar, J.E., Holanda, D. and Cavalcante, J.D.N. (1955). Calazar no Vale Jaguaribe, Ceará, 1955. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 8, 33-47.

- Anjili, C.O. and Githure, J.I. (1993). Refractoriness of domestic cats to infection with a Kenyan strain of *Leishmania donovani*. *East African Medical Journal*, 70, 322.
- Barbosa-Santos, E.G.O., Marzochi, M.C.A., Conceição, N.F., Silva, P.C.T. and Silva, V.L. (1988). Vaccination and experimental infection of cats (*Felis domesticus*) with *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83, 159.
- Barnes, J.C., Stanley, O. and Craig, T.M. (1993). Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 202, 416-418.
- Bergeon, M.P. (1927). Un cas de leishmaniose chez le chat. *Bulletin de la Société Veterinaire de Lyon*, 30, 92-93.
- Bez, M. (1992). La leishmaniose chez le chat, enquête séro-épidémiologique dans les Alpes-maritimes. Thèse Docteur Vétérinaire ENVL. 46, 110p.
- Bonfante-Garrido, R., Urdaneta, I., Urdaneta, R. and Alvarado, J. (1991). Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 53.
- Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M.T., Garófalo, M.M., Urdaneta, I., Urdaneta, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H. and Grimaldi-Jr., G. (1996). Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Revista Científica*, 6, 187-190.
- Bosselut, H. (1948). Un cas de leishmaniose générale du chat. *Archives de L'Institut Pauster D'Algérie*, 26, 14.
- Brumpt, E. (1949). In: Parasites Animaux, *Précis de Parasitologie*, Editor: E. Brumpt, 6^e édition. Masson et Cie (Boulevard Saint-Germain, Paris, France), 248-256.
- Chagas, E., Ferreira, L.C., Deane, G., Deane, L. and Guimarães, N. (1938). Leishmaniose visceral americana. II. Estudos epidemiológicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 33, 138-206.
- Colmenares, M., Potús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M. and Seguí, G. (1995). Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Biotin/Avidin Method. *Journal of Medical Entomology*, 32, 229-233.
- Costa Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J. and Simões, G. (1994). Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89, 140-144.
- Craig, T.M., Barton, C.L., Mercer, S.H., Droleskey, B.E. and Jones, L.P. (1986). Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35, 1100-1102.
- David, J.R., Stamm, L.M., Bezerra, H.S., de Sousa, R.N., Killick-Kendrick, R. and Oliveira-Lima, J.W. (2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent antifeeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 839-847.
- Davies, C.R., Mazloui, Gavgani, A.S., Hodjati, M.H. and Mohite, H. (2002). Impact of insecticide impregnated dog collars on the incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs and children. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 87-90.
- Deane, L.M. (1956). Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil. 162 p.
- Deane, L.M. (1958). Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 10, 431-450.

- Denuzière, C. (1977). Un chat 'leishmanien'. *La Semaine Vétérinaire*, 32, 1-2.
- Desjeux, P. (2002). Urbanisation of the leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 49-55.
- Dias, F.O.P., Lorosa, E.S. and Rebêlo, J.M.M. (2003). Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública*, 19, 1373-1380.
- Dunan, S., Mary, C., Garbe, L., Breton, Y., Olivon, B., Ferrey, P. and Cabassu, J.P. (1989). A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la region Marseillaise. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7, 17-20.
- El Sawaf, B.M., Mansour, N.S., El Said, S.M., Daba, S., Youssef, F.G., Kenawy, M.A. and Beier, J.C. (1989). Feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodiade) in El Agamy. *Egyptian Journal of Medical Entomology*, 6, 497-498.
- Franke, R.C. (1999). Ecologia da Leishmania. In: 4º Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, Recife (Pernambuco), 1999, 35-38.
- Gimeno Ondovilla, A. (1933). Contribución a la epidemiologia del kala-azar. *Tropical Disease Bulletin*, 30, 752.
- Giordano, A. (1933). Le chat dans la transmission de la leishmaniose viscérale de la méditerranée. *Bulletin Sezione Italiana de la Societe Internazionale de Microbiologie*, 5, 300-332.
- Hervás, J., Chacun-M De Lara, F., Sánchez-Isarria, M.A., Pelliçer, S., Carrasco, L., Castilho, J.A. and Gomez-Villamandos, J.C. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1, 101-105.
- Hoogstraal, H. and Dietlein, D.R. (1964). Leishmaniasis in the Sudan Republic: recent results. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 137-143.
- Johnson, R.N., Ngunbi, P.M., Nwanyumba, J.P. and Roberts, C.R. (1993). Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Medical Veterinary Entomology*, 7, 216-218.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M.P. and Cadiergues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, 11, 105-111.
- Killick-Kendrick, R. (2002). Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 5.
- Kirkpatrick, C.E., Farrell, J.P. and Goldschmidt, M.H. (1984). *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Experimental Parasitology*, 58, 125-131.
- Laruelle-Magalon, C. and Toga, I. (1996). Un cas de leishmaniose féline. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 31, 255-261.
- Laveran, A. (1913). Infections du cobaye, du lapin et du chat par la *Leishmania infantum*. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique*, 6, 110-114.
- Machattie, C., Mills, E.A. and Chadwick, C.R. (1931). Naturally occurring oriental sore of the domestic cat in Iraq. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 25, 103-106.
- Marechal, M. (1993). La leishmaniose féline: cas sporadique ou réalité encore ignorée? (étude dans la région marseillaise). Thèse Docteur Vétérinaire. 87, 68p.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Baldi, L., Oliva, G. and Gradoni, L. (2002). The control of canine leishmaniasis of Scalibor® protectorbands in southern Italy: pilot field studies. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 81-86.
- Mauricio, I.L., Howard, M.K., Stothard, J.R. and Miles, M.A. (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, 119, 237-246.
- Mello, G.B. (1940). Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. *Brasil Médico*, 54, 180.
- Michael, S.A., Morsy, T.A., Abou El-Seoud, S.F. and Saleh, M.S.A. (1982). Leishmaniasis antibodies in stray cats in Ismailiya Governorate Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 12, 283-286.
- Morsy, T.A., Michael, S.A. and El Disi, A.M. (1980). Cats as reservoir hosts of human parasites in Amman, Jordan. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 10, 5-18.
- Morsy, T.A., Michael, S.A., Makhlof, L.M. and El Sibai, M.M. (1988). *Leishmania* infection sought in non human hosts in Suez governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 10, 539-545.
- Morsy, T.A. and Abou El-Seoud, S.M. (1994). Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 24, 199-204.
- Morsy, T.A., Al-Dakhil, M.A. and El-Bahrawy, A.F. (1999). Natural *Leishmania* infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 29, 69-74.
- Ogosuku, E., Pérez, J.E., Paz, L., Nieto, E., Monje, J. and Guerra, H. (1994). Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Annual Tropical Medicine Parasitology*, 88, 329-335.
- Oliveira, A.P. (2002). Inquérito sorológico de *Leishmania* sp em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Guaratiba, município do Rio de Janeiro, Brasil. Monografia. Instituto Municipal de Medicina Veterinária "Jorge Vaitsman". 33p.
- Oliveira-Lima, J.W., David, J.R., Stamm, L.M., Bezerra, H.S., Sousa, R.N. and Killick-Kendrick, R. (2002a). Scalibor protectorbands protect dogs from bites of two species of Neotropical sand flies. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 77-80.
- Oliveira-Lima, J.W., Sousa, R.N., Teixeira, M.J., Pompeu, M.M.L., Killick-Kendrick, R. and David, J.R., (2002b). Preliminary results of a field trial to evaluate the value of deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis in northeast Brazil. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 92-95.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Levièvre, A. and Haas, P. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Veterinary Parasitology*, 75, 273-277.
- Ozon, C., Marty, P., Levièvre, A., Biorgalli, J., Corniglion, A., Giacomo, A., Lamothe, J., Mathieu, F., Pierre, M., Thomazo, F., Villemin, V. and Hass, P. (1999). Le chat reservoir de *Leishmania infantum* dans le sud de la France? In Proceedings of 24th WSAVA Congress, Lyon 23rd-26th September 1999 (CD- Rom).
- Passos, V.M.A., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O. and Degraive, W. (1996). Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91,

- 19-20.
- Pennisi, M.G., Masucci, M. and Catarsini, O. (1998). Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in FIV+ gatti che vivono in zona endemica area. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 52, 265-266.
- Pennisi, M.G. (1999). Case report of *Leishmania* spp. infection in two cats from Aeolian Archipelago (Italy). In: Proceedings of the 24th WSAVA Congress. Lyon 23rd-26th September 1999 (CD-Rom).
- Pennisi, M.G., Maxia, I., Vitale, F., Masucci, M., Borruto, G. and Caracappa, S. (2000). Studio dell'infezione de *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 54, 215-216.
- Pennisi, M.G. (2002). A high prevalence of feline *Leishmaniasis* in southern Italy. *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002, 39-48.
- Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A. and Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 106, 181-191.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R. and Castillejo, S. (2002). Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 62, 72-76.
- Ramos, J.J.Z., Sarasa, I.A., Ochoa, P.G., Hernandez, J.A.C., Salinas, M.J.G. and Amella, M.J.M. (2002). Serological evidence of Leishmaniasis in cats in Aragon, Spain. In: Proceedings of 27 WSAVA. Available on line <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2860&Category=475>.
- Sánchez, M.A., Hervás, H., Chacón, F., Gómez, J.C., Luicentes, J., Castrillo, J., Pérez, R. and Pascual, F. (2000). Evaluación del gato común (*Felis catus domesticus*) como reservorio de la leishmaniose en la cuenca mediterranea. *Pequeños animales*, 24, 46-54.
- Savani, E.S.M.M., Camargo, M.C.G.O., Carvalho, M.R., D'Áudria, S.R.N., Zampieri, R.A. and Floeter-Winter, L.M. (2002). Primeiro caso de leishmaniose felina causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na América. In: Proceedings of Congresso Científico Anual do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 181. Available on line: <http://www.icb.usp.br/resumo/res-epi.html>.
- Savani, E.S.M.M., Camargo, M.C.G.O., Carvalho, M.R., Zmpieri, R.A., Santos, M.G., D'Áudria, S.R.N., Shaw, J.J. and Floeter-Winter, L.M. (2004). The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in domestic cat (*Felis catus*) from Cotia county, São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 120, 229-233.
- Schawaldler, P. (1977). Leishmaniose bei Hund und Katze: autchtone Falle in der Schweiz. *Kleintier-Praxis*, 22, 237-246.
- 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. and Schubach, A.O. (2004). 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*, 98, 165-167.
- Sergent Ed. et Et., Lombard, J. and Quilichini, M. (1912). La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique*, 5, 93-98.
- Sherlock, I.A. (1996). Ecological interactions of visceral *Leishmaniasis* in the State of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91, 671-683.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Rodrigues, T.P., Prata-Júnior, J.R.C., Teixeira, M.J., Silva, T.F.P., Holanda C.M., Pereira, B.S., Lopes, C.A.P. and Pompeu, M.M.L. (2001a). Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza (Ceará, Brazil). *Ciência Animal*, 11, 79-81.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Teixeira, M.J., Holanda, C.M., Prata-Jr., J.R.C., Rodrigues, T.P., Lima, J.W.O., Pompeu, M.M.L. and Coêlho, I.C.B. (2001b). Cutaneous manifestations in domestic cats (*Felis catus*) experimentally infected by *Leishmania braziliensis*. In: Proceedings of the II Congresso Internacional de Medicina Felina (CD-Rom).
- Simões-Mattos, L. (2002). Estudo da infecção natural por *Leishmania chagasi* pela técnica de ELISA em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Fortaleza, Ceará. Monografia. Escola de Saúde Pública do Ceará. 56p.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Teixeira, M.J., Oliveira-Lima, J.W., Bevilaqua, C.M.L., Prata-Jr., J.R.C., Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S., Coêlho, Z.C.B., Coêlho, I.C.B., Barral, A. and Pompeu, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, in press.
- World Health Organization (WHO) (2004). Division of Control of Tropical Disease [on line]. available on line: URL: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>.

Anexo II

Artigo 2

Leishmaniose em gatos domésticos: é bom manter-se informado!

Situação: publicado na revista “Todos os Gatos”

v. 8, p. 22-23, 2005



É bom manter-se informado!

Leishmaniose em gatos domésticos

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas, de grande impacto em saúde pública mundial, causadas por diferentes espécies do protozoário difísico do género *Leishmania*. Como doença de ciclo indirecto, o protozoário é transmitido pela picada de flebotómios (mosquitos que se alimentam de sangue), cujos géneros, *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (commumente conhecidos como "mosquito-palha"), são encontrados respectivamente no Velho e Novo Mundo.

A diversificação das espécies de *Leishmania* é responsável pela forma que a doença manifesta no seu hospedeiro, entre elas, destacamos as Leishmanioses Visceral (LV) e Cutânea (LC). Os cães domésticos, são incriminados como hospedeiros reservatórios dos protozoários *L. infantum* (= *L. chagasi*) para transmissão humana, ocasionando a LV.

Além disso, em locais onde é endémica, a LC humana tem vindo a aumentar, sendo atribuído ao cão também, o papel de hospedeiro reservatório, principalmente em casos de infecção por *L. braziliensis*.

O cão, além de transmitir o protozoário também padece da doença. Com o intuito de evitar a infecção tanto de humanos quanto de canídeos, estudos tem sido voltados para o bloqueio da cadeia de

Apesar de alguns autores considerarem a Leishmaniose uma doença rara em gatos, é um facto que também os afecta. Existem casos de manifestações cutâneas e/ou implicação visceral em gatos, associados a esta doença, que vêm sendo relatados em quase todos os Continentes. É interessante analisar esta hipótese, para evitar que os nossos amigos domésticos apanhem esta doença.

transmissão, tendo como objecto alvo, os mosquitos (flebotómios).

Algumas pesquisas de sucesso têm comprovado a diminuição da soroconversão em ambos hospedeiros com a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina (tipo de insecticida) em cães de áreas endémicas para a enfermidade. Advindo deste promissor controlo, por outro lado, tem sido especulado o possível papel de outros animais como reservatórios de *Leishmania* e/ou mesmo padecendo da enfermidade, uma vez que, ambos, vector e protozoário, precisam de manter as suas sobrevivências nalgum hospedeiro, caso não encontrem mais ambiente propício nos cães.

Os novos hospedeiros

Assim, entre os animais domésticos, o gato tem vindo a despontar como um provável candidato. Essa afirmação baseia-se em recentes relatos de casos clíni-

cos de Leishmaniose felina (LF). Apesar da Leishmaniose em gatos ser considerada rara, existem casos de manifestações cutâneas e/ou implicação visceral, associados a esta doença, relatados na América, Europa, Ásia e África. Os estudos de inquéritos epidemiológicos (sorológicos e parasitológicos) realizados em vários países, têm demonstrado taxas consideráveis de infecção nesta espécie animal.

A LF começou a ser diagnosticada no início do século XX, com casos esporádicos. Desde 1927, quando o primeiro caso clínico de LF foi diagnosticado na Argentina, até os dias de hoje, a literatura mundial tem apenas 30 registos. Destes, 12 (40%) ocorreram no Novo Mundo e 18 (60%) no Velho Mundo. Entre os detectados no Novo Mundo, um foi na América do Norte, e 11 na América do Sul. No Velho Mundo, três foram diagnosticados

na Ásia, dois na África. Na Europa até o momento, a Suíça e Portugal têm um caso cada, Espanha e França com três cada e, Itália, detentora de cinco do total de casos europeus.

O levantamento dos casos de LF permitiu avaliar aspectos importantes como a manifestação da doença em felinos.

Manifestações da doença

Do total de casos clínicos de LF, 86,7% exibiram manifestações cutâneas, sendo que em 50% dos animais foi o único sinal observado. Além disso, foram encontradas taxas de 20% de linfadenopatia e 10% de visceromegalia associadas às manifestações cutâneas. Por outro lado, a linfadenopatia é pouco citada (3,3%) como única manifestação da doença. De forma interessante, as manifestações cutâneas também foram observadas na maioria dos casos de infecção por cepas de *Leishmania* visce-

tropicais. Os nódulos (39,5%) e as úlceras (31,6%) foram as lesões mais predominantes, seguidas por dermatite inespecífica (18,5%) e lesão vegetativa e pápulas, ambas com mesma frequência (5,2%). As manifestações clínicas observadas nos gatos com *Leishmaniose* são similares àquelas que ocorrem em *leishmanioses* humana e canina. Um dado importante é que, a cabeça (75%), e em particular, o nariz (48%), foram as áreas mais afectadas do corpo dos gatos. A orelha (26%) e região ocular (18,6%) despontam em seguida. Para alguns estudiosos, o facto de existirem mais lesões nestas regiões anatómicas deve-se ao facto dos mosquitos picarem melhor em áreas menos pêlos.

Diagnósticos

As técnicas de diagnóstico mais utilizadas para detectar *Leishmaniose* nestes gatos foram citologia e/ou histologia, apresentando considerável percentagem de positividade. O meio de cultura, por sua vez, foi citado em um pouco mais da metade dos casos com sucesso parcial de isolamento de formas promastigotas. Ao contrário do que ocorre com esta técnica, a citologia aspirativa é um diagnóstico viável na prática médica veterinária por ser barato e de fácil execução. As provas de biologia molecular ajudaram a identificar alguns dos protozoários isolados, sendo encontrada, nos gatos doentes, infecção por vários tipos de *Leishmania*.

Estudo da doença

Desde os primeiros relatos de infecção de gatos por *Leishmania*, os estudos epidemiológicos passaram a ser uma ferramenta importante na determinação da infecção natural em gatos, principalmente nos locais onde ocorreram casos da doença. Assim, de 1912 até 2002, estes estudos, realizados através de inquéritos parasitológicos e sorológicos, mostraram que nenhum dos gatos que albergava os protozoários de *Leishmania sp* exibiam algum sinal ou sintoma de leishmaniose, de maneira similar, daqueles com sorologia positiva, apenas dois (1,5%) estavam doentes. Diante disso, as taxas médias obtidas, considerando todos os inquéritos sorológicos (18,2%) e parasitológicos (5,5%), permitem questionar qual o papel de gatos infectados por *Leishmania* na transmissão da doença em áreas endémicas, uma vez que eles são infectados, mas não mostram sinal ou sintoma clínico compatível com a doença. No entanto, os sinais e sintomas de *leishmaniose* em gatos ainda não são bem conhecidos.

Para entender o desenvolvidos da do-

ença nos felinos, os estudos avaliaram a susceptibilidade à infecção experimental. Os primeiros trabalhos não obtiveram sucesso na reprodução da doença manifesta. Em contra partida a infecção e doença em gatos, ocorridas pela inoculação experimental por alguns tipos de *Leishmania*, demonstraram a susceptibilidade da espécie felina. No caso das infecções por *L. braziliensis* pode-se observar que os gatos exibiram lesões similares àquelas observadas em casos clínicos naturais de LC humana e canina. Além disso, tiveram cura clínica espontânea por volta dos 10 meses de infecção. A resposta imune, por sua vez, demonstrou que os títulos de anticorpos ocorrem mais tardiamente à lesão, e mesmo após a auto-cura clínica, alguns poucos animais ainda apresentavam títulos até o final de dois anos de experiência, pelo que podemos suspeitar de persistência do parasita no hospedeiro.

Casos no Brasil

Tendo em vista tanto os casos clínicos de LF quanto as taxas de infecção (sorológicas e parasitológicas), parece evidente que gatos são atractivos para certos mosquitos. Apesar de existirem poucos estudos para conhecer a preferência alimentar de diferentes tipos de mosquitos, algumas pesquisas mostraram provaram haver alguma tendência preferencial dos mosquitos pelos gatos quando comparados a outras espécies animais, e que a taxa de sucção de sangue destes insectos é alta quando expostos ao contacto com este mamífero. Entretanto, o xenodiagnóstico, técnica utilizada para detecção e isolamento de um patógeno usando o seu vector artrópode natural após contacto com um provável hospedeiro, é a forma mais eficaz de comprovar se determinada espécie animal pode ser considerada como reservatório de *Leishmania*. O grupo de pesquisa obteve resultados positivos com o xenodiagnóstico quando encontrou *Lutzomyia migonei* infectado, após ter sugado um gato experimentalmente inoculado com *L. braziliensis*. Assim fica demonstrado que gatos são hospedeiros reservatórios de *L. braziliensis*. Estudos semelhantes devem ser conduzidos com outras espécies de *Leishmania* e seus respectivos vectores naturais, principalmente em países da Europa onde a doença tem alta prevalência.

Alguns pesquisadores europeus suspeitam que a preferência alimentar dos mosquitos estudados estejam, mais provavelmente, relacionada com a disponibilidade de hospedeiros do que com a atractividade particular de cada um deles.

Estar sempre alerta

Os médicos veterinários e proprietários devem estar alertas para a LF, já que o número de gatos está em expansão em todo o mundo. A alta densidade populacional desta espécie animal, de hábitos crepusculares e nocturnos, similares aos mosquitos, associado ao controle da LV canina, são factores que predispoem os gatos à infecção por *Leishmania*. Nalguns países em desenvolvimento, onde esta enfermidade é endémica, os gatos, possuindo ou não proprietários, na grande maioria, não apresentam qualquer controle clínico, sanitário e epidemiológico. A população de felinos de rua e semi-domiciliados é considerada grande, o que não difere tanto de alguns países da Europa. Por isso, a problemática reside no facto não só por ignorar a importância epidemiológica dos gatos domiciliados, como da falta destes dados, principalmente, em relação aos semi-domiciliados e aos de rua. É importante salientar que na maioria destes países, não só os cães, mas principalmente os gatos, não são frequentes em clínicas veterinárias. Além disso, haja vista que exames complementares acarretam maiores custos aos proprietários dos animais. Um outro factor importante é que pelo facto das manifestações clínicas de LF não estarem ainda bem definidas, esta pode ser facilmente confundida com neoplasias e doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos. A confusão com infecção por fungos pode ser considerada a mais problemática. O diagnóstico clínico de infecções fúngicas em vez de *Leishmania*, determina a prescrição de antimicóticos que podem causar cura temporária da *Leishmaniose*, uma vez que algumas destas drogas têm algum efeito contra *Leishmania sp*. Somente as técnicas laboratoriais podem, por enquanto, evitar os enganos nos diagnósticos clínico/terapêutico. Os veterinários acreditam que a infecção por *Leishmania*, com ou sem sintomas clínicos, deve estar a ser sub-diagnosticada nos países onde a enfermidade é endémica. Isso justificaria a discrepância verificada entre as altas taxas de infecção obtida nos estudos epidemiológicos e o baixo número de casos clínicos relatados em todo mundo.



Lucilene Simões-Mattos
Médica-Veterinária. Especialista em
Vigilância Ambiental em Saúde. Mestre e
doutoranda em Ciências Veterinárias (PPGCV/
UECE/Brasil). Especialidade em Leishmaniose
Felina

Todos Os Gatos 23

Anexo III

Artigo 3

Leishmaniose Felina: revisão de literatura

Situação: aceito para publicação na revista “Clínica Veterinária”

Leishmaniose Felina: revisão de literatura

Feline leishmaniasis: literature review

Filipe Dantas-Torres

MV, mestrando
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/Fiocruz
fdt@cpqam.fiocruz.br

Lucilene Simões-Mattos

MV, MSc, doutoranda
PPGCV – UECE
lsmattos@yahoo.com

Fábio Luiz da Cunha Brito

MV, MSc, doutorando
DMV – UFRPE
fabiobrito@click21.com.br

Luciana Aguiar Figueredo

MV, mestranda
DMV – UFRPE
lucianaf@hotmail.com.br

Maria Aparecida da Gloria Faustino

MV, prof. adj. dra.
DMV – UFRPE
magfaustino@hotmail.com

Resumo: Nos últimos anos, a leishmaniose felina (LF) vem despertando o interesse de clínicos veterinários, profissionais de saúde pública e de pesquisadores. Apesar do aumento do número de casos descritos na literatura, pouco se sabe sobre vários aspectos da história natural da LF. Recentemente, a suscetibilidade dos gatos domésticos (*Felis catus*) a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi demonstrada experimentalmente. Entretanto, o verdadeiro papel deste animal na epidemiologia das leishmanioses ainda não foi esclarecido. Neste contexto, o objetivo deste artigo é descrever os principais aspectos da LF e estimular o debate entre os clínicos veterinários, profissionais de saúde pública e pesquisadores, a fim de contribuir para o conhecimento da enfermidade.

Unitermos: gato doméstico, leishmaniose, epidemiologia, clínica, diagnóstico, tratamento, *Leishmania*.

Abstract: In the last few years, feline leishmaniasis (FL) has interested veterinary practitioners, public health workers and researchers. In last few years there has been a significant increase in the number of cases reported in the literature. Despite of this, many aspects of FL natural history remains to be discovered. Recently, the susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* was experimentally demonstrated. However, the role of this animal in the leishmaniasis epidemiology is still not clear. In this context, the objective of this paper is to review the main aspects of FL and to encourage the discussion among public health workers and researchers in order to contribute for the knowledge of the disease.

Keywords: domestic cat, leishmaniasis, epidemiology, clinic, diagnosis, treatment, *Leishmania*.

Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), usualmente transmitidas por picadas de fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) infectados^{1,14}. O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório peridoméstico na transmissão humana, notadamente nos casos de leishmaniose visceral (LV) causada pela infecção por *L. (Leishmania) chagasi* (= *L. infantum*)³⁰. Diante disso, há tempos a leishmaniose canina tem sido objeto de estudos, os quais vêm sendo sobejamente discutidos em reuniões científicas nacionais e internacionais. Entretanto, nos últimos anos, a leishmaniose felina (LF) vem despertando a atenção de clínicos veterinários, profissionais de saúde pública e de pesquisadores^{26,35,59}. Esse interesse deve-se não só pelo aumento do número de casos da doença nesta espécie animal⁵⁹, como também à alta prevalência de infecção encontrada em alguns focos endêmicos da doença⁴¹. Além disso, estudos recentes, realizados no Nordeste do Brasil, comprovaram a suscetibilidade dos gatos à infecção experimental por *L. (Viannia) braziliensis*^{60,64}, um dos agentes causadores da leishmaniose tegumentar americana (LTA)⁴⁹. Ademais, uma fêmea de *Lutzomyia migonei*, um dos vetores naturais do protozoário, foi capaz de se infectar⁶³, quando em contato com um gato experimentalmente infectado⁵⁷.

Os constantes debates entre profissionais de saúde, ligados, direta ou indiretamente, ao controle e prevenção das leishmanioses, no Brasil, têm sido focado, dentre as várias hipóteses, de que outros animais poderiam estar atuando como reservatórios dos agentes etiológicos das leishmanioses no país¹⁰. Além disso, tem sido especulado que o controle da leishmaniose canina com colares impregnados com deltametrina poderia, também, colaborar na inclusão de outras espécies animais na epidemiologia da doença, em focos endêmicos^{21,41,58}.

Neste contexto, o objetivo deste artigo é revisar os principais aspectos da LF, visando fornecer subsídios ao diagnóstico da enfermidade no Brasil, bem como encorajar o debate na busca de indícios que possam definir o papel do gato doméstico na epidemiologia das leishmanioses no país.

Breve histórico

A primeira referência sobre a LF data de 1756. No relatório de sua viagem à cidade de Aleppo, na Índia, Russel descreveu que, além de humanos (*Homo sapiens sapiens*) e cães, os gatos eram afetados pela leishmaniose³⁵. A partir do início do século XX, são descritos casos esporádicos de LF, notadamente naqueles países onde a infecção por *Leishmania* é considerada endêmica⁴¹.

Em 1912, foi relatado, na Argélia, um caso de infecção natural num gato doméstico⁵⁵. Na ocasião, foi sacrificado um exemplar de quatro meses de idade que vivia como animal de estimação em uma casa onde habitava uma criança afetada pela LV. Formas amastigotas características foram identificadas na medula óssea do animal. Foi então que em 1927, Salvador Mazza descreveu o que parece ser o primeiro caso de LF⁹. No mesmo ano foi relatado, no Vietnã, o primeiro caso da doença na Ásia⁴. Quatro anos mais tarde, foi descrita a ocorrência de leishmaniose cutânea em dois gatos no Iraque²⁵.

Foi então na década de 30, que se chamou a atenção para o possível papel do gato doméstico na epidemiologia da LV no Mediterrâneo¹⁶.

Na África, o primeiro caso foi descrito no final dos anos 40, na Argélia⁸. Quase três décadas mais tarde, foi relatado o segundo caso da doença, desta vez na Ilha de Reunião¹³. Na Europa, a LF foi registrada pela primeira vez em 1977, na Suíça⁵², em um gato cuja infecção foi supostamente adquirida na Espanha. Posteriormente foram descritos casos na França^{15,38}, Portugal¹¹, Espanha^{17,18,24} e Itália^{41,45}.

Nos Estados Unidos, estado do Texas¹², em meados da década de 80, foi registrado o único caso de LF da América do Norte. Já na América do Sul, além da Argentina, foram reportados casos na Venezuela^{6,7} e Brasil^{28,39,51,54,65}.

Distribuição da Leishmaniose Felina no Brasil e no Mundo

A LF é uma doença de distribuição cosmopolita. Entretanto, historicamente, poucos casos encontram-se descritos na literatura²⁶, sendo a maioria deles no Velho Mundo⁵⁹. Os casos clínicos de LF encontram-se distribuídos pela Europa (Suíça⁵², França^{15,38}, Portugal¹¹, Espanha^{17,18,24} e Itália^{41,45}), Américas (Estados Unidos^{3,12}, Venezuela⁶, Brasil^{28,39,51,54,65} e Argentina⁹), Ásia (Vietnã⁴, Iraque²⁵) e África (Argélia⁸ e Ilha de Reunião¹³). Atualmente, o Brasil é detentor do maior número de casos de LF do mundo. Entretanto, a distribuição da doença em gatos no país ainda é incerta sendo que, até a presente data, seis casos clínicos foram diagnosticados pelos Estados do Pará²⁸, Minas Gerais³⁹, São Paulo⁵¹, Rio de Janeiro⁵⁴ e, mais recentemente, no Mato Grosso do Sul⁶⁵.

Até a presente data há registros de 30 casos clínicos de LF no mundo, sendo que 18 ocorreram no Velho Mundo e 12 no Novo Mundo.

Espécies de *Leishmania* isoladas de gatos com leishmaniose

No Brasil já foram isoladas, a partir de casos de LF, espécies do protozoário causadoras da LV, como *L. (L.) infantum chagasi*⁵¹, e da LTA, tais como *L. (V.) braziliensis*⁵⁴ e *L. (L.) amazonensis*⁶⁵. Em outros países foram descritos casos clínicos ocorridos por *L. (L.) mexicana*^{3,12}, *L. (L.) venezuelensis*⁷ e *L. (L.) infantum*^{38,45}.

De forma geral, a caracterização das espécies é importante no sentido de estabelecer melhor o diagnóstico, tratamento, prognóstico e controle da doença, bem como saber a influência que essa variação intra-específica pode exercer sobre a epidemiologia das leishmanioses¹. A identificação das espécies de *Leishmania* isoladas de gatos com LF tem sido realizada por meio de técnicas tradicionalmente utilizadas na caracterização das espécies envolvidas nas infecções canina e humana. Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se a eletroforese de isoenzimas e a PCR^{3,41,51}. Especificamente nos casos de leishmaniose em gatos, a identificação das espécies do protozoário, ajudará a entender um pouco mais sobre a história natural da LF.

A relação entre gatos e flebotomíneos

Os insetos responsáveis pela transmissão dos agentes etiológicos das leishmanioses são flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo⁴⁸. Em face ao número de casos de infecções naturais descritos na literatura e da soroprevalência felina observada em várias regiões do mundo, os gatos parecem ser atrativos para os flebotomíneos^{58,59}.

No Quênia²⁰ e no Peru³⁶, por exemplo, foi demonstrado que os gatos estão entre os hospedeiros de preferência de *Phlebotomus guggisbergi* e *Lutzomyia peruensis*, respectivamente. Recentemente, ficou demonstrado que, sob condições experimentais, fêmeas de *Lutzomyia migonei* não só são atraídas pelos gatos, mas também realizam o repasto sanguíneo nestes animais⁵⁶. Ademais, o xenodiagnóstico, teste que consiste em verificar se há infecção do vetor flebotomíneo quando em contato com o hospedeiro suspeito, demonstrou que um gato infectado experimentalmente com *L. (V.) braziliensis* foi capaz de infectar o um flebotomíneo *Lutzomyia migonei*⁶³, um dos vetores naturais do protozoário, no Brasil.

Assim, o hábito eclético de algumas espécies de flebotomíneos, além da notável zoofilia destes dípteros⁴⁸, reforça a hipótese de que os gatos domésticos possam servir de fonte alimentar para os vetores das leishmanioses.

Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Felina

Inquéritos sorológicos de gatos foram realizados em vários países do mundo. A soroprevalência (Tabela 1) encontrada nestes estudos variou entre 0,0⁵³ e 68%⁴⁴. Da mesma forma que a soroprevalência canina, a felina pode variar sensivelmente de acordo com a metodologia (amostragem, técnica sorológica e *cut-off* adotado) empregada e com a região em questão.

Alguns estudos mostraram que a LF pode estar associada a doenças imunossupressoras, tais como leucemia e imunodeficiência felina^{26,35,42,44,50}. Para se ter uma idéia dessa relação, na Itália, um estudo retrospectivo envolvendo 93 gatos, com avaliação clínica e sorológica para vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV) e coronavírus, demonstrou que a sorologia positiva para FIV esteve significativamente associada à positividade para anticorpos anti-*Leishmania* e à titulação igual ou superior a 1:40⁴⁰. Contudo, em geral, o título de anticorpos observado em gatos infectados, parece ser mais baixo do que nos cães²⁶.

Entre o período de 1912 e 2000, 24 inquéritos parasitológicos, realizados em vários países do mundo, permitiram avaliar um total de 1.342 gatos pelas técnicas de citologia, histologia e PCR. Foi possível certificar a presença do protozoário em 74 gatos, perfazendo 5,5% de positividade⁵⁹. Nestes inquéritos, destacam-se os realizados na Jordânia³³ e Itália⁴⁴, tanto pela técnica empregada, como pelo número de gatos positivos.

Além dos domésticos, felídeos selvagens também foram encontrados naturalmente infectados por *Leishmania*. Na Arábia Saudita, inclusive, foi discutido o papel do gato de areia (*Felis margarita*), um felino selvagem de hábitos noturnos, como hospedeiro da infecção³². Adicionalmente, o serval (*Felis serval*), outro felídeo selvagem, foi encontrado infectado, no leste da África¹⁹.

Patogenia da infecção nos gatos domésticos

O desenvolvimento da leishmaniose em gatos ainda não está claro. Diante disso, objetivando conhecer o desenlace da LF, vários pesquisadores realizaram infecções experimentais. Em 1913, foram inoculadas formas infectantes de *L. (L.) mexicana* em gatos, os quais apresentaram alterações na pele, compatíveis com a leishmaniose cutânea⁶⁶.

Em meados da década de 80, formas amastigotas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* foram inoculadas por via intravenosa e, promastigotas, por via subcutânea. Foi possível a identificação dos parasitos apenas nas vísceras dos animais infectados por via intravenosa. Outro achado importante deste estudo foi o fato de que não houve correlação entre a detecção

de títulos elevados de anticorpos anti-*Leishmania* com o surgimento de sinais clínicos da doença ²². Entretanto, nove anos mais tarde, o gato doméstico foi considerado refratário à infecção experimental por *L. (L.) donovani* ². Contudo, como dito anteriormente, vários casos de infecção natural por *L. (L.) infantum*, pertencente ao complexo *L. donovani*, encontram-se descritos na literatura ^{38,45,51, 59}.

Recentemente, um grupo de pesquisadores ^{60,64} do Nordeste do Brasil realizou um estudo para avaliar a suscetibilidade dos gatos a infecção experimental por *L. (V.) braziliensis*. A manifestação cutânea em gatos foi similar aos casos humanos e caninos. As lesões tiveram início nos locais de inóculo com 15 dias, caracterizando-se inicialmente por pápulas, sendo que com 30 dias, todos animais tiveram evolução de pápulas para nódulos (Figuras 1 e 2). No decorrer do estudo, alguns gatos apresentaram ulcerações e aumento de linfonodo regional. Os animais apresentaram cura clínica ao redor dos 10 meses de infecção (Figura 3). A demonstração da suscetibilidade dos gatos domésticos a infecção por *L. (V.) braziliensis* reveste-se de importância para epidemiologia da LTA no Brasil. Contudo, a hipótese de que o gato possa atuar como reservatório natural da infecção precisa ser melhor investigada, uma vez que outros fatores, tais como a prevalência da infecção nos gatos presentes nas áreas onde a LTA é endêmica, e a atração exercida por esses animais sobre as fêmeas de flebotomíneos, nessas regiões, precisam ser analisados a fim de estabelecer o verdadeiro papel do felino no ciclo da doença. Além disso, a patogenia da infecção por *Leishmania* spp. nos gatos domésticos carece de mais informações, pois certos aspectos imunológicos, genéticos e ambientais, na interação da tríade parasito-hospedeiro-vetor, precisam ser elucidados para um melhor entendimento do mecanismo de suscetibilidade à infecção nesta espécie animal.

Sinais clínicos

Os sinais clínicos observados na LF são geralmente inespecíficos, contudo, as alterações cutâneas estão frequentemente presentes ^{3,12,26,31,41,60}. Foram descritas dermatites ulcerativa ^{4,8,25,28,40}, papular ²⁵ e pruriginosa ¹⁵, além de lesões nodulares ^{6,7,11,60}. Outros sinais, como alopecia generalizada e cisto hemático, também foram observados. Além das lesões cutâneas, alterações oculares ⁴⁵, tais como uveíte ⁴⁰ e iridociclite granulomatosa ¹⁷, têm sido relatadas na LF.

Como nos cães, alguns gatos podem apresentar a forma visceral da doença, associada ou não a alterações cutâneas e/ou oculares. Recentemente, foi relatado um caso de LV e ocular, em gato doméstico ²⁴. Uma fêmea adulta apresentou perda de peso, hepatomegalia, gengivite

e uveíte. Após terapia, sem sucesso, foi observada uma profunda ulceração no estroma corneal, associada a panuveíte hipertensiva exsudativa.

Eventualmente, a doença pode assumir uma forma aguda atípica e o animal vir a óbito em poucas semanas³⁸. Outros gatos apresentaram anorexia, depressão^{15,40}, êmese^{15,18}, diarreia, desidratação^{40,41}, perda de peso e estomatite^{24,41}. Linfadenomegalia local ou generalizada foram observadas, sendo os linfonodos submandibulares e poplíteos os mais acometidos^{40,41}. No estudo experimental de infecção de gatos por *L. (V.) braziliensis*, 92% dos animais apresentaram linfadenomegalia⁶⁰.

Apesar da inexistência de sinais clínicos patognomônicos, em regiões endêmicas para leishmanioses, a exemplo do Nordeste do Brasil, a LF deve estar incluída no diagnóstico diferencial dos casos de dermatites ulcerativa, papular ou pruriginosa, de lesões nodulares ou de uveíte em gatos domésticos.

Diagnóstico

O diagnóstico da LF geralmente é firmado com base na associação dos achados clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais subsidiários. Os exames sorológicos, tais como RIFI e ELISA, têm sido utilizados em estudos soroepidemiológicos^{25,40,59}.

Na patologia clínica, as alterações descritas nos gatos são semelhantes àquelas observadas nos cães, tais como leucocitose^{11,37} ou leucopenia, trombocitopenia, anemia arregenerativa³⁹, aumento dos valores e da atividade das enzimas hepáticas¹¹ e hipergamaglobulinemia^{22,37,39}. Eventualmente, pode ser observada hiperglobulinemia com aumento simultâneo das frações beta e gama¹⁷. Alguns gatos podem desenvolver insuficiência renal crônica, sendo a proteinúria freqüentemente observada nestes casos^{23,39}.

Exames parasitológicos, tais como a citologia aspirativa de lesões cutâneas ou de linfonodos³⁹, ou até mesmo a histologia, permitem o diagnóstico definitivo da infecção, pela demonstração de formas amastigotas de *Leishmania* (Figura 4). Desta forma, face à sua praticidade e baixo custo, a citologia aspirativa destaca-se como uma das melhores técnicas a serem empregadas no diagnóstico da infecção em gatos. O isolamento em meio de cultura também tem sido usado e apresenta resultados satisfatórios⁵⁹. Já o xenodiagnóstico, ao contrário do que acontece em medicina humana, não tem sido utilizado como rotina no diagnóstico de leishmaniose em medicina veterinária, ficando reservado apenas para as pesquisas.

É importante salientar que o diagnóstico clínico pode comprometer a prevalência de LF. Esse fato pode ser atribuído às semelhanças das manifestações cutâneas que acometem

gatos infectados por *Leishmania* com outras enfermidades. Segundo Simões-Mattos (2005), a LF pode ser facilmente confundida, principalmente com doenças fúngicas, como histoplasmose, criptococose e esporotricose. Ademais, o diagnóstico clínico de infecção por fungos, ao invés de *Leishmania*, permite a prescrição de antifúngicos os quais possuem relativa ação contra o protozoário, levando a uma cura clínica temporária, mascarando ainda mais o diagnóstico da LF. Além disso, podem ser incluídas também como diagnóstico diferencial as afecções neoplásicas, com destaque para os carcinomas epidermóides e de células escamosas, e os fibrossarcomas. Destacando-se ainda as dermatites actínicas, granulomas eosinofílicos e pododermatite plasmocítica, bastante frequentes em felinos. Diante do exposto, a LF deve ser incluída na prática médica veterinária como diagnóstico diferencial de doenças com manifestações cutâneas, em especial em áreas endêmicas.

Tratamento e controle

A exemplo do que acontece na leishmaniose em cães, ainda não foi descrito um protocolo terapêutico eficiente para o tratamento da LF^{3,40}. No entanto, alguns autores consideraram o uso de alopurinol, associado ao tratamento das possíveis doenças intercorrentes, uma opção terapêutica²⁴. Um gato leishmaniótico foi submetido a um protocolo composto por alopurinol, eritropoietina, sulfato de ferro e interferon, e acompanhado até o quarto mês de tratamento. Foram observados ganho de peso, crescimento dos pêlos, bem como ausência de linfadenopatia e hepatomegalia, além de PCR negativa. Entretanto, o animal apresentou neutropenia, anemia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, hiperbetaglobulinemia e sorologia positiva⁴¹.

Como, teoricamente, o número de casos de LF é reduzido, vários autores e profissionais de saúde consideram o gato como hospedeiro acidental. Como ainda não há trabalhos que evidenciem o real papel destes animais na transmissão humana, o controle da doença e/ou infecção em gatos é desconhecido.

Considerações finais

Apesar de sua antiga descrição e de sua ampla distribuição no mundo, a LF permanece praticamente desconhecida entre os profissionais de saúde no Brasil e no mundo, incluindo os médicos veterinários. Acreditamos haver vários motivos para esse desconhecimento, dentre eles a cultura de que as Leishmanioses seriam doenças apenas de homens, cães e alguns animais selvagens. Este fato citado associado ainda à baixa frequência de gatos em clínicas veterinárias, quando comparados aos cães, podem estar contribuindo para o sub-diagnóstico

da enfermidade na espécie felina em áreas endêmicas. Ademais, os escassos trabalhos no tocante aos aspectos clínicos-patológicos e epidemiológicos limitam a conhecimento sobre o papel de gatos como hospedeiros reservatórios de *Leishmania* sp e sua importância em Saúde Pública. O controle das leishmanioses ainda é especificamente direcionada ao cão e ao homem, e apesar de não preconizada para a espécie felina, recomendamos a notificação de casos de LF às autoridades de Saúde Pública. Assim, é esperado que haja, nos próximos anos, um maior número de pesquisas voltadas ao estudo de novos potenciais hospedeiros reservatórios de *Leishmania* sp, dos quais os gatos façam parte. Desta forma, poderemos um dia saber qual o fator de risco atribuível de uma população humana estar exposta a gatos infectados com *Leishmania* sp.

Referências

1. ALVAR, J. **Las leishmaniasis: de la biología al control**. 2. ed. Salamanca: Intervet, 2001. 236p.
2. ANJILI, C.O.; GITHURE, J.I. Refractoriness of domestic cats to infection with a Kenyan strain of *Leishmania donovani*. **East African Medical Journal**, v. 70, n. 5, p. 322, 1993.
3. BARNES, J.C.; STANLEY, O.; CRAIG, T.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. **Journal of the American Medical Association**, v. 202, n. 3, p. 416-418, 1993.
4. BERGERON, M.P. Un cas de leishmaniose chez le chat. **Bulletin de la Société de Science Vétérinaire de Lyon**, v. 30, p. 92-93, 1927.
5. BEZ, M. **La leishmaniose chez le chat, enquête séro-épidémiologique dans les Alpes-maritimes**. 1992. 110p. Tese (Doutorado) – Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, 1992.
6. BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 53, 1991.
7. BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDILVA, O.; TORREALBA, J.; GARCIA, M.T.; GAROFA, M.M.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Revista Científica – Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 6, n. 3, p. 187-190, 1996.
8. BOSSELUT, H. Un cas de leishmaniose generale do chat. **Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie**, v. 26, n. 1, p. 14, 1948.

9. BRUMPT, E. **Parasites Animaux, Précis de Parasitologie**. 6. ed. Paris: Masson et Cie, 1949. p. 248-256.
10. COSTA, C.H.N.; VIERIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.
11. COSTA DURÃO, J.F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; SIMOES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). Nota preliminar. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, p. 140-144, 1994.
12. CRAIG, T.M.; BARTON, C.L.; MERCER, S.H.; DROLESKEY, B.E.; JONES, L.P. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 6, p. 1100-1102, 1986.
13. DENUZIERE, C. Un chat 'leishmanien'. **La Semaine Vétérinaire**, v. 32, p. 1-2, 1977.
14. DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.
15. DUNAN, S.; MARY, C.; GARBE, L.; BRETON, Y.; OLIVON, B.; FERREY, P.; CABASSU, J.P. A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la région marseillaise. **Bulletin de la Société Française de Parasitologie**, v. 7, p. 17-20, 1989.
16. GIORDANO, A. Le chat dans la transmission de la leishmaniose viscérale de la méditerranée. **Bollettino della Sezione Italiana, Società Internazionale di Microbiologia**, v. 5, p. 330-332, 1933.
17. HERVAS, J.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; LOPEZ, J., GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; GUERRERO, M.J., MORENO, A. Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. **Veterinary Record**, v. 149, n. 20, p. 624-625, 2001.
18. HERVAS, J.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; SANCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J.A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 1, n. 2, p. 101-105, 1999.
19. HOOGSTRAAL, H.; DIETLEIN, D.R. Leishmaniasis in the Sudan Republic: recent results. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, p.137-143, 1964.
20. JOHNSON, R.N.; NGUMBI, P.M.; MWANYUMBA, J.P.; ROBERTS, C.R. Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 7, n. 3, p. 213-218, 1993.

21. KILLICK-KENDRICK, R. **Canine leishmaniasis: moving towards a solution**. In: INTERNATIONAL OF THE CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla. **Proceedings...** Sevilla: Intervet, 2002.
22. KIRKPATRICK, C.E.; FARRELL, J.P.; GOLDSCHMIDT, M.H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 125-131, 1984.
23. LAURELLE-MAGALON, C.; TOGA, I. Un cas de leishmaniose feline. **Pratique Médicale Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 31, p. 255-261, 1996.
24. LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T.; ROURA, X. Ocular and visceral leishmaniasis in a domestic cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, p. 285, 2002.
25. MACHATTIE, C.; MILLS, E.A.; CHADWICK, M.C.R. Naturally occurring oriental sore of the domestic cat in Iraq. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, p. 103-106, 1931.
26. MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.
27. MARECHAL, M. **La leishmaniose féline: cãs sporadique ou réalité encore ignorée? (étude dans la région Marseillaise)**. 1993. 68 p. Tese (Doutorado) – Ecole Nationale Veterinaire de Lyon, 1993.
28. MELLO, G.B. Verificação da infecção natural de um gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v. 54, n. 12, p. 180, 1940.
29. MICHAEL, S.A.; MORSY, T.A.; EL-SEOUD, S.F.; SALEH, M.S. Leishmaniasis antibodies in stray cats in Ismailiya Governorate, Egypt. **Journal Egyptian Society of Parasitology**, v. 12, n. 1, p. 283-286, 1982.
30. MILES, M.A.; VEXENAT, J.A., FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Intervet, 1999. p. 46-53.
31. MORSY, T.A.; ABOU EL-SEOUD, S.M. Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza governorate, Egypt. **Journal Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 199-204, 1994.
32. MORSY, T.A.; AL-DAKHIL, M.A.; EL-BAHRAWY, A.F. Natural *Leishmania* infection in sand cats captured in Riyadh district, Saudi Arabia. **Journal of Egyptian Society of Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 69-74, 1999.

33. MORSY, T.A.; MICHAEL, S.A.; EL DISI, A.M. Cats as reservoir hosts of human parasites in Amman, Jordan. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, p. 199-204, 1980.
34. MORSY, T.A.; MICHAEL, S.A.; MAKHLOUF, L.M.; EL SIBAI, M.M. *Leishmania* infection sought in non human hosts in Suez governorate, Egypt. **Journal Egyptian Society of Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 539-545, 1988.
35. NAUCKE, T.J. Leishmaniose bei katzen. **Rundschreiben**, n. 4, 2000. Capturado em 05 jan. 2004. Disponível na Internet <http://members.aol.com/TJNaucke/letter04.html>.
36. OGUSUKU, E.; PEREZ, J.E.; PAZ, L.; NIETO, E.; MONJE, J.; GUERRA, H. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, p. 329-335, 1994.
37. OLIVEIRA, A.P. **Inquérito sorológico de *Leishmania* sp em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Guaratiba, município do Rio de Janeiro, Brasil**. 2002. 33p. Monografia – Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, 2002.
38. OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIEVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 2/3, p. 273-277, 1998.
39. PASSOS, V.M.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19-20, 1996.
40. PENNISI, M.G. Case report of *Leishmania* spp. infection in two cats from the Aeolian archipelago (Italy). In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 24, 1999, Lyon. **Proceedings...** Lyon: WSAVA, 1999. 1 CD-ROM.
41. PENNISI, M.G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla. **Proceedings...** Sevilla: Intervet, 2002. p. 39-48.
42. PENNISI, M.G.; BO, S. Indagine epidemiologica nazionale FeLV/FIV. **Veterinaria**, v. 8, n. 4, p. 37-44, 1994.
43. PENNISI, M.G.; MASUCCI, M.; CATARSINI, O. Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in gatti FIV+ che vivono in zona endemica. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, v. 52, p. 265-266, 1998.

44. PENNISI, M.G.; MASUCCI, M.; CATARSINI, O. Studio dell'infezione da *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endêmica. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, v. 54, p. 215-216, 2000.
45. POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 181-191, 2002.
46. PORTÚS, M.; GÁLLEGO, M.; RIERA, C.; AISA, M.J.; FISA, R.; CASTILLEJO, S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). **Revista Ibérica de Parasitología**, v. 62, p. 72-76, 2002.
47. RAMOS, J.J.Z.; SARASA, I.A.; OCHOA, P.G.; HERNÁNDEZ, J.A.C.; SALINAS, M.J.G.; AMELLA, M.J.M. Serological evidence of leishmaniasis in cats in Aragon, Spain. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proceedings...** Granada: WSAVA, 2002. Capturado em 10 jan. 2004. Disponível na Internet <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2860>.
48. RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. 368p.
49. REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379p.
50. RODRIGUEZ, J.H.; AREVALO, J.P.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; FERNANDEZ, J.L.; BOISO, A.M.; GOMEZ VILLAMANDOS, J.C. Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proceedings...** Granada: WSAVA, 2002. Capturado em 10 jan. 2004. Disponível na Internet <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2754>.
51. SAVANI, E.S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M.C.; DE CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; DOS SANTOS, M.G.; D'AURIA, S.R.; 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 (*Felis catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.
52. SCHAWALDER, P. Leishmaniose bei Hund und Katze: autochtone Falle in der Schweiz. **Kleintier-Praxis**, v. 22, p. 237-246, 1977.

53. SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.
54. SCHUBACH, T.M.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; MADEIRA, M.F.; SANTOS, I.B.; ANDRADE, M.V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M.C.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165-167, 2004.
55. SERGENT ED. ET ET.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.
56. SILVA, F.M.O.; SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO, C.L.B.; DE SOUSA, R.N.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; LIMA, J.W.O. Comportamento alimentar de flebotômíneos em contato com gatos domésticos não infectados por *Leishmania* sp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 344, 2004.
57. SILVA, F.M.O.; SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO, C.L.B.; FRUTUOSO, M.S.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, I.C.B.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; POMPEU, M.M.L. Leishmaniose felina experimental. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 237, 2004.
58. SIMÕES-MATTOS, L. Estudo da infecção natural por *Leishmania chagasi* pela técnica de ELISA em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Fortaleza, Ceará. 2002. 56p. Monografia – Escola de Saúde Pública do Ceará, 2002.
59. SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; POMPEU, M.M.L. Feline leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 550, p. 79-87, 2004.
60. SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; HOLANDA, C.M.; PRATA JÚNIOR, J.C.R.; RODRIGUES, T.P.; LIMA, J.W.O.; POMPEU, M.M.L.; COELHO, I.C.B. Cutaneous manifestations in domestic cats (*Felis catus*) experimentally infected by *Leishmania braziliensis*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA, 2., 2001, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2001. p. 30-31.
61. SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; RODRIGUES, T.P.; PRATA JÚNIOR, J.C.R.; TEIXEIRA, M.J.; SILVA, T.F.P.; HOLANDA, C.M.; PEREIRA, B.S.; LOPES, C.A.P.; POMPEU, M.M.L. Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats

- (*Felis catus*) in the city of Fortaleza, Northeast of Brazil. **Revista Ciência Animal**, v. 11, supl. 2, p. 79-81, 2001.
62. SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; RODRIGUES, T.P.; SILVA, T.F.P.; SUCUPIRA, B.S.; HOLANDA, C.M.; PRATA-JÚNIOR, J.R.C.; POMPEU, M.M.L.; COELHO, I.C.B. *Leishmania chagasi* – antibodies detected by ELISA assay in domestic cats (*Felis catus*) from urban area of Fortaleza, Northeast of Brazil. **Revista Ciência Animal**, v. 11, supl. 1, p. 194, 2001.
63. SIMÕES-MATTOS, L.; SILVA, F.M.O.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO, C.L.B.; DE SOUSA, R.N.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; LIMA, J.W.O. Gatos domésticos como reservatórios de *Leishmania braziliensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 237, 2004.
64. 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, n. 3-4, p. 199-208, 2005.
65. SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.N.; MARIN, G.R.B.; NUNES, V.L.B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology** (no prelo).
66. WENYON, C.M. A further note of a case of dermal leishmaniasis from South America with the results of inoculation experiments. **Journal of the London School of Tropical Medicine**, v. 2, p. 117-119, 1913.

Tabela 1 – Inquéritos sorológicos de gatos domésticos, realizadas em diferentes países (adaptado de ^{41,59})

País	Técnica sorológica	Positividade (%)
Egito ²⁹	Hemaglutinação indireta	3,7
EUA (citado por ⁵⁹)	Aglutinação direta	10,0
Egito ³⁴	Hemaglutinação indireta	3,6
França ⁵	Imunofluorescência indireta	0,6
França ²⁷	<i>Western Blot</i>	12,7
Egito ³¹	Hemaglutinação indireta	3,3
Brasil ⁵³	Imunofluorescência indireta	0,0
França ³⁸	<i>Western Blot</i>	12,4
Itália ⁴⁰	Imunofluorescência indireta	59,0
Itália ⁴⁴	Imunofluorescência indireta	68,0
Brasil ⁶²	ELISA	13,0
Brasil ⁶¹	ELISA	10,7
Itália ⁴⁵	Imunofluorescência indireta	0,9
Espanha ⁴⁶	ELISA	1,7
Brasil ³⁷	Imunofluorescência indireta	50,5
Espanha ⁴⁷	Aglutinação direta	42,0

Legendas da figuras

Figura 1 - Grande nódulo no nariz de um gato formado no local do inóculo experimental após 30 dias da infecção experimental

Figura 2 - Presença de nódulo no local (seta branca) e acima (seta verde) do sítio de inoculação

Figura 3 - Ausência de lesão aos 10 meses após a infecção (mesmo animal da Fig. 2)

Figura 4 - Formas amastigotas de *Leishmania* (exame citológico de medula de cão, corado pelo panótico, visto em objetiva de imersão)

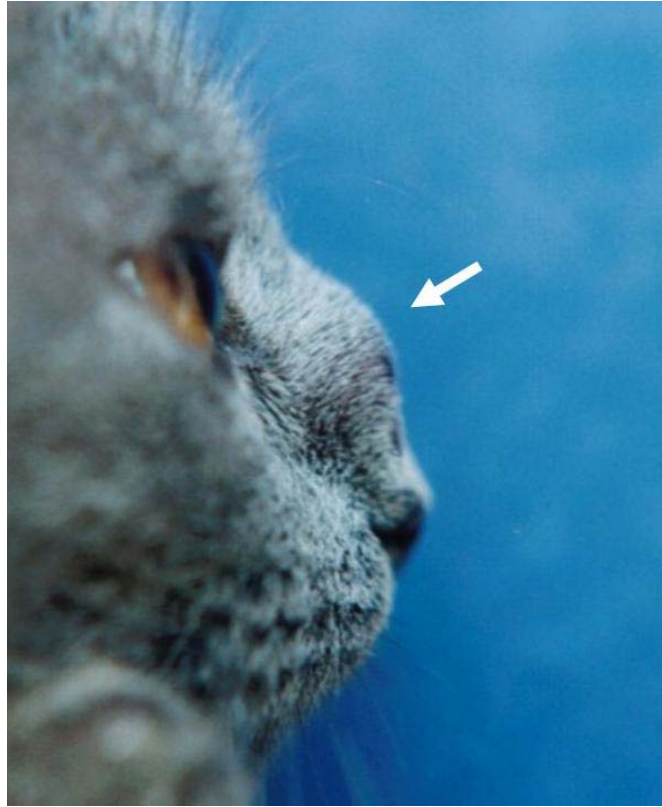


Figura 1

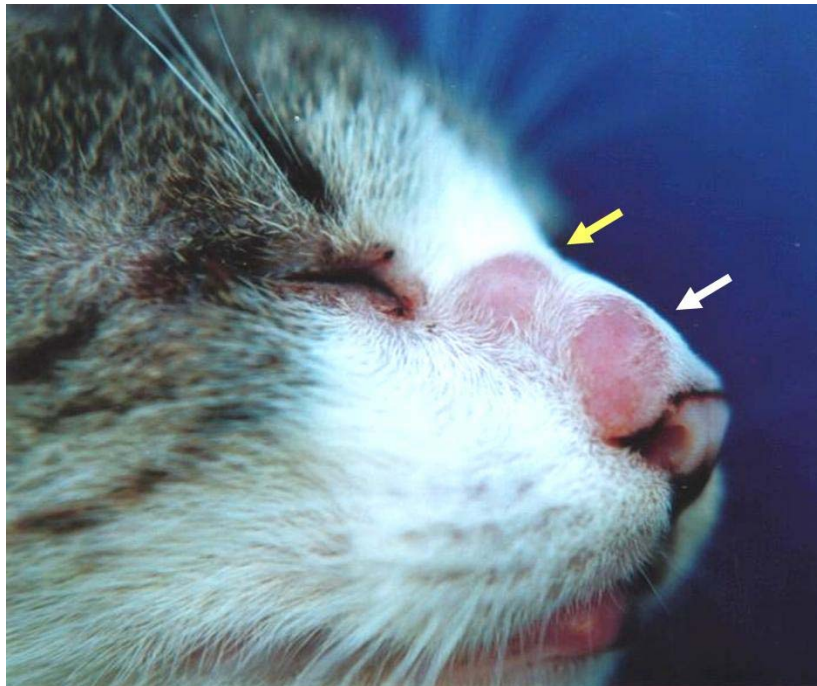


Figura 2



Figura 3

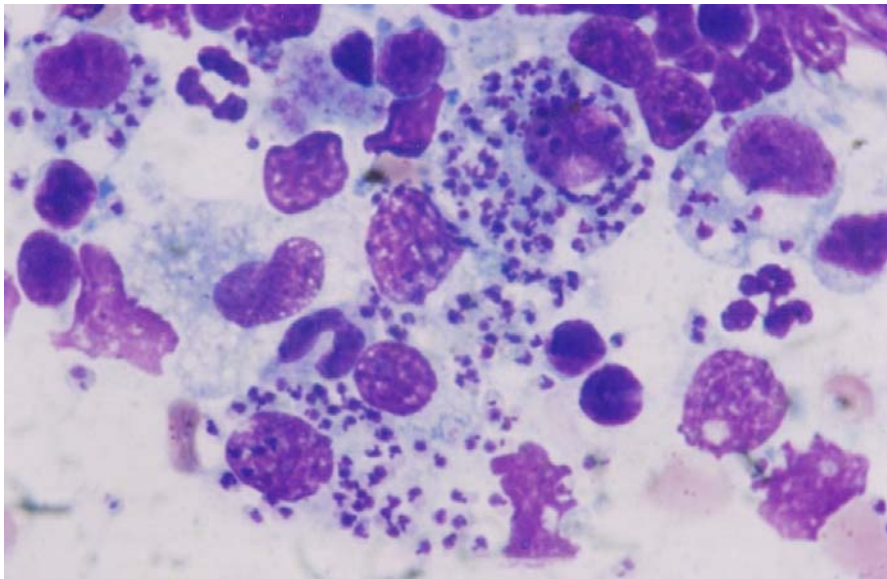


Figura 4

Anexo IV

Artigo 4

The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with
Leishmania braziliensis

Situação: publicado no periódico Veterinary Parasitology

v. 127, 199-208, 2005



The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*

L. Simões-Mattos^{a,*}, M.R.F. Mattos^a, M.J. Teixeira^b, J.W. Oliveira-Lima^{b,c},
C.M.L. Bevilaqua^a, R.C. Prata-Júnior^b, C.M. Holanda^a, F.C.M. Rondon^a,
K.M.S. Bastos^a, Z.C.B. Coêlho^b, I.C.B. Coêlho^b, A. Barral^d, M.M.L. Pompeu^b

^aFaculdade de Veterinária (FAVET), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV),
Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, CEP 60.740-000, Brazil

^bNúcleo de Medicina Tropical (NMT), Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML),
Faculdade de Medicina (FM), Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brazil

^cFundação Nacional da Saúde-Ceará (FUNASA), Ceará, Brazil

^dCentro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bahia, Brazil

Accepted 1 October 2004

Abstract

Over the last few years, several cases of feline leishmaniasis (FL) with cutaneous and visceral forms have been reported around the world. Nonetheless, the real susceptibility of cats to infection with *Leishmania* spp. and the outcome of leishmaniasis in these animals are poorly understood. Experimental studies on feline models will contribute to the knowledge of natural FL. Thus, in order to determine the susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*, 13 stray cats were infected with 10^7 promastigotes by the intradermal route in the ear and nose simultaneously and followed up for 72 weeks. Soon after infection, the earliest indication of a lesion was a papule on the ear at 2 weeks post-infection (w.p.i.). The emergence of satellite papules around the primary lesion was observed about 4 w.p.i. Two weeks later these papules coalesced and formed a huge and irregular nodule. Thereafter, there was lesion dissemination to the external and marginal surface of the ipsilateral ear, and later to the contralateral ear. At 10 w.p.i., some nodules became ulcerated. Nose lesions presented a similar evolution. At both sites, the largest lesion sizes occurred at 10 w.p.i. and started to decrease 15 days later. Ear and nose nodules healed at 32 and 40 w.p.i., respectively. Specific *L. braziliensis* IgG antibody titers (optical density ≥ 0.01 as positive result) were detected as early as 2 w.p.i. (0.09 ± 0.02) in only three animals (23%), and all cats had positive titers at 20 w.p.i. (0.34 ± 0.06). Only three animals (38%) continued to show positive serology at 72 w.p.i. (0.08 ± 0.02). Up to that time, none of the cats had lesion recurrence. In a feline model of cutaneous leishmaniasis, it seems that there is no correlation between active lesions and positive serology. The implications of these data are discussed.

© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Tegumentary leishmaniasis; Cat; *Leishmania braziliensis*; Experimental infection; Serology; Clinical manifestation

* Corresponding author. Tel.: +55 85 299 2760; fax: +55 85 299 2740.

E-mail address: ismattos@yahoo.com (L. Simões-Mattos).

1. Introduction

Leishmaniasis is a widespread zoonotic disease with a great impact on public health. It is endemic in 88 countries around the world (WHO, 2004). In Brazil, Tegumentary Leishmaniasis (TL) is primarily caused by the protozoon *Leishmania braziliensis* transmitted by the bite of phlebotomines of the genus *Lutzomyia*. Human TL may produce a variety of clinical syndromes ranging from a simple ulcer to destructive mucosal lesions that may be fatal.

Several vertebrate species are considered to be reservoir hosts, including wild and domestic animals. Among domestic animals, dogs are incriminated in the domestic transmission to human beings. However, due to the marked urbanization of leishmaniasis (Desjeux, 2002), the involvement of other domestic species in TL epidemiology in endemic foci may be possible. Although feline leishmaniasis (FL) is considered to be a rare finding (Costa Durão et al., 1994; Passos et al., 1996; Ozon et al., 1998), several cases of both visceral and cutaneous forms have been reported in the America, Europe, Africa and Asia (Simões-Mattos et al., 2004). Nonetheless, the real susceptibility of cats to infection by *Leishmania* spp. and the outcome of leishmaniasis in these animals are poorly understood (Shaw et al., 2001). On this basis, experimental studies on feline models will contribute to the knowledge of natural FL. Thus, the main aim of this study was to characterize the outcome of infection in cats experimentally infected with *L. braziliensis* in terms of clinical manifestations and serological responses.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

The MHOM/BR/94/H-3227 strain of *L. braziliensis* was used to infect cats; originally isolated from a TL patient from Ceará State, Brazil, and typed by agarose gel electrophoresis using isoenzymes according to Momen et al. (1985), and by the indirect fluorescent antibody test (IFAT) using monoclonal antibodies provided by the World Health Organization (WHO). The parasites, stored in liquid nitrogen, were thawed and cultured as promastigotes at 26 °C in

Schneider's insect medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma), 2% sterile normal human urine, 2 mM L-glutamine (Gibco BRL, Grand Island, NY), and antibiotics [100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate (Sigma)]. Subcultures were prepared during the stationary phase of growth and parasites were used no later than after the fourth passage. Prior to infection, promastigotes were harvested from culture, washed in sterile saline, counted in a Neubauer chamber and adjusted to the appropriate concentration.

2.2. Animals

Thirteen young (3–4 months) female and male domestic cats (*Felis catus*) obtained from the Center of Zoonosis Control (CZC) of the city of Fortaleza, Ceará State (Brazil) were housed in groups of two in indoor–outdoor shelters (2 m²), and fed a dry maintenance cat food (ProPlan/Gatsy supplied by PURINA; Eukanuba Rice and Chicken supplied by IAMS Co. and Gireze Co., Brazil), with free access to water throughout the study. The animals were assessed clinically, dewormed (Endal Plus supplied by Shering Plough), vaccinated against feline panleukopenia, rhinotracheitis, calicivirus (Tricat supplied by INTERVET) and rabies infections before the experiment. The animals were left in quarantine for a period of 30 days. A survey for the presence of feline leukemia virus (FeLV) was performed in all animals by the indirect fluorescent antibody assay (IFA) using the FeLV kit Detection Set (VMRD, Inc.).

2.3. Experimental infection

The dose of inoculum consisted of 1×10^7 stationary phase *L. braziliensis* promastigotes in 20 µl of sterile saline. Before experimental infection, the cats were anesthetized with an intramuscular injection of 2% xylazine, 1 mg/kg body weight and 10% ketamine, 15 mg/kg body weight (Anasedan and Dopalen provided by Vetbrands Saúde Animal—Paulínia, São Paulo, Brazil). Thereafter, the cats were inoculated intradermally with 50-µl Hamilton disposable syringes in the center of the internal surface of the right ear and right side of the nose. Only one cat was not inoculated in the nose due to a small crusted

lesion at that site. Three hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected in the left foot as strain-infection controls under intramuscular anesthesia of 10% ketamine (Dopalen), 80 mg/kg body weight and 2% xylazine (Anasedan), 10 mg/kg body weight. The Animal Care and Utilization Committee of Universidade Federal do Ceará (Brazil) approved all the experimental procedures conducted on cats and hamsters in the present study.

2.4. Follow-up

All experimental animals were checked weekly by clinical examination. Signs of emergence and size of lesions, lymphadenopathy, visceromegaly, weight loss and nasal manifestation were evaluated up to 72 weeks post-infection (w.p.i.).

Ear lesion samples from nine cats were collected by aspiration under anesthesia and cultured in biphasic (agar–blood–Schneider) medium at 6 w.p.i. Cultures were incubated at 25 °C and examined weekly by light microscopy (Nikon–Labophot, Japan, original magnification 400×) over a 4-week period. Imprints of spleen and liver and smears of bone marrow were obtained from four euthanized cats at 4, 12, 16 and 24 w.p.i. The slides were stained with May–Grünwald–Giemsa and evaluated by light microscopy (Nikon—original magnification 1000×). The animals' euthanasia was performed with previous anesthesia (xylazine and ketamine) and intravenous injection of 2 mL of 10% potassium chloride (procedure approved by Conselho Federal de Medicina Veterinária [CFMV] in Brazil, according to resolution number 714 of 06/20/2002).

2.5. Antibody determination

Blood was drawn directly from the jugular vein with disposable syringes before infection and at different times after infection for antibody titer determination. The sera were kept frozen at –20 °C until the time for assay. The ELISA procedure used was a modification of a previously reported method (Evans et al., 1990). Briefly, a 96-well flat-bottom microtiter plate (Immulon II, Dynatech Laboratories, Inc.) was coated with 50 µl of whole *L. braziliensis* promastigotes, 10⁶ cells/well, diluted in 0.05 M carbonate–bicarbonate coating buffer (pH 9.6) and left to stand overnight at 4 °C. The plates

were then aspirated and blocked for 2 h at room temperature with 1.5% fetal calf serum (FCS; Laborclin, Brazil) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS/Tween), and incubated for 1 h at 37 °C with 50 µl of serum diluted 1:100 in PBS–1.5% FCS. The plates were washed in PBS/Tween three times and then incubated for 45 min at 37 °C with 50 µl of 1:8000 peroxidase-conjugated Protein A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). After three washes cycle, 200 µl/well of the substrate, 0.055% 2-azino-dio-3-ethyl-benzthiazoline ([ABTS], Sigma[®]), was added in 0.1 M phosphate–citrate buffer (pH 5.0) containing 0.03% hydrogen peroxide (Sigma[®]). The plates were incubated for 15 min at room temperature in the dark. The reaction was stopped by adding 2N H₂SO₄ and the absorbance was read at 405 nm using an ELISA reader (Titertek Multiskan, Helsinki, Finland). According to previous studies (Simões-Mattos et al., 2001; Simões-Mattos, 2002), titers with optical density (OD) ≥ 0.100 (cut-off) were considered to be positive results.

2.6. Lesion size

Cats were observed daily until the emergence of the lesions, which were then measured (major and minor diameter) once a week. Lesion area (mm²) was calculated using the formula: $\pi r_1 r_2$, where $r_1 r_2$ are the major and minor radii of the lesion as previously described by Amaral et al. (2001).

2.7. Data analyses

Data on lesion development in weeks post-infection are reported as median lesion sizes and lesion areas data as standard error of the mean (S.E.M.). Linear regression between lesion size and optical density of specific *Leishmania* antibodies was performed. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Establishment of infection and clinical evolution

The evolution of the lesions on the ears and nose is listed in Table 1. On the ear, the earliest lesion was a

Table 1
Evolution of the lesions in cats (*Felis catus*) experimentally infected with *Leishmania braziliensis*

Lesion	Frequency (%)		Median (min–max) in weeks post-infection			
	Ear ^a	Nose ^b	Lesion onset		Lesion length	
			Ear	Nose	Ear	Nose
Papule	77	75	2 (1.5–3)	2 (1.5–3)	2 (0.5–3)	1 (0.5–2)
Nodule	100	100	3.5 (2.5–5)	3 (2.5–10)	28 (11–34)	41 (34–47)
Satellites lesions	83.3 ^c	45.5 ^f	4 (4–11)	6.5 (5–11)	2 (1–7.5)	2.5 (1–11)
Huge lesion ^c	91 ^f	9.1 ^f	6 (2–8)	10 (1–13)	–	–
Dissemination ^d	42.6 ^e	8.3 ^f	8.5 (7.5–22)	7.5 (7.5–7.5)	3 (2–6.5)	2 (2–2)
Mucosal infiltration	–	88.9 ^g	–	16 (6–22)	–	–
Ulceration	25 ^e	33.3 ^f	10 (9–11)	7 (6–7.5)	9 (4–16.5)	4.5 (4–21)
Healing	87.5 ^h	100 ⁱ	32 (30–33)	40 (33–44)	38 (34–72)	29 (43–72)

^a $n = 13$.

^b $n = 12$.

^c Coalescing of small satellite lesions.

^d Skin dissemination to other sites.

^e Rate calculated for 12 live animals.

^f Rate calculated for 11 live animals.

^g Rate calculated for 9 live animals.

^h Rate calculated for 8 live animals.

ⁱ Rate calculated for 7 live animals.

single papule (Fig. 1) followed by the emergence of satellite papules around the primary lesion. These papules coalesced and formed a huge and irregular nodule (Fig. 2). Thereafter, there was lesion dis-

semination leading to the emergence of new lesions on the external and marginal surface of the ipsilateral ear, and later on the contralateral one (Fig. 3). At 10 w.p.i., three cats (25%) showed ulceration of some nodules



Fig. 1. Papule formed on the ear of a cat experimentally infected with 10^7 promastigotes of *Leishmania braziliensis*.



Fig. 2. A huge and irregular nodule formed by several coalescing papules on the ear of a cat experimentally infected with 10^7 promastigotes of *Leishmania braziliensis*.

and the ulcers closed and opened several times. The evolution of nose lesions was similar to that of ear lesions (Fig. 4). In addition, most animals had mucosal infiltration with partial nostril obstruction around 16

w.p.i. In both places, the lesion size peaked at 10 w.p.i., with a reduction occurring thereafter. Total resolution of the ear and nose lesions occurred at 32 and 40 w.p.i., respectively (Fig. 5). Only one cat had



Fig. 3. Ulceration (arrow) of the primary lesion, and dermal dissemination to the ipsilateral and contralateral ear.



Fig. 4. Ulcerated lesion on the nose at 6 weeks post-infection in a cat experimentally infected with 10^7 promastigotes of *Leishmania braziliensis*.

lesion recurrence on the ear 4 months after self-healing. Up to 72 w.p.i., only one cat showed an apparent alopecic scar on the ear (Fig. 6).

Regional lymph node enlargement was observed at 11 w.p.i. in most animals (92.3%), ranging from 1.5 to 2.0 cm in diameter. Actually, enlargement of regional

lymph nodes was detectable in two out of eight cats. However, at that time the disease was under control in all cats and all animals are apparently healthy. Four animals were euthanized at 4, 12, 16 and 24 w.p.i. for further histopathological study and one cat died at 24 w.p.i., but could not be submitted to post-mortem

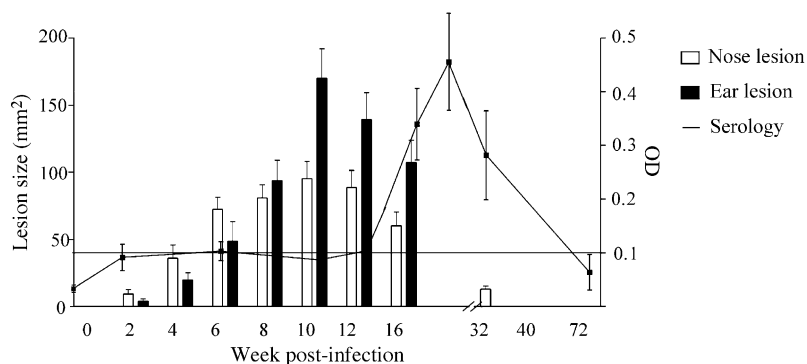


Fig. 5. Evolution of lesion size in mm^2 (mean \pm S.E.M.) and of the humoral response in optical density (OD [mean \pm S.E.M.]) throughout the trial in cats experimentally infected with 10^7 promastigotes of *Leishmania braziliensis*.



Fig. 6. Healing of the lesions of experimental feline leishmaniasis. Same cat as illustrated in Fig. 3. Note a small scar at the site of an old ulcer (arrow) at 72 weeks post-infection.

evaluation due advanced autolysis. Eight cats are still kept under clinical observation to evaluate the probability of recurrence of cutaneous lesions.

3.2. Parasite detection

Parasite growth was obtained in NNN medium from aspirates of the primary ear lesion of 8 out of 9 animals (89%) at 6 w.p.i. Cultures and imprints from liver, spleen and bone marrow were negative for the four euthanized cats.

3.3. Behavior of the serological anti-*Leishmania* response and FeLV detection

Specific-*Leishmania* IgG antibody titers were first detected in only three animals (23%) at 2 w.p.i. (0.09 ± 0.02). The specific antibody concentrations in the serum of infected animals were low up to 12 w.p.i. At that time, serum conversion was observed in 50% of cats (0.10 ± 0.01). At 20 w.p.i., all cats were serologically positive (0.34 ± 0.06), and showed significant concentrations of specific antibody titers

about 26 w.p.i. (0.45 ± 0.07). After that time, there was a significant fall in specific antibody production, and at 72 w.p.i., only 38% of the animals had detectable antibodies (0.08 ± 0.02). In all cats, positive antibody titers lasted 16 weeks (median). Regarding the feline leukemia virus, 9 out of 13 (69.2%) cats had a positive FeLV assay.

3.4. Correlation between lesion development and serology

Fig. 5 shows that the emergence of lesions preceded the occurrence of anti-*Leishmania* antibodies. In spite of a marked reduction in size and number of lesions at 32 w.p.i., antibody titers continued to be high. At 72 w.p.i., even with clinical recovery, three of eight cats (37.5%) still had detectable antibody titers. There was no correlation between anti-*Leishmania* antibody concentration in serum and ear lesion size throughout the experimental trial. However, there was a positive correlation between nose lesions and serology at 12 and 16 w.p.i. ($r^2 = 36.6\%$, $p = 0.037$ and $r^2 = 44.12\%$, $p = 0.0258$, respectively).

3.5. Non-specific signs

From the time of lesion manifestation until self-healing, 10 cats sneezed and/or had nasal discharge and were treated with 2.5% enrofloxacin, 5 mg/kg/IM. In addition, they showed lusterless, dry and brittle hair. However, up to 72 w.p.i., only one cat showed bilateral alopecia, especially on both legs, and another had slight sneezing. Also, weight loss and weakness were observed in five cats during the first 32 w.p.i.

4. Discussion

Although leishmaniasis is considered to be a rare occurrence in cats, several cases have been reported around the world in recent years (Bez, 1992; Marechal, 1993; Simões-Mattos et al., 2004). This may be associated in part with an increased incidence of *Leishmania* infection, with advances in diagnostic techniques, with increased breeding of cats in developed countries, and/or partly with greater health care devoted to pets.

Cutaneous lesions in cats naturally infected with *Leishmania* spp. occur mainly on the nose (Pennisi, 1999), followed by the ears (Craig et al., 1986), or at both sites (Machattie et al., 1931; Mello, 1940; Bonfante-Garrido et al., 1996). Therefore, we chose both sites for experimental infection. The time of evolution and the characteristics of the lesions observed in this study were similar to those of natural feline leishmaniasis (Barnes et al., 1993; Bonfante-Garrido et al., 1996; Laruelle-Magalon and Toga, 1996; Ozon et al., 1998; Hervás et al., 1999; Pennisi, 1999) as well as human cutaneous leishmaniasis (Grimaldi, 1982). Nonetheless, ulcers seem to be much more frequent in human beings (Costa et al., 1990) and dogs (Pirmez et al., 1988) than in the cats of this study. The resolution of the lesions of the experimentally infected cats (Fig. 2) was slightly faster than observed in natural human cutaneous leishmaniasis (Costa et al., 1990). However, this self-healing may not signify the total absence of parasites. The presence of *Leishmania* antigens or amastigotes may persist in the cicatricial lesion, as already observed in the skin of dogs (Oliveira-Lima, 1996) and human beings (Schubach et al., 2001), and in a resistant model of murine leishmaniasis (Belkaid et al., 2001). This may explain

the recurrence of lesions in a cat with leishmaniasis 7 years after surgical excision of the first lesion (Barnes et al., 1993).

In our study, about 40% of the cats had dermal dissemination to other sites. Apparently there was no visceral dissemination as indicated by the absence of *Leishmania* amastigotes in bone marrow, spleen and liver of the four cats that were examined. At least in this experimental model, the parasite seems to affect only the skin. However, dissemination of *L. braziliensis* protozoa to the viscera has been reported in natural human infection (Sousa et al., 1995), as well as in experimental infection in hamsters (Sinagra et al., 1997).

The immune response mediated by antibodies is not considered to be protective against the intracellular *Leishmania* parasites. It is known that, at least in canine visceral leishmaniasis, high antibody titers indicate active disease (Quinnell et al., 2003) and potential transmission of the protozoa to the vectors. In our study, the period during which the cats showed active lesions that harbored parasites and potentially acted as reservoirs could not be determined by conventional serological methods. The mean seroconversion of antibody titers occurred when lesions were in the resolution stage. In addition, the peak of the antibody titers was verified at 20 w.p.i., when lesions were significantly decreased in size. Similarly, there was a low correlation between lesion size and antibody titers. These data suggest that serology is not a good marker of the clinical course of feline TL and therefore, from an epidemic point of view, the absence of anti-*Leishmania* antibodies in the serum of cats with cutaneous lesions may lead to a clinical misdiagnosis in the differential diagnosis from other diseases. Thus, the lack of an early diagnosis of FL in endemic areas may imply that the animal will continue to represent a potential risk of *Leishmania* transmission to the vectors. In addition, it is important to emphasize that previous studies have shown that cats are more attractive (Johnson et al., 1993) and are more used as bloodmeal sources by biting phlebotomine sandflies (Ogosuku et al., 1994) by some phlebotomine species than dogs. In addition, in a previous assay with *Lutzomyia migonei*, one of the main vectors of *L. braziliensis* in Brazil, about 90% of the engorged female sandflies were recovered after contact with a cat in a cage (J.W. Oliveira-Lima, personal commu-

nication). Another important finding of this study was the 38% rate of cats that continued to show positive serology at 72 w.p.i. Kirkpatrick et al. (1984) obtained similar findings in cats experimentally infected with *L. chagasi* and *L. infantum*. Apparently, this seems to indicate a condition of occult infection (silent phase) rather than sterile healing. In this respect, the remaining cats of this study are currently under observation to determine the possible recurrence of cutaneous lesions. In addition to feline TL, the high rate of infection with feline leukemia virus (69.2%) among the experimental cats of this study should be considered regarding the probability of recurrence. According to previous studies on murine models, coinfection with murine leukemia virus (MLV) and *L. major* showed an important worsening of the outcome of the disease (Barral-Netto et al., 1995). It is possible that, like MLV and HIV, feline immunodeficiency virus (FIV) and FeLV as well as other feline myeloproliferative diseases and senility may be also able to promote TL recurrence in cats.

In conclusion, domestic cats provide an animal model that is partially susceptible to experimental infection with *L. braziliensis*. Cats showed chronic clinical manifestations, anti-*Leishmania* antibody titers, lesions harboring parasites, and spontaneous healing of the lesions. Our data and other findings in the literature allow us to speculate that domestic cats have all the properties needed to serve as potential reservoirs of *Leishmania*. Thus, further epidemiological studies are necessary to determine the real role of cats in the transmission of leishmaniasis in endemic areas. In addition, experimental studies on feline models infected with several *Leishmania* species may contribute to the knowledge of natural FL.

Acknowledgements

The studies concerning Feline Leishmaniasis conducted by our group are supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico—FUNCAP (Process number 419/02) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência—PRONEX/CNPq. We wish to thank CNPq and FUNCAP for fellowships. We are also indebted to our collaborator Dr. Dilmara Reischak, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, for the FeLV survey and

to Dr. Sergio Franco, Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza (Ceará, Brazil), for his generous cooperation. We are particularly grateful to our long-term private initiative collaborators at Vetbrands Saúde Animal, Purina, IAMS, Gireze Ltda, Intervet, and Shering-Plough.

References

- Amaral, V.F., Teva, A., Porrozzì, R., Silva, A.J., Pereira, M.S., Oliveira-Neto, M.P., Grimaldi Jr., G., 2001. *Leishmania (Leishmania) major*-infected Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) develop varying levels of resistance against homologous re-infections. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96, 795–804.
- Barnes, J.C., Stanley, O., Craig, T.M., 1993. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. JAVMA 202, 416–418.
- Barral-Netto, M., Santana da Silva, J., Barral, A., Reed, S., 1995. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. Am. J. Pathol. 146, 635–642.
- Belkaid, Y., Hoffmann, K.F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M.C., Wynn, T.A., Sacks, D.L., 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J. Exp. Med. 194, 1497–1506.
- Bez, M., 1992. La leishmaniose chez le chat, enquête séro-épidémiologique dans les Alpes-maritimes. These Docteur Vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, France, 1992, 119 pp.
- Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M.T., Garófalo, M.M., Urdaneta, I., Urdaneta, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H., Grimaldi Jr., G., 1996. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. Revista Científica, FCV-LUZ 6, 187–190.
- Costa, J.M.L., Vale, K.C., França, F., Saldanha, A.C.R., Silva, J.O., Lago, E.L., Marsden, P.D., Magalhães, A.V., Silva, C.M.P., Neto, A.S., Galvão, C.E.S., 1990. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 23, 205–208.
- Costa Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J., Simões, G., 1994. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar. RPCV 89, 140–144.
- Craig, T.M., Barton, C.L., Mercer, S.H., Droleskey, B.E., Jones, L.P., 1986. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. Am. J. Trop. Hyg. 35, 1100–1102.
- Desjeux, P., 2002. Urbanisation of the leishmaniasis Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum, Spain, Sevilla, pp. 49–55.
- Evans, T.G., Vasconcelos, I.A.B., Lima, J.W.O., Teixeira, M.J., McNeill, I., Lopes, U.G., Person, R.D., Vasconcelos, A.W., 1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assess-

- ment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 118–123.
- Grimaldi Jr., G., 1982. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 77, 195–215.
- Hervás, J., De Lara Chacón-M, F., Sánchez-Isarria, M.A., Pellicer, S., Carrasco, L., Castilho, J.A., Gómez-Villamandos, J.C., 1999. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniasis in Spain. *J. Feline Med. Surg.* 1, 101–105.
- Johnson, R.N., Ngunbi, P.M., Nwanyumba, J.P., Roberts, C.R., 1993. Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. *Med. Vet. Entomol.* 7, 216–218.
- Kirkpatrick, C.E., Farrell, J.P., Goldschmidt, M.H., 1984. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp. Parasitol.* 58, 125–131.
- Laruelle-Magalon, C., Toga, I., 1996. Un cas de leishmaniose féline. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 31, 255–261.
- Machattie, C., Mills, E.A., Chadwick, C.R., 1931. Naturally occurring oriental sore of the domestic cat in Iraq. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 25, 103–106.
- Marechal, M., 1993. La leishmaniose féline: cas sporadique ou réalité encore ignorée? (étude dans la région Marseillaise). Thèse Docteur Vétérinaire. Université Claude Bernard, Lyon, France (68 pp.).
- Mello, G.B., 1940. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. *Bras. Méd.* 54, 180.
- Momen, H., Grimaldi Jr., G., Pacheco, R.S., Jaffe, C.L., McMahon-Pratt, D., Marzochi, M.C.A., 1985. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Hyg.* 34, 1076–1084.
- Ogosuku, E., Perez, J.E., Paz, L., Nieto, E., Monje, J., Guerra, H., 1994. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 88, 329–335.
- Oliveira-Lima, J.W., 1996. Transmission of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Ph.D. thesis, Harvard School of Public Health, Boston, USA, 152 pp.
- Ozon, C., Marty, P., Pratlong, F., Breton, C., Blein, M., Levièvre, A., Haas, P., 1998. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania* infection in southern France. *Vet. Parasitol.* 75, 273–277.
- Passos, V.M.A., Lasmay, E.B., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O., Degraive, W., 1996. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais. *Braz. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 19–20.
- Pennisi, M.G., 1999. Case report of *Leishmania* spp. infection in two cats from Aeolian Archipelago (Italy). In: Proceedings of the 24th WSAVA Congress. Lyon 23rd 26th (on CD-ROM).
- Pirmez, C., Coutinho, S.G., Marzochi, M.C.A., Nunes, M.P., Grimaldi Jr., G., 1988. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro. *Braz. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 52–58.
- Quinnell, R.J., Courtney, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day, M.J., 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161–168.
- Schubach, A., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A.V., Sartori, A., Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M.S., Araújo, M.L., Souza, W.J.S., Haddad, F., Perez, M.A., Pacheco, R.S., Momen, H., Coutinho, S.G., Marzochi, M.C.A., Marzochi, K.B.F., Costa, S.C.G., 2001. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 987–996.
- Shaw, S.E., Birtles, R.J., Day, M.J., 2001. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *J. Feline Med. Surg.* 3, 193–209.
- Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Rodrigues, T.P., Prata-Júnior, J.R.C., Teixeira, M.J., Silva, T.F.P., Holanda, C.M., Pereira, B.S., Lopes, C.A.P., Pompeu, M.M.L., 2001. Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza (Ceará Brazil). *Ci. Anim.* 11, 79–81.
- Simões-Mattos, L., 2002. Estudo da infecção natural por *Leishmania chagasi* pela técnica de ELISA em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Fortaleza, Ceará. Monografia da Escola de Saúde Pública do Ceará 56.
- Simões-Mattos, L., Bevilacqua, C.M.L., Mattos, M.R.F., Pompeu, M.M.L., 2004. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? *RPCV* 99, 79–87.
- Sinagra, A., Riarte, A., Luna, C., Campanini, A., Segura, E.L., 1997. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 115–118.
- Sousa, A.Q., Parise, M.E., Pompeu, M.M.L., Vasconcelos, I.A.B., Coelho Filho, J.M., Oliveira, E.G., Vasconcelos, A.W., David, J.R., Maguire, J.H., 1995. Bubonic Leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará. *Braz. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 380–385.
- World Health Organization (WHO), 2004. Division of control of tropical disease. Available on line: URL: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>.

Anexo V

Artigo 5

Domestic cat (*Felis catus*) as potential reservoir host of *Leishmania* (*Viannia*)
braziliensis for *Lutzomyia migonei* and *L. whitmani* infection

Situação: em fase final de avaliação pelos co-autores do trabalho e será submetido ao
periódico Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

1 Domestic cat (*Felis catus*) as potential reservoir host of *Leishmania (Viannia) braziliensis*
2 for *Lutzomyia migonei* and *L. whitmani* infection

3

4

5 L. Simões-Mattos^{*1,2,a}, C.M.L. Bevilaqua^{1,a}, M.R.F. Mattos², F.M.O. Silva^{1,b}, I.T.F.
6 Macedo^{1,b}, P.T. Souza¹, C.L.B. Monteiro¹, R.N. de Sousa³, M.M.L. Pompeu⁴, J.W.
7 Oliveira-Lima³

8

9 ¹ Faculdade de Veterinária (FAVET), Programa de Pós-Graduação em Ciências
10 Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ceará, Brasil.

11 ² Escola Superior de Ciências Humanas, Físicas e Biológicas do Sertão (ESSER),
12 Fundação Universidade Estadual de Alagoas (FUNESA), Alagoas, Brasil.

13 ³ Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), Ceará, Brasil

14 ⁴ Núcleo de Medicina Tropical (NMT) - Faculdade de Medicina (FM) – Universidade
15 Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brasil.

16 ^a CNPq fellowship.

17 ^b FUNCAP fellowship.

18

19 *Corresponding author: Universidade Estadual do Ceará - Faculdade de Veterinária –
20 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Av. Paranjana, 1700 – Fortaleza –
21 Ceará – Brazil - CEP 60.740-000. Tel.: +55-85-299-2760. Fax: +55-85-299-2740. E-mail
22 address: lsmattos@yahoo.com

23

24

25 *Keywords:* Cat, *Leishmania*, reservoir host, phlebotomine, xenodiagnosis, host preference,
26 engorgement.

1 **1. Introduction**

2 Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) are vectors of *Leishmania*
3 (Trypanosomatidae: Kinetoplastida), a protozoan parasite that cause leishmaniasis in
4 human beings and animals. The parasite transmission to the hosts occurs by the bite of
5 infected phlebotomine. This event normally occurs by bloodmeal requirement of female
6 phlebotomine to obtain protein for egg production. Thereby, some species of *Phlebotomus*
7 in Old World, and *Lutzomyia* in New World, are implicated as vectors of *Leishmania* spp.

8 The literature lists several domestic and wild animals as potential hosts reservoir of
9 *Leishmania* to human beings (WHO/BDT, 2005). For some forms of the diseases, the
10 domestic dogs are implicated as the main reservoir hosts in many Latin American countries
11 and Mediterranean subregion. However, some evidences have shown the probability of
12 cats to be reservoir hosts in endemic foci (Pennisi, 2002; Simões-Mattos et al., 2001;
13 Simões-Mattos, 2002), mainly by the reports of natural feline leishmaniasis (FL) and the
14 high prevalence of both serological and parasitological findings of *Leishmania* infection in
15 cats (Simões-Mattos et al., 2001; Killick-Kendrick, 2002; Pennisi, 2002; Simões-Mattos,
16 2002; Simões-Mattos et al., 2004). These evidences may be supported by the hypothesis
17 that this animal specie is attractive and that it serves as blood meal sources for
18 phlebotomine sandflies. However, very few works included the domestic cat (*Felis catus*)
19 in methodology survey with the purpose to know the attractiveness by study of
20 phlebotomine sandflies feeding (El Sawaf et al., 1989; Johnson et al., 1993; Ogosuku et al.,
21 1994; Colmenares et al., 1995). In addition, to our knowledge, only one study mentioned
22 the blood meal rate of phlebotomine when in contact with *Leishmania* no-infected cat in
23 laboratory condition (Sánchez et al., 2000). Furthermore, no work studied the capacity of
24 vector to infection with *Leishmania* from infected cats by the using of xenodiagnosis. For
25 Pennisi (2002) and Macianti (2004), the xenodiagnosis is the test that can definitely to
26 clear the epidemiological role of this animal species.

1 Thus, the purpose of this study was to evaluate the capacity and competence of
2 phlebotomine sandflies for protozoa infection after contact with infected and no-infected
3 cats as well as to evaluate their host feed preference.

4 5 **2. Materials and methods**

6 *2.1. Sandfly colony*

7 First generation laboratory-bred *Lutzomyia migonei* were used for engorgement rate
8 and xenodiagnosis evaluation from colony established and replenished with sandflies
9 caught in Pacoti council (Ceará State, Brazil). The colony was maintained at 70% relative
10 humidity and 25-26°C (BOD) at Laboratory of Entomology of Fundação Nacional da
11 Saúde (FUNASA/CE, Brazil).

12 13 *2.2. Engorgement rate*

14 Ten *Leishmania* no-infected adult intact undefined breed cats (*Felis catus*) were
15 used in this trial being five queens (body weight 2.5 to 4.8 Kg), and five toms (3.5 to 5.8
16 Kg). For procedure, the cats were sedated with 1% acepromazine (Acepran[®] - Univet S.A.,
17 São Paulo, S.P., Brazil), 1mg/Kg body weight, and anesthetized with 10% ketamine
18 (Dopalen[®] supplied by Vetbrands Saúde Animal[®] – Paulínia, S.P., Brazil), 15 mg/Kg body
19 weight. The whole body of the cats was placed into individual cages (45 × 40 × 20 cm)
20 sheathed in sandfly-proof netting. For each feeding, about one hundred sandflies, being 75
21 unfed female sandflies (2-3 days after emergence) and approximately 25 male sandflies,
22 were introduced into the cage and were allowed to feed for 2 hours in total darkness.
23 Approximately each 30 minutes, the cage was slightly exposed to observe the sandflies
24 behaviour. On end of time, a manufactured aspirator recovered the all sandflies and they
25 were replaced to other cage with sugar solution provided ad libitum and were maintained at

1 70% relative humidity and 25-26°C (BOD) for two days when ingurgitated sandflies were
2 measured.

3

4 2.3. *Xenodiagnosis*

5 Similar procedure for engorgement rate evaluation was also performed in five
6 *Leishmania braziliensis*-infected cats, being three queens (body mean weight 2.1 Kg), and
7 two toms (body mean weight 3.7 Kg). Briefly, before xenodiagnosis procedure, the cats
8 were injected with 1×10^7 stationary phase of *L. braziliensis* promastigotes in 20 μ l of
9 sterile saline. The animals were inoculated intradermally with 50- μ L Hamilton disposable
10 syringes, in the center of the internal surface of the left ear (Silva et al., 2004). The
11 xenodiagnosis was performed at different times of *Leishmania*-infection in all cats by
12 using from 50 to 150 phlebotomine sandflies (75% females). Only head of each animal
13 was placed into individual cages (45 \times 40 \times 20 cm) sheathed in sandfly-proof netting. The
14 phlebotomine sandflies were also allowed to feed on cats for 2 hours in total darkness.
15 After this procedure, these dipterous were maintained in BOD in the same conditions
16 above for six days. After on, the survival sandflies were dissected and examined for visible
17 promastigotes in the gut under \times 100 magnification (especificações microscópio FNS).

18

19 2.4. *Host preference (attractiveness)*

20 This evaluation was performed in a field condition of an endemic area for
21 cutaneous leishmaniasis due *L. (Viannia) braziliensis*-infection, in Pacoti council (Ceará
22 State, Northeastern Brazil). This area is included in a hilly complex of Baturité, and it is
23 composed by primary and/or secondary tropical rainforest. The chosen focus was close of a
24 house where several persons had the cutaneous form of the disease. In this focus there were
25 many fruitful trees such as mango, banana, lemon, coconut and coffee, as well as several
26 domestic animals as swine, chickens, dogs, cats and substantial evidence of rodent activity

1 and harbors a large population of *Lutzomyia* sp. We selected a 40 m long section of the
2 house for our study. Four positions were established within this section, approximately 5 m
3 apart. Disney traps, without light bulbs, were suspended upside down 1 m above floor.
4 Each cage contained a potential host or the empty cage control. The following animals
5 were used as bait: one dog (*Canis familiaris*), one cat (*Felis catus*) and one rodent, the
6 rato-de-junco (*Holochilus brasiliensis*). Traps were run for one session of four consecutive
7 nights and animal rotation was accomplished for each night to avoid the local influence.
8 The traps were set up approximately 1 h before sunset and dismantled approximately 2h
9 after sunrise. In the morning, dead sandflies were removed from oil in the aluminum tray
10 with a fine needle. By using of stereomicroscopic, female sandflies were identified by the
11 morphology of the spermathecae and cibarium; and males sandflies by external genitalia.
12 The classification system was accomplished according Martins et al. (1978).

13

14 2.5. Data analyses

15 The number of engorged female phlebotomine sandflies was transformed in
16 percentage and expressed as mean and standard error of mean.

17

18 3. Results

19 The engorgement rate of phlebotomine sandflies observed in this trial was $95.7 \pm$
20 2.4% (76.7-100). The recording concerning to the sandflies behavior in contact with cats
21 seems to be clear that there was a predilection by rest on limbs and head, especially ear,
22 nose and lip. However, when male cats were seen, the scrotum seemed also to be an
23 important place for the resting of the dipterous. In addition, male phlebotomine sandflies
24 were also seen mating on all these locals of the cats.

25 At the moment of xenodiagnosis test, all infected cats had ear lesion as papule or
26 nodule. From 20 to 90 days post-infection (p.i.), a minimum of three and maximum of

1 five-xenodiagnosis were accomplished on each cat. From all cats, a total of 796 sandflies
2 was assayed for active flagellates forms, packing the whole gut, including the ileum and
3 Malpighian tubules. Active promastigotes forms were seen in the gut of one out of 224
4 phlebotomine sandflies in xenodiagnosis from one infected cat at 2½-month p.i. that
5 showed a great nodule with a measurement of 2,6 cm².

6 The preliminaries findings of field trial about phlebotomine host preference (baits)
7 are listed in the table 1. All baits had attracted phlebotomine sandflies and in the traps of
8 the three animals, at least one engorgement sandfly (Figure 1) was found. However, the
9 number of engorged vectors was higher in cat trap (60%) than dog trap (3.5%). It is
10 important to point out that the host's body surface was not considerate in this trial and
11 *Lutzomyia whitmani* is the main captured phlebotomine specie.

12

13 **4. Discussion**

14 The supposition of the role of domestic cats as *Leishmania*-reservoir hosts in some
15 endemic foci for leishmaniasis has been urged, mainly due to the serological,
16 parasitological and clinical recent evidences in endemic foci (Killick-Kendrick, 2002;
17 Pennisi, 2002; Mancianti, 2004; Simões-Mattos et al., 2004). However, indispensable
18 requirements must be considerate to contemplate an animal species as reservoir host for
19 diseases of indirect cycle: (a) to be found natural cases of bioagent infection; (b) to be
20 susceptible to experimental reproduction of the infection and harbor the infective bioagent
21 for a period; (c) to be attractive for the vector and able to infect it. Thus, each of these
22 considerations must be true in cases of *Leishmania*-infection in cats to incriminate this
23 animal specie as reservoir host.

24 In this respect, there is a long time that natural cases of FL are already occurring
25 (Simões-Mattos et al., 2004). In last few years, these cases have emerged, mainly in Brazil
26 (Passos et al., 1996; Savani et al., 2004; Schubach et al., 2004; de Souza et al., 2005),

1 Venezuela (Bonfante-Garrido et al., 1991 and 1996), France (Ozon et al., 1998), Italy (Poli
2 et al., 2002; Pennisi, 2004), Portugal (Costa Durão et al., 1994) and Spain (Hervás et al.,
3 1999; Leiva et al., 2005).

4 In the attempt to know better the outcome of FL, experimental reproduction of
5 visceral leishmaniasis in cats, at least for 16 weeks, was obtained (Kirkpatrick et al.,
6 1984). Current studies by using of dermatropic protozoa (*Leishmania braziliensis*) had
7 reliable results with cutaneous manifestations in cats similar to the humans and canines
8 natural cases of American Cutaneous Leishmaniasis (Silva et al., 2004; Simões-Mattos et
9 al., 2005). In addition, in these studies, viable amastigotes forms were isolated in culture
10 medium from cats' lesions (Simões-Mattos et al., 2005).

11 It is clear the attraction of cats to the vector and this may be proven by occurrence
12 not only by natural cases of the disease, as well as by serological and parasitological
13 epidemiologic investigations in several studies (Pennisi, 2002, Mancianti, 2004; Simões-
14 Mattos et al., 2004). In addition, works about host-preference of which cats were included
15 in the trial showed that they were bitten by phlebotomine in field condition (El Sawaf et
16 al., 1989; Johnson et al., 1993; Ogosuku et al., 1994; Colmenares et al., 1995). In addition,
17 they have appetite for cat's blood in laboratory condition (Sánchez et al., 2000). Our study
18 also proved, with high engorgement rate (95.74 ± 2.37) of phlebotomine sandflies, that cats
19 are viable feeding source for them. In our laboratory, for example, hamster (*Mesocricetus*
20 *auratus*) is an usual animal for maintenance of sandflies colonies. Interestingly, we note
21 better ovoposition, eclosion and survival rates of these dipterous when they were fed with
22 cats' blood than with hamsters' blood in the same conditions (data not shown).

23 During the evaluation of engorgement rate of phlebotomine sandflies, we observed
24 that they had a predilection to carry out the rest in limbs, scrotum and head, especially in
25 the ear, nose and lips. In wide literature review about all aspects concerning natural FL
26 occurred in the world, the highest frequency of the cutaneous lesions in this specie was

1 seen in head, particularly, nose, ear and ocular area (Simões-Mattos et al., 2004). Limbs
2 and lips had low prevalence of lesions and scrotum had never been recorded. On the
3 contrary, as shown by others (Madeira et al., 2003), we have also observed that the
4 scrotum is usually affected in natural cases of cutaneous leishmaniasis in dogs in the hilly
5 of Baturité.

6 There is a long time it is known that dogs are the main *Leishmania*-reservoir hosts
7 for human transmission. In field trial, the vectors had fed in cat (50%) and in dog (3.6%).
8 These results denote the potentiality of feline specie to be infected.

9 Finally, the last and the most important requirement for an animal to be
10 incriminated as reservoir-host is its capacity to transmit the bioagent to the vector. This
11 event may be proven by xenodiagnosis. In this way, our study accomplished the
12 xenodiagnosis for the first time in *Leishmania*-infected cat and in which the vector
13 becomes infected. As the field studies had shown that is very low the number of infected
14 phlebotomine in nature (Queiroz et al., 1994), to find one infected vector out of 796
15 assayed shows the capacity of this animal specie to transmit *Leishmania* (*Viannia*)
16 *braziliensis* to the vector *Lutzomyia migonei*.

17 Considerably, the domestic cats are source of feeding for *L. migonei* and *L.*
18 *whitmani* when they are infected by *L. (V.) braziliensis* may transmit it to the *L. migonei*.
19 Thus these findings allow us to suspect that cats are potential reservoir hosts of *L. (V.)*
20 *braziliensis*. On the other hand, studies are necessary to evaluate the epidemiologic role of
21 cats in *Leishmania* cycle, especially when control strategies are considerate. The data
22 obtained until to now show clear evidences among the many obscures points that surround
23 the cats in several aspects of the leishmaniasis.

24

1 **Acknowledgements**

2 The studies concerning Feline Leishmaniasis accomplished by our group were
3 supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
4 – FUNCAP (Process number 419/02) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência –
5 PRONEX/CNPq. We wish to thank CNPq and FUNCAP for fellowships. We are
6 particularly grateful to ROYAL CANIN for supplying of cats' food.

7

8 **References**

- 9 Bonfante-Garrido, R., Urdaneta, I., Urdaneta, R. and Alvarado, J., 1991. Natural infection
10 of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.
11 85, 53.
- 12 Bonfante-Garrido, R., Valdivia, O., Torrealba, J., García, M.T., Garófalo, M.M.,
13 Urdaneta, I., Urdaneta, R., Alvarado, J., Copulillo, E., Momen, H., Grimaldi-Jr., G.,
14 1996. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania*
15 (*Leishmania*) venezuelensis. Revista Científica, FCV-LUZ 6, 187-190.
- 16 Colmenares, M., Potús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G.,
17 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera:
18 Psychodidae) in Spain by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
19 Biotin/Avidin Method. J. Med. Entomol. 32, 229-233.
- 20 Costa Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J., Simões, G., 1994. Primeiro
21 caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em
22 Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar. RPVC 89, 140-144.
- 23 de Souza A.I., Barros, E.M., Ishikawa, E., Ilha, I.M., Marin, G.R., Nunes, V.L., 2005.
24 Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do
25 Sul State, Brazil. Vet. Par. 128, 41-45.

- 1 El Sawaf, B.M., Mansour, N.S., El Said, S.M., Daba, S., Youssef, F.G., Kenawy, M.A.,
2 Beier, J.C., 1989. Feeding patterns of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus*
3 *langeroni* (Diptera: *Psychodiade*) in El Agamy. Egypt. J. Med. Entomol. 6, 497-498.
- 4 Hervás, J., Chacun-M De Lara, F., Sánchez-Isarria, M.A., Pellicer, S., Carrasco, L.,
5 Castilho, J.A., Gomez-Villamandos, J.C., 1999. Two cases of feline visceral and
6 cutaneous leishmaniasis in Spain. J. Feline Med. Surg. 1, 101-105.
- 7 Johnson, R.N., Ngunbi, P.M., Nwanyumba, J.P., Roberts, C.R., 1993. Host feeding
8 preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya.
9 Med. Vet. Entomol. 7, 216-218.
- 10 Killick-Kendrick, R., 2002. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In:
11 Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla,
12 Spain, 2002. p.5.
- 13 Leiva, M., Lloret, A., Pena, T., Roura, X., 2005. Therapy of ocular and visceral
14 leishmaniasis in a cat. Vet. Ophthalmol. 8, 71-75.
- 15 Madeira, M.F., Uchôa, C.M.A., Leal, C.A., Silva, R.M.M., Duarte, R., Magalhães, C.M.,
16 Serra, C.M.B., 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente
17 infectados. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36, 551-555.
- 18 Mancianti F., 2004. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?
19 Parassitologia. 46, 1-2, 203-206.
- 20 Martins, A.V., Williams, P., Falcão, A.L., 1978. American sandflies (Diptera,
21 Psychodidae, Phlebotominae). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro,
22 Brazil. 195 pp.
- 23 Ogosuku, E., Perez, J.E., Paz, L., Nieto, E., Monje, J., Guerra, H., 1994. Identification of
24 bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. Ann. Trop. Med. Parasit. 88, 329-335.
- 25 Passos, V.M.A., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O., Degrave, W., 1996.
26 Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in

- 1 the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst.
2 Oswaldo Cruz 91, 19-20.
- 3 Pennisi, M.G., 2002. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. Canine
4 leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International
5 of the Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, 2002. 39-48.
- 6 Pennisi, M.G., Venza, M., Reale, S., Vitale, F., Lo Giudice, S., 2004. Case report of
7 leishmaniasis in four cats. Vet. Res. Commun. 28, 363-366.
- 8 Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Mancianti, F.,
9 2002. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. Vet. Parasitol. 106,
10 181-191.
- 11 Queiroz, R.G., Vasconcelos, I.A.B., Vasconcelos, A.W., Pessoa, F.A.C., Sousa, R.N.,
12 David, J.R., 1994. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in Northeastern Brazil:
13 incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera Psychodidae) as a vector of
14 *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 6, 693-
15 698.
- 16 Sánchez, M.A., Hervás, H., Chacón, F., Gómez, J.C., Luicentes, J., Castrillo, J., Pérez,
17 R., Pascual, F., 2000. Evaluación del gato común (*Felis catus domesticus*) como
18 reservorio de la leishmaniose en la cuenca mediterranea. Pequeños animales 24, 46-
19 54.
- 20 Savani, E.S.M.M., Camargo, M.C.G.O., Carvalho, M.R., Zampieri, R.A., Santos, M.G.,
21 D'Áudria, S.R.N., Shaw, J.J., Floeter-Winter, L.M., 2004. The first record in the
22 Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in
23 domestic cat (*Felis catus*) from Cotia county, São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol 120,
24 229-233.
- 25 Schubach, T.M.P., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Madeira, M.F., Santos, I.B., Andrade,
26 M.V., Cuzzi, T., Marzochi, M.C.A., Schubach, A.O., 2004. American cutaneous

- 1 leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection
2 with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98, 165-167.
- 3 Silva, F.M.O.; Simões-Mattos, L.; Bevilaqua, C.M.L.; Mattos, M.R.F.; Macedo, I.T.F.;
4 Souza, P.T.; Monteiro, C.L.B; Frutuoso, M.S.; Bastos, K.M.S.; Coêlho, I.C.B.;
5 Oliveira-Lima, J.W.; Pompeu, M.M.L., 2004. Leishmaniose felina experimental. Rev.
6 Bras. Parasitol. Vet. 13, 1, 237.
- 7 Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F., Rodrigues, T.P., Prata-Júnior, J.R.C., Teixeira, M.J.,
8 Silva, T.F.P., Holanda C.M., Pereira, B.S., Lopes, C.A.P., Pompeu, M.M.L., 2001.
9 Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of
10 Fortaleza (Ceará, Brazil). Ci. Anim. 11, 79-81.
- 11 Simões-Mattos, L., 2002. Estudo da infecção natural por *Leishmania chagasi* pela técnica
12 de ELISA em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Fortaleza, Ceará.
13 Monografia. Escola de Saúde Pública do Ceará. 56p.
- 14 Simões-Mattos, L., Mattos, M.R.F, Teixeira, M.J., Oliveira-Lima, J.W., Bevilaqua,
15 C.M.L., Prata-Junior, R.C., Holanda, C.M., Rondon, F.C.M., Bastos, K.M.S., Coelho,
16 Z.C.B., Coelho, I.C.B., Barral, A., Pompeu, M.M.L., 2005. The susceptibility of
17 domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*.
18 Vet. Parasitol. 127, 3-4, 199-208.
- 19 World Health Organization (WHO), 2005. Division of Control of Tropical Disease [on
20 line]. available on line: URL: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>.
- 21
22
23
24

1 Table. Phlebotomine specie and potential reservoir hosts in field trial accomplished in the
 2 Pacoti council, Ceará State in Northeastern Brazil.

Phlebotomine species	Baits										Total
	Dog		Cat		Rodent		Blank		Total		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<i>L. whitmani</i>	0	14	0	8*	0	1§	1	1	1	24	25
<i>L. migonei</i>	5	2	0	2†	0	0	0	0	5	4	9
<i>L. shannoni</i>	0	5†	0	0	0	0	0	0	0	5	5
<i>L. wellcomei</i>	2	7	0	0	0	0	0	0	2	7	9
Total	7	28	0	10	0	1	1	1	8	40	48
	35		10		1		2		48		

3 † One engorgement phlebotomine sandfly. * Five engorgement phlebotomine sandflies. §

4 Engorgement phlebotomine sandfly.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

1 **Figures**

2

3

4

5

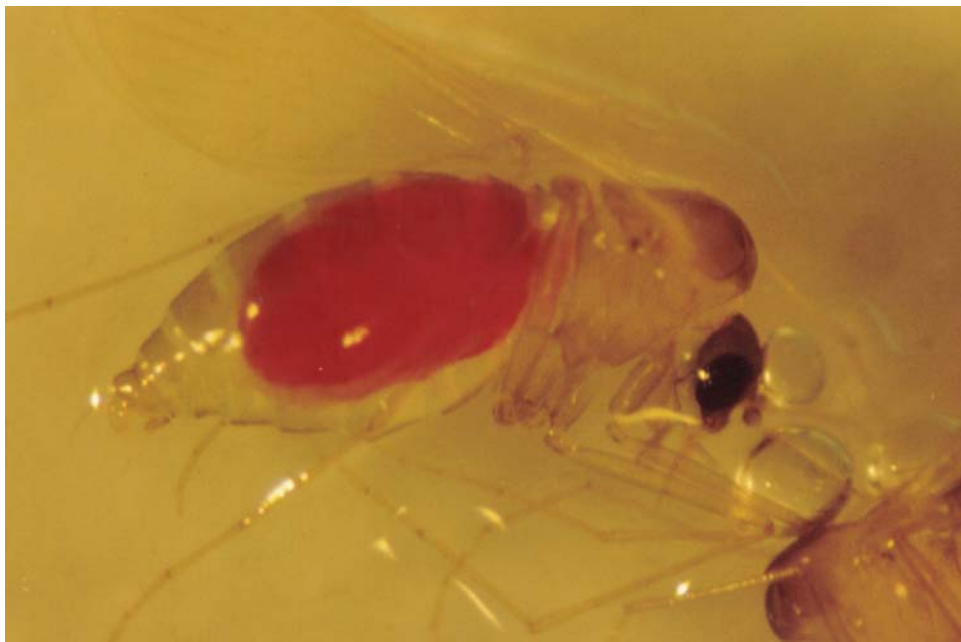
6

7

8

9

10



11

12 Figure 1. Female phlebotomine sandfly engorged soon after of to
13 accomplish the blood meal in *Leishmania*-no infected cat during two
14 hours.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Anexo VI

Resumo 1

Leishmaniose Felina Experimental

Situação: publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

v. 13, p. 237, 2004

LEISHMANIOSE FELINA EXPERIMENTAL

F.M.O. Silva¹; L. Simões-Mattos^{*1}; C.M.L. Bevilaqua¹; M.R.F. Mattos¹; I.T.F. Macedo¹; P.T. Souza¹; C.L.B. Monteiro¹; M.S. Frutuoso²; K.M.S. Bastos¹; I.C.B. Coêlho²; J.W. Oliveira-Lima¹; M.M.L. Pompeu²

1. Universidade Estadual do Ceará

2. Universidade Federal do Ceará

*ismattos@yahoo.com

A Leishmaniose Felina (LF) tem sido uma enfermidade considerada de rara ocorrência. Entretanto, nos últimos dez anos, houve um aumento no número de casos de LF no mundo, incluindo o Brasil. Porém, a evolução da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L.b.*) em gatos não é bem conhecida. Neste trabalho, foram observadas as manifestações clínicas de gatos experimentalmente infectados com *L.b.* Assim, 36 animais adultos foram distribuídos nos grupos G1 (infectado, n=18) e G2 (controle, n=18), tendo sido observados até 5 meses pós-infecção (p.i.). O G1 foi inoculado com 10^7 promastigotas de *L.b.*, via intradérmica, na parte interna da orelha esquerda. As áreas das lesões foram calculadas quinzenalmente pela fórmula $\pi r_1 r_2$. O surgimento de lesão ocorreu em 16 dos 18 gatos infectados (88,9%) no período entre 15 e 60 dias p.i. As lesões iniciaram como pápulas eritematosas em 14 gatos (77,8%), com tamanho médio de $4,46 \pm 1,25 \text{ mm}^2$, sendo que em cinco deles, na 10ª semana p.i., estas evoluíram para nódulo ($75,63 \pm 11,76 \text{ mm}^2$). Observou-se disseminação local, com formação de pápulas satélites em sete animais (38,9%), sendo que em quatro deles, as pápulas se fusionaram, aumentando o tamanho da lesão. Aos 4 meses p.i., as lesões atingiram seu tamanho máximo ($153,4 \pm 51,29 \text{ mm}^2$), e a partir de então decresceram ($103,2 \pm 40,4 \text{ mm}^2$). Durante o experimento, apenas um gato teve cura espontânea da lesão aos 3½ meses p.i. Houve aumento do linfonodo de drenagem em todos os gatos. Diante dos achados, concluímos que gatos são suscetíveis à infecção por *L. braziliensis* desenvolvendo quadro clínico semelhante aos de hospedeiros já conhecidos.

Anexo VII

Resumo 2

Comportamento alimentar de flebotomíneos em contato com gatos domésticos não infectados por *leishmania sp*

Situação: publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

v. 13, p. 344, 2004

COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE FLEBOTOMÍNEOS EM CONTATO COM GATOS DOMÉSTICOS NÃO INFECTADOS POR *Leishmania sp*

F.M.O. Silva¹; L. Simões-Mattos^{*1}; C.M.L. Bevilaqua¹; M.R.F. Mattos¹; I.T.F. Macedo¹; P.T. Souza¹; C.L.B. Monteiro¹; R.N. de Sousa²; I.C.B. Coêlho²; M.M.L. Pompeu²; J.W. Oliveira-Lima¹

1. Universidade Estadual do Ceará

2. Universidade Federal do Ceará

*lsmattos@yahoo.com

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos que transmitem o protozoário *Leishmania spp* a homens e animais, causando as leishmanioses. Apesar dos cães serem considerados os principais reservatórios peridomésticos, relatos de casos de enfermidade e altas taxas de infecção em gatos pelo protozoário demonstram que os vetores realizam o repasto nesta espécie animal. Porém, pouco se conhece sobre o comportamento alimentar de flebotomíneos quando em contato com gatos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as taxas de ingurgitamento e comportamento de *Lutzomyia migonei* em contato com gatos não infectados por *Leishmania sp* em condições laboratoriais. Assim, dez animais adultos (fêmeas/machos) foram colocados em gaiolas teladas individuais, contendo aproximadamente 100 flebotomíneos (75 fêmeas/25 machos) por 1½ hora, na penumbra. A cada 30 minutos verificou-se o comportamento dos flebotomíneos utilizando-se luz artificial. Ao final, estes foram mantidos em estufa a 26 °C, 70% de umidade por dois dias, sendo após, contado o número de fêmeas ingurgitadas. Os dados foram transformados em percentagem e expressos como média (\pm EPM) e submetidos ao teste T Student ($p < 0,05$). A taxa média de ingurgitamento foi de $95,74 \pm 2,37\%$, não havendo diferença estatística entre gatos machos e fêmeas ($95,04 \pm 1,37\%$ e $93,44 \pm 4,57\%$, respectivamente). Quanto ao comportamento, verificou-se predileção dos flebotomos por membros, cabeça (orelhas, nariz e lábios) e região escrotal dos gatos, observando-se ainda a cópula de alguns flebotomíneos. Assim concluímos que gatos são atrativos e servem como fonte alimentar para flebotomíneos.

Anexo VIII

Resumo 3

Gatos domésticos como reservatórios de *Leishmania braziliensis*

Situação: publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

v. 13, p. 237, 2004

GATOS DOMÉSTICOS COMO RESERVATÓRIOS DE *Leishmania braziliensis*

L. Simões-Mattos^{*1}; F.M.O. Silva¹; C.M.L. Bevilaqua¹; M.R.F. Mattos¹; I.T.F. Macedo¹; P.T. Souza¹; C.L.B. Monteiro¹; R.N. de Sousa²; I.C.B. Coelho²; M.M.L. Pompeu²; J.W. Oliveira-Lima¹

1. Universidade Estadual do Ceará

2. Universidade Federal do Ceará

*lsmattos@yahoo.com

Diante da urbanização da leishmaniose, associada ao fato desta doença em cães ser prevenida com colares à base de deltametrina, outras espécies domésticas podem tornar-se infectadas e serem incluídas no ciclo de transmissão da enfermidade. Além disso, diante dos relatos das altas taxas de infecção de gatos por *Leishmania* spp, especula-se o papel destes como reservatórios do protozoário. O xenodiagnóstico aplicado em gatos infectados seria a única técnica eficiente para elucidar tal suspeita. Não é de nosso conhecimento a existência de trabalhos utilizando o xenodiagnóstico em gatos com este propósito, sendo este o objetivo desta pesquisa. Foram utilizados cinco gatos experimentalmente infectados na orelha com 10^7 promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, exibindo pápulas ou nódulos. Foram realizados um mínimo de três e máximo de cinco xenodiagnósticos por animal, no período entre 20 e 90 dias pós-infecção (p.i.). Apenas a cabeça dos gatos foi colocada em gaiola telada individual contendo entre 50-150 *Lutzomyia migonei* (75% de fêmeas) na penumbra, por duas horas. Ao final, os flebotomíneos foram mantidos em estufa a 26 °C, 70% de umidade, por seis dias, sendo após dissecados um total de 796, para pesquisa direta de formas promastigotas no tubo digestivo. Em xenodiagnóstico de um gato foram encontradas promastigotas em um flebotomíneo (1/224) aos 2½ meses p.i. Como os estudos de campo mostram que a prevalência de flebotomos infectados pelo método de dissecação é muito baixa, o fato de encontrar um deles infectado em 796 analisados mostra a relevância da capacidade desta espécie animal em transmitir *Leishmania braziliensis* para o vetor *Lutzomyia migonei*.

Anexo IX

Artigo 6

Cryptococcus neoformans em lesão nasal de um gato (*Felis catus*): implicações do isolamento da variedade *neoformans*, sorotipo A, no município de Baturité, Ceará (Brasil)

Situação: Submetido para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

***Cryptococcus neoformans* em lesão nasal de um gato (*Felis catus*): implicações do isolamento da variedade *neoformans*, sorotipo A, no município de Baturité, Ceará (Brasil)**

***Cryptococcus neoformans* in nasal lesion of a cat (*Felis catus*): implications of isolation of the *neoformans* variety, serotype A, in the Baturité town, Ceará (Brazil)**

Lucilene Simões-Mattos^{abf*}, Marcos Renato Franzosi Mattos^{acg}, Nélio Batista de Moraes^d, Claudia Maria Leal Bevilaqua^{af}, Fernanda Menezes de Oliveira e Silva^{ag}, Ivo Castelo Branco Coêlho^e, Margarida Maria de Lima Pompeu^e.

^aUniversidade Estadual do Ceará (UECE) – Faculdade de Veterinária (FAVET) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV); ^bFundação Universidade Estadual de Alagoas (FUNESA) – Escola Superior de Ciências Humanas, Físicas e Biológicas do Sertão (ESSER); ^cUniversidade Federal Rural de Pernambuco; ^dSecretaria da Saúde do Estado do Ceará; ^eUniversidade Federal do Ceará (UFC) - Faculdade de Medicina (FM) – Núcleo de Medicina Tropical (NMT); ^fBolsista CNPq; ^gBolsista FUNCAP. *Autor para correspondência: fone/fax: +55-82-3621-2247, e-mail: lsmattos@yahoo.com; endereço completo para correspondência: Universidade Estadual do Ceará (UECE). Faculdade de Veterinária (FAVET). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). Av. Paranjana, 1700, Fortaleza, Ceará, Brasil. CEP 60.740-100

Resumo

Na micologia veterinária são raras as informações de variedades e sorotipos de *Cryptococcus neoformans* limitando o conhecimento da distribuição de fungos zoonóticos patogênicos no Brasil. Relata-se o primeiro isolamento da variedade *neoformans*, sorotipo A, de lesão nasal de gato, abordando sua implicação em Saúde Pública do Estado Ceará.

Palavras-chaves: *Cryptococcus neoformans*, gato, criptococose, Saúde Pública.

Abstract

There are few information about varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* in veterinary mycology which restrain the knowledge of pathogenic zoonotic fungus distribution in Brazil. The first isolation of variety *neoformans*, serotype A, from nasal lesion of cat is reported and its implication in Public Health of the Ceará state.

Key-words: *Cryptococcus neoformans*, cat, cryptococosis, Public Health.

Cryptococcus neoformans é um importante fungo encapsulado zoopatogênico. Duas variedades deste fungo são tradicionalmente reconhecidas com base nas variabilidades ecológicas, epidemiológicas, fisiológicas e genéticas: variedade *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e a variedade *gattii* (sorotipos B e C)⁸. As fontes de reservatórios naturais da variedade *neoformans*, em especial, freqüentemente são fezes de pássaros, principalmente pombos (*Columba livia*). Entretanto, no norte e nordeste do Brasil já foram isoladas de árvores de vegetação tropical nativa^{6,3}.

A inalação da levedura não capsulada, encontrada na natureza, causa a criptococose que é uma micose sistêmica oportunista de homens e animais. As duas variedades têm sido encontradas infectando o homem, entretanto a *neoformans* acomete uma maior proporção de

peessoas imunocomprometidas⁹. Em gatos, a criptococose é a mais comum micose sistêmica, e mais de 80% dos casos, envolvem a cavidade nasal e sinus paranasais⁵. Apesar de alguns relatos, as informações sobre as variedades de *C. neoformans* que causam infecção em animais ainda são raras⁴. Além disso, mais escassos ainda são os relatos de isolamento do fungo de animais de companhia com a identificação do sorotipo. Assim, as insuficientes publicações com relação à micologia médica veterinária limitam o conhecimento da real distribuição de muitas das micoses zoonóticas em nosso país e de sua relação homem/animal. Baseados nestas afirmações, o objetivo deste trabalho foi relatar o primeiro caso de criptococose felina com isolamento da variedade *neoformans*, sorotipo A, registrado no Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. Neste relato serão discutidas as implicações deste caso na Saúde Pública do Estado.

MATERIAL E MÉTODOS

Caso clínico. Um gato macho, sem raça definida, de aproximadamente oito anos, nativo do município de Baturité (CE), nordeste do Brasil, foi encaminhado ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Fortaleza (CE) com suspeita clínica de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). O município de Baturité, localizado em região serrana do Estado, é considerado endêmico para LTA e em sua área rural há uma vasta vegetação nativa bem como a presença de árvores frutíferas, dentre elas, bananeiras, jaqueiras e mangueiras. O animal apresentava uma lesão nodular ulcerada na região dorsal do plano nasal medindo 10 x 6 cm caracterizada por uma massa circular, friável e de coloração róseo-avermelhada, protuindo da narina esquerda levando à obstrução completa, bem como da narina direita, com obstrução parcial (Figura 1). Também foram verificados linfadenopatia regional submandibular, caquexia, desidratação, pelagem opaca, alopecias multifocais, salivação intensa, desconforto nasal, estridor respiratório, engasgos e tosse.

Não foram obtidas informações sobre o tempo de evolução das manifestações clínicas. Diante de minuciosa avaliação clínica, foi levantada a suspeita de se tratar de um caso de criptococose, requerendo confirmação laboratorial.

Diagnóstico laboratorial. Após procedimento anestésico (xilasina-Anasedan[®] e ketamina-Dopalen[®]) o animal foi submetido à punção venosa e biópsia da lesão. O soro foi submetido à técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* segundo trabalhos prévios¹⁰. Parte dos fragmentos foi incluída em solução salina (0,9%) e encaminhados para isolamento em cultivo (Agar sangue + Schneider) de *Leishmania* sp. A outra parte foi destinada à análise micológica. Na micologia, em exame direto para a pesquisa de estruturas fúngicas, foi realizada homogeneização de material da lesão com uma gota de nigrosina (tinta da China). O isolamento, cultivo e quimiotipagem foram realizados como indicada pela literatura⁷.

RESULTADOS

As pesquisas de anticorpos anti-*Leishmania* sp no soro do animal e de *Leishmania* em cultivo resultaram negativas. Quanto aos testes micológicos, tanto o exame direto, como a cultura foram positivas para *C. neoformans*. Pelo exame direto foram visualizadas estruturas blastoconidiadas encapsuladas sugestivas de *Cryptococcus neoformans*, sendo as culturas positivas para *C. neoformans*. Pela quimiotipagem, o agente infectante foi identificado como *C. neoformans* variedade *neoformans* (LMM1071-IPEC/FIOCRUZ). A partir deste diagnóstico foi realizada a sorotipagem utilizando a técnica de aglutinação em lâmina (Kit Crypto Check Iatron RM 304-k (25), Iatron Laboratories, Tokio, Japão) que identificou o isolado como sorotipo A (fatores 1 e 7 positivos). Diante do diagnóstico e do

estado clínico do animal, o proprietário solicitou a eutanásia (realizada conforme resolução número 714 de 20/06/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária).

DISCUSSÃO

A criptococose tem sido uma das grandes preocupações em Saúde Pública mundial devido sua interação com pacientes imunocomprometidos, principalmente no caso dos aidéticos². Os diferentes sorotipos de cada variedade são baseados nos polissacarídeos capsulares que desempenham um importante papel na patogenicidade do fungo¹. Na região Nordeste, por exemplo, estudos comprovaram que apesar do sorotipo A ser menos prevalente, quando presente, encontrava-se associado a 87,5% dos pacientes aidéticos. No entanto, quando foram avaliados isolados ambientais, ambos sorotipos A e B encontravam-se em maior proporção em ocos de árvores e madeira deteriorada⁸. Especificamente no município de Baturité, as fontes ambientais de *Cryptococcus neoformans*, incluindo suas variedades, são desconhecidas, merecendo estudos.

A suspeita clínica primária de LTA felina foi baseada no aspecto da lesão associado ao fato do animal ser autóctone de região endêmica. Assim, fica claro que o diagnóstico laboratorial, com identificação do agente, é o que em última análise será conclusivo sobre a suspeita clínica primária. Embora a criptococose felina aqui relatada, tratar-se de um clássico caso clínico verificado nesta espécie animal¹¹, este diagnóstico serve como sinalizador da presença do patógeno em área, até então, livre da doença ou silenciosa. Vale ressaltar o alerta às autoridades do potencial risco de casos humanos de criptococose, associados ou não aos pacientes imunodeprimidos da região.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FUNCAP pelos fomentos das bolsas de pesquisa dos autores. Ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Fortaleza. A Dra. Márcia Lazéra

do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas de Pesquisa Clínica (IPEC/FIOCRUZ) pela sorotipagem do fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baró T, Torres-Rodríguez JM, Mendonza MH, Morera Y, Alía C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 36:458-461, 1998.
2. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33:75-78, 2000.
3. Fortes ST, Lazéra MS, Nishikawa MN, Macedo RCL, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44:137-140, 2001.
4. Hill FL. Cryptococcosis in a North Island Brown Kiwi (*Apteryx australis mantelli*) in New Zeland. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 33: 305-309, 1995.
5. Jacobs GJ, Medleau L. Cryptococcosis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, 2nd edition, W.B. Saunders, Philadelphia, p. 383-390, 1998.
6. Lazéra MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MN, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 38, 379-383, 2000.
7. Min KH, Kwon-Chung KJ. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 261:471-480, 1986.
8. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL,

- Bezerra CCF, Pérez MA, Cardarelli P, Wanke B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *Journal of Clinical Microbiology* 41:73-77, 2003.
9. Severo LC, Mattos Oliveira F, Londero AT. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. *Revista Iberoamericana de Micologia* 16:152-154, 1999.
10. Simões-Mattos L, Mattos MRF, Rodrigues TP, Prata-Júnior JRC, Teixeira MJ, Silva TFP, Holanda C.M., Pereira BS, Lopes CAP, Pompeu MML. Survey of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in stray cats (*Felis catus*) in the city of Fortaleza (Ceará, Brazil). *Ciência Animal*. 11, 79-81, 2001.
11. Wolf AM. Fungal disease of the nasal cavity of the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 22:1119-1132, 1992.



Figura 1. Grande massa granulomatosa na região dorsal do plano nasal com tecido de mesma característica protuindo da narina

Anexo X

Artigo 7

Primary cutaneous histoplasmosis in a domestic cat (*Felis catus*) from non-endemic area of the Ceará State, Brazil

Situação: em fase final de elaboração

Primary cutaneous histoplasmosis in a domestic cat (*Felis catus*) from non-endemic area of the Ceará State, Brazil

L. Simões-Mattos^{ab*}, C.M.L. Bevilaqua^{ab}, M.R.F. Mattos^a, M.M.L. Pompeu^c, I.C.B.^d Coêlho^c

^a Faculdade de Veterinária (FAVET) - Universidade Estadual do Ceará (UECE),

^bCNPq fellowship

^c Núcleo de Medicina Tropical (NMT) - Faculdade de Medicina (FM) – Universidade Federal do Ceará (UFC),
Ceará, Brasil

Introduction

Histoplasmosis is an important deep mycotic zoonosis and occasionally fatal disseminated disease, mainly in immunocompromised individuals such as AIDS patients. The casual agent, dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, in its saprobic mold form lives in soil enriched with bird and bat guano (Woods, 2002). Upon inhalation by a host of spore-containing dust from areas contaminated with bird or bat droppings is the primary route of infection for this disease (Hay, 1993). However, *H. capsulatum* infection for the skin and digestive tract is possible. In these situations, the disease become more serious than in cases whose penetration of the fungus had occurred for respiratory route (Goulart and Leite, 1978).

The incidence and prevalence data of histoplasmosis in domestic animals are unknown and primarily affects dogs (Clinkenbeard et al., 1988; Kowalewich et al., 1993; Campbell, 1994; Mackie et al., 1997; Kagawa et al., 1998), being uncommon in cats (Clinkenbeard et al., 1987; Wolf, 1992; Hodges et al., 1994; Davies and Troy, 1996).

To our knowledge, *H. capsulatum* has not been implicated previously as a causal etiologic agent of non-disseminated primary cutaneous histoplasmosis in cat. This report provides its first description as such in the tail of a domestic cat.

Case report. A 3-years-old male cat, native in Baturité council, Ceará State, Northeastern Brazil was investigated. The Baturité council is localized in mountain region and it is an endemic area for american tegumentary leishmaniasis (ATL). The cat had clinical suspicious of ATL due an ulcerated lesion in the tail and 6-month history of gradual weight loss. The animal lived in a house, which around vegetation was composed by banana, jackfruit and mango trees and native trees. Animals such as chickens, pigeon, goats, dogs and others cats were also seen. Not so far, there was many houses no inhabit, old building and caves that served as rest place for great amount of bats. The cat showed last 4 months, two ulcers in the tail near to the anus sizing approximately 1.5 x 2.0 cm. The animal was kept in our

responsibility in the dependences of Núcleo de Medicina Tropical of Universidade Federal do Ceará for *Leishmania* survey. The cat had two pictures of feline respiratory complex for long time and it was submitted for support therapy with antibiotics. Thus, months later, the animal was anesthetized with association of xylazine (Anasedan[®]) and ketamine (Dopalen[®]) for biopsy procedure. In this occasion, the epilating procedure exposed the ulcers with a pattern of elevated borders separated only by a fine skin tissue and with erythematous granulation tissue in the bed (Figure 1). In addition, a better physical examination of the skin, allowed to be seen a great amount of scars for all body. Then, the possibility of a dermal infectious with fungus by inoculation due scratches in fights for mating and territorial disputes with other cats was suspected. Clinical diagnosis also included sporotrichosis. Even so, the cat once more was anesthetized and blood was drawn from jugular route and serum submitted for antibodies anti-*Leishmania* survey by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Biopsy procedure allowed collecting aseptically fragments of the border lesion in saline solution (0.9%) isolation in *Leishmania* and fungus in specific media, inoculation in hamsters (*Mesocricetus auratus*) and histopathology.

Survey for *Leishmania* infection. Serology for anti-*Leishmania* antibody was found negative. NNN culture medium of lesion fragments becomes contaminated by fungus.

Inoculation in experimental models. For inoculation in hamsters (*Mesocricetus auratus*), one small fragment of the lesion was carefully macerated into the saline solution. Approximately 0.1 mL of this mixed solution was injected by intradermal route in the right foot of two hamsters. Saline were also injected in left foot as control. Four months before infection, the hamsters showed a nodular lesion in the same point of inoculum (Figure 2). They were sacrificed and small fragments of liver, spleen and lymph nodes as well as feet, submitted to mycology culture and were fixed in 10% buffered formalin solution to the routine procedure. Sections of approximately 5 µm thick were processed for hematoxylin and

eosin (H&E), by Gomori-Grocott chromic acid methenamine silver (GMS) impregnation and by periodic acid-Schiff (PAS) reaction.

Mycology. The specimen clinic was transported in saline solution to the Medical Mycology Specialized Center at the Faculty of Medicine at Federal University of Ceará, Brazil. The clinical specimens from cat's lesion were inoculated in tubes with Sabouraud dextrose agar, with or without chloramphenicol and Mycosel agar (SANOFI, France). The cultures were incubated, at 28°C, and examined daily for one month. The culture grew moderately; white to buff brown, velvety colonies. Microscopically, two types of conidia were visualized by lactol phenol cotton blue stain. One conidia was tuberculate and large with approximately 15 µm in diameter and the other conidia was small and smooth to roughened walls conidia with approximately 3 µm. The definitive identification was done with the conversion of the mold to the yeast in Sabouraud blood agar. In this media, the *H. capsulatum* grew a yeast form. The same procedure was accomplished for hamsters' lymph nodes and feet lesion with either success growth. In order to evaluate primary infection in the lungs, a thoracic radiography was performed and it showed normal.

Treatment. Before histoplasmosis diagnosis, therapy with itraconazole, 5 mg/Kg/PO for 60 days, was attempt, with no regression of the lesion. In November of 2002, twenty days after the end of the treatment, the cat showed a sudden picture of lethargy, apathy and unconsciousness with evolution for death. Blood was drowning before its death for biochemistry analyses. Clinical suspicious of sudden death was feline urology syndrome.

Necropsy. Inspection by palpation of abdomen was possible to feel a huge mobile mass sizing approximately 12 x 8 cm. By gross morphology, bronchial wall were thicken and slight increasing. Kidneys, liver and spleen showed moderate swelling. The final third of urethra wall was thickened and small hemorrhagic points in the mucosa were found. The "huge mass" was bladder replete with hemorrhagic urine and its serosa and mucosa were also hemorrhagic.

Fragments of skin, lungs, bladder, kidneys, liver, spleen, urethra, urether and intestine were fixed in 10% buffered formalin solution to the routine procedure. Sections of approximately 5 µm thick were processed for hematoxylin and eosin (H&E), by Gomori-Grocott chromic acid methenamine silver (GMS) impregnation and by periodic acid-Schiff (PAS) reaction.

Histopathology. Spleen showed a severe atrophy of the lymphoid follicles. Subscapular and multifocal fibrosis, glomerular sclerosis and tubular atrophy for all renal tissue were found. Beyond, multifocal inflammatory infiltration compound predominantly by neutrophils, macrophage and plasm cells were seen. Hemorrhages in the bladder mucosa, loss of cover epithelium and inflammatory infiltration of neutrophils were observed. Steatosis was found between hepatic cords. The lungs were severally emphysemic. An epidermis fistula showed several vascular neo-formation with granulocytic cells and necrosis.

Discussion

Dermatological affections due several bioagents are mostly carried misdiagnosis in human being as such as in animals. *Leishmania* protozoa and *Histoplasma* fungus are both agents whose clinical manifestations were similar (Thiago et al., 1998). Thus, diagnosis of this systemic mycosis requires knowledge of their clinical syndromes, a high index of suspicion, and knowledge of the accuracy and limitations of used diagnosis of fungal infections (Reference). In addition, the morphology of the *Leishmania* and *Histoplasma* are so similar in infected tissues. However, the *Leishmania* organisms show kinetoplasto structure, which there is not seen in *Histoplasma* (Thiago et al., 1998).

In Baturité towns there is no record of human histoplasmosis. Until the moment, any case of human histoplasmosis was recorded in Baturité town.

However, gastrointestinal tract may also be a portal of entry (Morita et al., 2001).



Figure 1. Ulcers on the tail with a pattern of elevated borders separated only by a fine skin tissue and with erythematous granulation tissue in the bed



Figure 2. Hamster showing nodular lesion formation in the same site of inoculum of *Histoplasma capsulatum*

APÊNDICE

Apêndice I

Quadro 1. Frequência de LTA humana (1996-2005) por município residente do Ceará

Município	Ano										
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Total
Abaiara	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	5
Acarapé	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acaraú	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
Acopiara	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Aiuaba	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Alcântaras	0	0	0	0	0	1	3	0	2	0	6
Altaneira	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Alto Santo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amontada	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	4
Antonina do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Apuiarés	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aquiraz	0	0	0	0	0	64	29	30	41	4	168
Aracati	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aracoiaba	0	0	0	0	0	4	3	0	0	0	7
Ararendá	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
Araripe	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	4
Aratuba	0	0	0	0	8	26	16	27	11	20	108
Arneiroz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Assaré	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	4
Aurora	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Baixio	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Banabuiú	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Barbalha	0	0	0	0	0	82	64	73	67	37	323
Barreira	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Barro	0	1	1	0	1	2	1	2	2	0	10
Barroquinha	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	4
Baturité	0	0	0	0	70	436	91	34	29	9	669
Beberibe	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	4
Bela Cruz	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Boa Viagem	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Brejo Santo	0	0	0	0	17	8	10	8	4	1	48
Camocim	0	0	0	0	7	12	5	13	22	2	61
Campos Sales	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3
Canindé	0	0	0	0	2	1	0	2	4	1	10
Capistrano	0	0	0	0	0	15	9	4	5	5	38
Caridade	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	5
Cariré	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	5
Caririaçu	0	0	0	0	2	0	0	4	1	0	7
Cariús	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	3
Carnaubal	0	0	0	0	0	0	12	7	11	5	35
Cascavel	0	0	0	0	0	4	10	0	6	1	21
Catarina	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	4

Catunda	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caucaia	0	0	0	0	0	276	62	15	16	2	371
Cedro	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	5
Chaval	0	0	0	0	0	2	1	1	1	0	5
Choró	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chorozinho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coreaú	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crateús	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	6
Crato	0	0	0	0	173	104	52	67	106	46	548
Croatá	0	0	0	0	0	5	7	1	2	8	23
Cruz	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Deputado Irapuan Pinheiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ererê	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eusébio	0	0	0	0	0	16	12	1	5	0	34
Farias Brito	0	0	0	0	0	3	7	0	3	4	17
Forquilha	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	6
Fortaleza	0	0	0	0	0	94	33	10	25	2	164
Fortim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frecheirinha	0	0	0	0	0	0	2	0	1	7	10
General Sampaio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Graça	0	0	0	0	0	54	46	19	27	14	160
Granja	0	0	0	0	2	10	2	7	4	4	29
Granjeiro	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
Groaíras	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	4
Guaiúba	0	0	0	0	0	2	0	1	2	0	5
Guaraciaba do Norte	0	0	26	17	51	78	69	47	48	75	411
Guaramiranga	0	0	0	0	15	56	15	1	6	7	100
Hidrolândia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Horizonte	0	0	0	0	0	20	11	24	61	8	124
Ibaretama	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ibiapina	0	0	0	0	0	4	120	84	142	47	397
Ibicuitinga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Icapuí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Icó	0	0	0	0	0	0	4	2	5	2	13
Iguatu	0	0	0	0	0	26	9	7	15	8	65
Independência	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Ipaporanga	0	0	0	0	1	2	1	0	0	1	5
Ipaumirim	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Ipu	0	0	0	0	0	1	21	26	20	52	120
Ipueiras	0	0	0	1	4	6	23	5	14	3	56
Iracema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irauçuba	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3
Itaiçaba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Itaitinga	0	0	0	0	0	6	3	6	3	0	18
Itapagé	0	0	0	0	0	67	95	62	183	49	456
Itapipoca	0	0	0	0	0	258	75	29	17	5	384
Itapiúna	1	0	0	0	0	5	1	3	0	0	10
Itaremá	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Itatira	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	6
Jaguaratama	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Jaguaribara	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jaguaribe	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	4

Potiretama	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quiterianópolis	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	4
Quixadá	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Quixelô	0	0	0	0	0	3	0	1	3	2	9
Quixeramobim	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Quixeré	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Redenção	0	0	0	0	0	35	32	9	5	3	84
Reriutaba	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	5
Russas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saboeiro	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
Salitre	0	0	0	0	0	4	0	1	1	0	6
Santa Quitéria	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2
Santana do Acaraú	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3
Santana do Cariri	0	0	0	0	12	1	1	1	6	2	23
São Benedito	0	0	0	0	193	0	249	123	197	50	812
São Gonçalo do Amarante	0	0	0	0	0	13	5	4	1	3	26
São João do Jaguaribe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
São Luís do Curu	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Senador Pompeu	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Senador Sá	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
Sobral	0	0	0	0	0	0	23	24	29	6	82
Solonópole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tabuleiro do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tamboril	0	0	0	1	0	3	2	0	0	1	7
Tarra fás	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
Tauá	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3
Tejuçuoca	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Tianguá	0	0	0	0	0	2	204	117	66	39	428
Trairi	0	0	0	0	0	1	3	0	1	1	6
Tururu	0	0	0	0	0	7	6	0	2	0	15
Ubajara	0	0	0	0	0	12	160	89	211	84	556
Umari	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Umirim	0	0	0	0	3	7	2	1	5	2	20
Uruburetama	0	0	0	0	0	406	95	44	55	25	625
Uruoca	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Varjota	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Várzea Alegre	0	0	0	0	1	0	4	1	2	1	9
Viçosa do Ceará	0	0	0	0	0	162	66	62	451	141	882
Total	1	1	30	24	650	3439	2291	1397	2192	921	10946

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)