

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

LEISHMANIOSE FELINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
IMUNODEFICIÊNCIA VIRAL E TOXOPLASMOSE EM GATOS
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL

Ludmila Silva Vicente Sobrinho

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

LEISHMANIOSE FELINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
IMUNODEFICIÊNCIA VIRAL E TOXOPLASMOSE EM GATOS
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL

Ludmila Silva Vicente Sobrinho
Orientadora: Prof^a. Adjunto Mary Marcondes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP
2010

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V632L Sobrinho, Ludmila Silva Vicente.
Leishmaniose felina e sua associação com imunodeficiência viral e toxoplasmose em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral / Ludmila Silva Vicente Sobrinho. – Araçatuba : [s.n.], 2010
82 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientadora: Profa. Adjunto Mary Marcondes

1. Coinfecção 2. Retrovírus 3. Felino 4. *Leishmania* spp. 5. Sorologia 6. *Toxoplasma gondii*

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

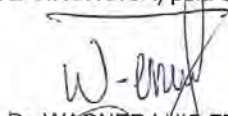
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Leishmaniose felina e sua associação com
imunodeficiência viral e toxoplasmose em
gatos provenientes de área endêmica
para leishmaniose visceral.

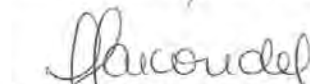
AUTOR: LUDMILA SILVA VICENTE SOBRINHO

ORIENTADOR: Dr.^a MARY MARCONDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr. WAGNER LUIS FERREIRA


Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES


Dr.^a MARY MARCONDES

DATA DA REALIZAÇÃO: 20 de agosto de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a MARY MARCONDES
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LUDMILA SILVA VICENTE SOBRINHO - nascida em 15 de outubro de 1980 na cidade de Araçatuba-SP, Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Araçatuba, em 2007. Foi bolsista de iniciação científica, em dois projetos financiados pela FAPESP. Recebeu prêmio de “Menção Honrosa” pela apresentação de trabalho no XVII Congresso de Iniciação Científica promovido pela Universidade Estadual Paulista, em 2005. Foi Membro Titular da representação Discente no Conselho Deliberativo do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” (2005-2006) e no Conselho do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (2008-2009). Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia – UNESP, Câmpus de Araçatuba, em março de 2008, sob a orientação da Professora Adjunto Mary Marcondes.

“A coisa mais perfeita que um homem
deveras interessado no saber poderá conseguir na
sua doutrina é a consciência plena daquela
ignorância que lhe é própria. E tanto mais ele será
douto quanto mais se souber ignorante”

Nicolau de Cusa (1401-1464)

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo sopro de vida! Aos meus pais, Sueli Ap. Silva Sobrinho (*in memoriam*) e Benedito Vicente Sobrinho pelo amor, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora, professora Mary Marcondes, pela confiança, cumplicidade, dedicação, incentivo, amizade e carinho. Por acompanhar cada etapa deste trabalho com entusiasmo e sabedoria. Agradeço imensamente pelas oportunidades de enriquecimento profissional e pessoal.

À você minha eterna admiração!

Muito obrigada por TUDO!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo seu amor incondicional e incomparável, por cuidar de todos os detalhes da minha vida, por derramar mais uma porção de bom ânimo, sabedoria e equilíbrio quando as dificuldades pareciam maiores que eu, por Tua mão que tem me erguido a um alto lugar.

À minha amada família, meu presente, ao meu pai e a Tânia (querida madrastra) pelo amor, apoio e incentivo em todas as decisões da minha vida, a minha irmã-mãe Vanessa por todo amor, cumplicidade, orientações, orações, amizade e carinho e ao meu irmãozinho Heitor pelo cuidado, carinho e compreensão de minhas ausências, em especial quando me chamava para brincar e eu dizia, na maioria das vezes, “Agora não posso Ni, pode ser depois?”, e pacientemente ele esperava. Amo muito vocês !!!

Aos docentes e funcionários do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, pelos valiosos ensinamentos e profissionalismo; legados da graduação.

À Pós-graduação em Ciência Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, por permitir a realização experimental do projeto em sua estrutura física.

Ao professor Titular Wilson Machado de Souza e a professora Nair Trevizan Machado de Souza, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, por terem me concedido o privilégio de ser bolsista de iniciação científica e descobrir o quanto a pesquisa é prazerosa e interessante. Muito obrigada por sempre terem depositado em mim carinho,

confiança, incentivo e conhecimentos, pois foi no laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos que TUDO começou.

À professora Adjunto Valéria Marçal Félix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, por ter cedido gentilmente uma sala experimental para que o projeto desse continuidade.

À professora Adjunto Cárís Maroni Nunes, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal e a professora Adjunto Valéria Marçal Félix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, pelas sugestões no exame de qualificação geral de qualificação, que contribuíram ricamente para melhorar a redação final deste trabalho.

À professora Sílvia Helena Venturoli Perri, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, pela paciência, eficiência e dedicação na realização da análise estatística.

À professora Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, por ter permitido a colheita de amostras e castração de alguns gatos do PROEX.

Aos funcionários da Biblioteca do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, em especial à bibliotecária Izabel Pereira Matos, pelo auxílio na elaboração das referências.

Ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba, por autorizar a colheita de amostras e pela receptividade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro, bem como pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao amigo Cláudio Nazaretian Rossi, pela convivência harmônica, pelos ensinamentos durante o estágio de iniciação científica e por ter cedido gentilmente 200 amostras de soro de felinos do seu projeto de mestrado para compor este trabalho.

À professora Márcia Dalastra Laurenti e a auxiliar de laboratório Thayse Yumie Tomokane, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, pela receptividade, orientação, paciência e dedicação no transcorrer de minha estada no Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) para a realização das técnicas de diagnóstico para leishmaniose visceral.

Ao professor Titular Hélio Langoni e ao residente Diego, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Botucatu, pelo auxílio no processamento das amostras para o diagnóstico de toxoplasmose.

Às amigas, Ana Amélia (“Mirona”), Eveline (“Mirinha”), Juliana e Tatianna, pela troca de conhecimento, dedicação e competência no auxílio da realização deste trabalho.

À Carla Dan De Nardo, pela amizade, cumplicidade e carinho, bem como por suas palavras de apoio e incentivo. Sempre uma ajudando a outra!

Às estagiárias de iniciação científica Fernanda e Patrícia, pelo auxílio na colheita das amostras, bem como pelos bons momentos que passamos juntas.

Às amigas Flávia e Luciana leiri (“As Vanas”), pela excelente convivência no período de graduação, por todo carinho e apoio. Então, “me dá um V, me dá um A, agora um N e outro A... Go Vanas Go Go!”

Às minhas queridas amigas, Cássia, Raquel Baroni (“irmã branca”), Raquel Almeida (“irmã preta”), Fernanda (“Apert’s”), Camila (“Salmô”), Carolina Dini (“Cabeça”) e Mariana Jorge (“Jorgão”) que mesmo longe sempre demonstraram carinho, apoio e amizade. Obrigada por todos os momentos, risadas, conversas bizarras e reflexões. Ótimas companhias!

Aos parentes, amigos, residentes, mestrandos, funcionários e docentes que ajudaram e fazem parte, direta ou indiretamente, da concretização deste sonho.

Aos meus filhos peludos, Bluffy (*in memorian*), Mel (“Grila”), Lili (“Frajolinha”), Mau-mau (“Tio Mirinho”), Tuca-filha, Nisty (“Macaca branca”) e os netos Benjamim, Vitorinha, Nina e Vitória, pelo estímulo, companheirismo, amizade e amor. “You’re everything to me!”.

A todos os proprietários dos animais do experimento, por ter depositado sua confiança em mim e na equipe de pesquisa, permitindo que o estudo fosse concluído.

A todos os animais do experimento que, mesmo sem compreenderem a importância do estudo, compartilharam sua existência, doando-se para a ciência e fazendo o bem.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Animais estudados.....	38
4.2 Delineamento experimental.....	38
4.3 Colheita de sangue total.....	39
4.4 Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo de medula óssea.....	39
4.5 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i>	40
4.5.1 Produção de antígeno total para o ELISA indireto e a RIFI.....	40
4.5.2 ELISA indireto.....	41
4.5.3 Determinação do ponto de corte do método de ELISA	42
4.5.4 Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI).....	42
4.6 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> pela técnica de RIFI.	43
4.7 Pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV).....	44
4.8 Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp. pela reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).....	44
4.8.1 Extração de DNA.....	44
4.8.2 PCR em tempo real (TaqMan).....	45
4.9 Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS	47
5.1 População estudada.....	47
5.2 Detecção de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. por meio do exame parasitológico direto.....	48
5.3 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> por meio da técnica de ELISA indireta e da RIFI.....	49

5.4 Determinação da sensibilidade, especificidade e concordância entre o exame parasitológico direto e os métodos sorológicos para o diagnóstico de leishmaniose visceral.....	51
5.5 Detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV).....	52
5.6 Amostragem populacional infectada por <i>Leishmania</i> spp.....	53
5.7 Detecção de fragmentos de DNA.....	60
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES	

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de coeficiente <i>Kappa</i> e sua respectiva concordância, de acordo com Landis e Koch (1977).....	46
Tabela 2. Resultados da pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. por meio do exame parasitológico direto em citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo e medula óssea, em número absoluto e percentagem, de 30 gatos provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2010).....	49
Tabela 3. Resultados de sorologia para leishmaniose visceral por meio das técnicas de ELISA indireto, utilizando como conjugados a proteína A (ELISA-proteína A) e o anticorpo anti-IgG (ELISA-IgG), em número absoluto e percentagem, de 302 gatos provenientes de área endêmica para a doença. Análise estatística e coeficiente de concordância entre os métodos. (Araçatuba-SP, 2010).....	50
Tabela 4. Resultados de sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA indireto, utilizando como conjugado a proteína A (ELISA-proteína A) e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 302 gatos provenientes de área endêmica para a doença. Análise estatística e coeficiente de concordância entre os métodos. (Araçatuba-SP, 2010).....	50
Tabela 5. Resultados de sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA indireto, utilizando como conjugado o anticorpo anti-IgG (ELISA-IgG) e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 302 gatos provenientes de área endêmica para a doença. Análise estatística e coeficiente de concordância entre os métodos. (Araçatuba-SP, 2010).....	51

- Tabela 6.** Resultados dos exames sorológicos por meio das técnicas de ELISA-proteína A, ELISA-IgG e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) de 302 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, considerando-se o exame parasitológico direto como padrão ouro. Sensibilidade, especificidade e coeficiente *Kappa*. (Araçatuba-SP, 2010)..... **52**
- Tabela 7.** Resultados da sorologia por ELISA indireto (proteína A e conjugado anti-IgG) e exame parasitológico direto de 66 gatos infectados por *Leishmania* spp., provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)..... **53**
- Tabela 8.** Número e percentagem de 66 gatos infectados por *Leishmania* spp., provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, segundo o sexo, faixa etária e condição clínica. (Araçatuba-SP, 2010)..... **54**
- Tabela 9.** Resultados da pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e anti-*Toxoplasma gondii* em número absoluto e percentagem de gatos infectados por *Leishmania* spp., provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)..... **55**

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Fotomicrografia de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de medula óssea de gato proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral. Notar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas). Objetiva de 100X. (Araçatuba-SP, 2010)..... **48**
- Figura 2.** Gato infectado por *Leishmania* spp.. Verificar a hipertrofia bilateral das tonsilas (A) e secreção ocular bilateral com aspecto purulento (B). (Araçatuba-SP, 2010) **56**
- Figura 3.** Gatos infectados por *Leishmania* spp.. Verificar desidratação, perda de peso e apatia (A); opacidade de córnea bilateral do tipo nébula (B). (Araçatuba-SP, 2010)..... **56**
- Figura 4.** Distribuição, em percentagem, segundo as alterações clínicas sistêmicas, de 21 gatos acometidos exclusivamente por leishmaniose, provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)..... **57**
- Figura 5.** Gatos portadores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* e anti-vírus da imunodeficiência felina. Verificar alopecia, hiperqueratose, lignificação (A e B) em região de pavilhão auricular externo e hiperpigmentação cutânea na face dorsal da região cervical e cabeça (B). (Araçatuba-SP, 2010)..... **58**

Figura 6. Gatos portadores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* e anti-*Toxoplasma gondii*. Verificar lesão ulcerativa na região externa dos pavilhões auriculares com deposição de crostas hemorrágicas (A), perda tecidual da maxila e dos dentes incisivos superiores e deposição de crostas hemorrágicas no bordo da ferida (B). (Araçatuba-SP, 2010)..... **59**

Figura 7. Gatos portadores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-vírus da imunodeficiência felina. Verificar a presença de úlcera na língua de um animal (A) e ulceração profunda em ponta de orelha esquerda com deposição de crostas hemorrágicas (B) em outro felino. (Araçatuba-SP, 2010)..... **60**

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A.** Valores de densidades ópticas médias (D.O.), corrigidos (A/P), títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (RIFI-leish) e anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI-toxo), de gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, obtidas por meio das técnicas de ELISA-proteína A (ELISA-protA), ELISA- IgG e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), respectivamente. (Araçatuba-SP, 2010)
- Apêndice B.** Resultados do exame parasitológico direto (linfonodo: Linf., medula óssea: M.O.), ELISA indireto (prot.A, IgG) e reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (RIFI-L) e anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI-T), e pesquisa de anticorpos anti-FIV e antígenos do FeLV (SNAPtest), de gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)
- Apêndice C.** Descrição dos achados de exame físico geral de 302 gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2010)

LEISHMANIOSE FELINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM IMUNODEFICIÊNCIA VIRAL E TOXOPLASMOSE EM GATOS PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi determinar em uma população de 302 gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. e a presença de coinfeção pelo *Toxoplasma gondii*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV). Foram evidenciadas formas amastigotas de *Leishmania* spp. em 9,93% (30/302) dos animais. A prevalência da leishmaniose observada por meio dos métodos de ELISA-proteína A, ELISA-IgG ou exame parasitológico direto foi de 21,85% (66/302), sendo 13,64% (9/66) positivos no exame parasitológico direto e sororeagentes nas técnicas de ELISA indireto. Doze animais (70,59%) foram sororeagentes para o FIV e a *Leishmania* spp., enquanto 17 (25,76%) apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leishmania* spp. e cinco (71,43%) apresentavam infecção pelos três agentes. Não foi observada coinfeção entre *Leishmania* spp. e o FeLV. Houve associação estatisticamente significativa entre a coinfeção por *Leishmania* spp. e pelo vírus da imunodeficiência felina, bem como entre a presença de *Leishmania* spp., do vírus da imunodeficiência felina e do *Toxoplasma gondii*. A sensibilidade e a especificidade dos métodos de ELISA-proteína A, ELISA-IgG e reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de leishmaniose felina foram de 56,6% e 89,47%, 55,55% e 90,96% e 54,55% e 96,80%, respectivamente. As concordâncias entre a RIFI e as técnicas de ELISA-proteína A e ELISA-IgG foram fracas. No entanto, houve boa concordância entre as duas últimas técnicas. O presente estudo verificou que gatos residentes em área endêmica para leishmaniose visceral são predispostos à coinfeção por *Leishmania* spp. e vírus da imunodeficiência felina, e que parte deles desenvolvem sintomas inespecíficos e devem ser investigados em um diagnóstico diferencial.

Palavras-chave: coinfeção, retrovíroses, felino, *Leishmania* spp., sorologia, *Toxoplasma gondii*.

FELINE LEISHMANIASIS AND ITS ASSOCIATION TO IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND TOXOPLASMOSIS IN CATS FROM AN ENDEMIC AREA FOR VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – The aim of this study was to determine, in a population of 302 cats from an endemic area for visceral leishmaniasis, the prevalence of the infection by *Leishmania* spp. and the presence of co-infection by *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV). Amastigote forms of *Leishmania* spp were evidenced in 9.93% (30/302) of the animals. Prevalence of leishmaniasis by ELISA-prot A, ELISA-IgG or direct parasitological examination was 21.85% (66/302), being 13.64% (9/66) positive in both direct parasitological examination and ELISA. Twelve animals (70.59%) were seroreagent for FIV and *Leishmania* spp., while 17 (25.76%) showed antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. and five (71.43%) showed antibodies against those three agents. Co-infection was not observed between *Leishmania* spp. and FeLV. There was statistically significant correlation between the co-infection by *Leishmania* spp. and by the immunodeficiency virus, as well as among the present of *Leishmania* spp, feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii*. The susceptibility and the specificities of (the methods) ELISA-prot A, ELISA-IgG and reaction of indirect immunofluorescence for the diagnosis of feline leishmaniasis were 56.6% and 89.47%, 55.55% and 90.96% and 54.55% and 96.80%, respectively. The agreements between RIFI and ELISA-prot A and ELISA-IgG techniques were weak. However, there was a good agreement between the last two techniques. This study verified that cats from endemic areas for visceral leishmaniasis are predisposed to co-infection by *Leishmania* spp. and feline immunodeficiency virus, and that part of them developed nonspecific symptoms and should be investigated in a differential diagnosis.

Key-words: co-infection, retroviruses, feline, *Leishmania* spp., serology, *Toxoplasma gondii*.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral ou Calazar é uma doença infecciosa com potencial zoonótico, caráter cosmopolita e de grande impacto na saúde pública, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. É transmitida, nas Américas, por fêmeas de mosquitos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* que, durante o repasto sanguíneo, se infectam por *Leishmania chagasi*.

Trata-se de uma doença endêmica nos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, com uma população de 350 milhões de habitantes residindo em áreas de risco e aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas. Na América Latina, a forma visceral já foi identificada em 12 países, com 90% dos casos ocorrendo no Brasil. No país, o número de casos da enfermidade cresce ao longo dos anos, no entanto, mais importante que isso é a ocorrência de uma maior dispersão geográfica, levando ao aparecimento de casos em áreas, até pouco tempo, consideradas indenes.

As mudanças no desenvolvimento, crescimento demográfico, mobilidade animal e humana são fatores que modificam a distribuição biogênica ou o tropismo dos vetores (*Trophotaxis*), fato que pode incorporar novos hospedeiros na cadeia epidemiológica da leishmaniose.

Atualmente vem chamando a atenção o crescente número de gatos acometidos por leishmaniose visceral. Apesar de o cão ser o reservatório doméstico mais importante para *Leishmania* spp., relatos de gatos naturalmente infectados levam a crer numa possível participação dessa espécie animal no ciclo epidemiológico da doença.

Os hábitos noturnos dos felinos domésticos coincidem com o período crepuscular e noturno de repasto sanguíneo das fêmeas. Ademais, a preferência alimentar dos flebotomíneos parece possuir maior correlação com a disponibilidade de hospedeiros que com a atratividade particular por determinada espécie.

O primeiro relato de infecção natural em felinos por leishmania do complexo donovani foi descrito em 1912, na Argélia, quando se identificaram formas amastigotas de *Leishmania* spp. na medula óssea de um gato doméstico, com quatro meses de idade, que convivia com uma criança e um cão acometidos por leishmaniose visceral. O primeiro diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral em gato nas Américas data de 2000, no município de Cotia-SP. A partir de então,

outros estudos de prevalência no país foram realizados em populações de gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, identificando formas amastigotas do parasito em tecidos linfóides e sororeatividade por meio de técnicas sorológicas. Os resultados reforçam a hipótese de que gatos podem ser uma importante fonte de alimento para flebotomíneos transmissores da doença e, conseqüentemente, suscetíveis à infecção.

O número de gatos infectados ou mesmo doentes em áreas endêmicas parece ser bem inferior ao de cães, sugerindo que aqueles desenvolvam principalmente imunidade celular quando infectados pelo parasito, imunidade esta efetiva para controlar a infecção e conferir certo grau de resistência natural exceto, provavelmente, em distúrbios imunossupressores, que podem permitir a disseminação visceral do protozoário. Dentre as enfermidades com caráter imunossupressor mais importantes na espécie felina destacam-se a imunodeficiência viral felina (FIV) e a leucemia viral felina (FeLV). Em um cenário sombrio, a disseminação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) está ampliando as áreas de ocorrência da leishmaniose visceral e modificando a epidemiologia da doença. Esta condição pode ser semelhante no gato portador do vírus da imunodeficiência felina (FIV) que, uma vez infectado pelo retrovírus, pode portar outros patógenos capazes de infectar gatos imunossuprimidos.

O vírus da imunodeficiência felina e o vírus da leucemia felina são retrovírus capazes de induzir uma perda progressiva de linfócitos CD4+ e CD8+, devido ao tropismo por linfócitos e macrófagos. Desta forma, podem permitir a ocorrência de infecções crônicas e recorrentes.

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, uma zoonose que pode estar associada, em felinos, à imunossupressão, uma vez que esta espécie alberga naturalmente o parasito sem o desenvolvimento de sinais clínicos.

A preocupante possibilidade dos médicos veterinários subdiagnosticarem a leishmaniose visceral felina, tem como pressuposto a probabilidade de associação com outras doenças infecciosas e a ausência de sinais clínicos patognomônicos das protozoonoses e retroviroses em questão. Por esta razão, o presente estudo teve por objetivo pesquisar a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. e a presença de uma possível associação entre a infecção por *Leishmania* spp. com o vírus da

imunodeficiência, o vírus da leucemia e o *Toxoplasma gondii* em uma população de gatos residentes em área endêmica para leishmaniose visceral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanias são protozoários pleomórficos intracelulares com formas promastigotas (flageladas) e amastigostas (aflageladas), pertencentes ao filo Mastigophara, que compreende todos os protozoários com um ou mais flagelos e reprodução assexuada por fissão binária. Pertencem à classe Zoomastigophora, à ordem Kinetoplastida, caracterizada pela presença de um cinetoplasto, e à família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*. (LAINSON; SHAW, 1987; KONTOS; KOUTINAS, 1993; CIARAMELLA; CORONA, 2003; GREENE et al., 2006a).

O primeiro caso da doença em seres humanos ocorreu em 1835 na Grécia (PESSÔA; MARTINS, 1988). Cunningham, em 1885, observou os parasitos pela primeira vez em casos de Calazar humano na Índia. Em 1898, o cientista russo Borovsky descreveu detalhadamente estes parasitos em seres humanos com leishmaniose cutânea, sem nomear ou estabelecer ordem sistemática (PESSÔA; MARTINS, 1988; MICHALICK; GENARO, 2005).

Em 1903, William Leishman reconheceu certa semelhança entre as formas redondas do *Trypanosoma* e da “leishmania”, enquanto, Charles Donovan descrevia os mesmos parasitos na enfermidade denominada Febre Dundum ou Calazar, confundindo-os com o *Trypanosoma brucei* (PESSÔA; MARTINS, 1988). No mesmo ano, Bruce, Laveran e Mesnil consideraram estes microorganismos como sendo um piroplasma, nomeando-o de *Piroplasma donovani*. Ainda em 1903, Major Ross descobriu o gênero *Leishmania*, assim, o agente etiológico da Calazar foi denominado *Leishmania donovani*. Após cinco anos, Nicolle e Comte foram pioneiros ao encontrarem o parasito em cães na Tunísia (MICHALICK; GENARO, 2005).

Os principais agentes etiológicos da leishmaniose são classificados em dois subgêneros, conforme seu desenvolvimento no interior do vetor. As espécies do subgênero *Leishmania* têm sua diferenciação limitada ao intestino anterior e médio do díptero, já as do subgênero *Viannia* aderem os flagelos às paredes do intestino posterior (paredes do piloro e/ou íleo), onde se desenvolvem até migrarem para a porção anterior e média. Em 1974, Lumsden incluiu na sua classificação do gênero *Leishmania* a proposta dos complexos, apresentada por Lainson e Shaw que agrupou os parasitos do Velho Mundo nos complexos *Leishmania tropica* (as

espécies causadoras de leishmaniose tegumentar) e *Leishmania donovani* (todas as espécies causadoras de leishmaniose visceral humana) (MICHALICK, 2005).

A transmissão da leishmaniose visceral é estabelecida pelo ato hematófago no momento do repasto sanguíneo realizado exclusivamente pelo vetor fêmea. Estes dípteros pertencem à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, à qual compreendem os gêneros: *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (REY, 1991; GREENE et al., 2006a).

No Brasil, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é o protozoário responsável pela leishmaniose visceral em canídeos e seres humanos, os quais são infectados através da picada da *Lutzomyia longipalpis*, embora mais recentemente o *Lutzomyia cruzi* tenha sido identificada como a espécie preta no Estado do Mato Grosso do Sul (cidades de Corumbá e Ladário) (SÃO PAULO, 2006).

Os flebotomos são pequenos, medindo entre 2 a 3 mm de comprimento, possuem o corpo de coloração palha ou castanho-claro revestido por pelos. Os insetos possuem hábitos intra e peridomiciliares, crepusculares e noturnos, pousando com as asas entreabertas e discretamente eretas, deslocando-se em vôos curtos e silenciosos, os quais não denunciam seu pouso (REY, 2001). São conhecidos popularmente como “mosquito palha”, “birigui”, “tatuquiras” (FEITOSA et al., 2000), “asa dura”, “asa branca” e “cangalhinha” (REY, 1991).

O aparelho bucal das fêmeas da *Lutzomyia longipalpis* é do tipo sugador, constituído por ductos salivares responsáveis pela síntese de saliva rica em biomoléculas ativas, com capacidade de facilitar a implantação da *Leishmania* spp. nos animais reservatórios (SANTOS, 2006).

O ciclo biológico do flebotomíneo se processa em ambiente sombreado com matéria orgânica úmida para completar quatro estágios larvais: ovo, larva (L₁ a L₄), pupa e adulto. A sobrevivência é cerca de 20 a 45 dias, sendo que o período de desenvolvimento do ovo até a fase adulta pode demorar 30 dias (SÃO PAULO, 2006). A oviposição ocorre em locais tais como tocas de alguns roedores, casca de árvores velhas, fendas na parede e lixo doméstico, os quais oferecem microambiente favorável (WHO, 1999 *apud* CABRERA).

As fêmeas aladas buscam refúgio em abrigo de animais domésticos e criadouros, onde podem encontrar seu reservatório predileto, as galinhas (*Gallus gallus domesticus*), das quais conseguem sangue para maturação dos ovários e manutenção no ambiente. Deste modo, a permanência destes reservatórios em

áreas urbanas colabora para a expansão da leishmaniose (SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006). Coutinho et al. (2005) demonstraram que o *Rhipicephalus sanguineus* pode se infectar pela *Leishmania chagasi*, indicando a possibilidade de participação destes invertebrados na transmissão do protozoário entre cães, fato que abrange novos fatores de risco na complexa cadeia epidemiológica das leishmanias.

O ciclo biológico heteroxênico da *Leishmania chagasi* inicia-se com o repasto sanguíneo de flebótomos fêmeas dotadas de formas promastigotas metacíclicas, consideradas infectantes. As formas infectantes são inoculadas na epiderme e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) e, no interior de macrófagos diferenciam-se em formas amastigotas (aflageladas, redondas com um cinetoplasto evidente) capazes de sofrerem intensa divisão binária. Uma vez repletos de amastigotas, os macrófagos rompem-se e as liberam para outras células fagocíticas no fígado, baço, linfonodos, medula óssea, pele e outros órgãos. Ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, o vetor ingere macrófagos parasitados que romperão em seu intestino médio, liberando as formas amastigotas prontas para novas divisões binárias e diferenciação em promastigotas (flageladas), que posteriormente originarão as paramastigotas (flageladas e fixas ao intestino médio torácico – Estomodeu). Finalmente, o ciclo evolutivo do parasito no hospedeiro invertebrado é completado em 72 horas quando as paramastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas (forma infectante) (GREENE, 2006a; SANTOS, 2006; SÃO PAULO, 2006), que podem bloquear o proventrículo e promover regurgitação destas formas no momento da picada (DIETZE et al., 1991). Desta maneira, a transmissão do parasito aos vetores ocorre enquanto houver parasitismo no sangue periférico ou na pele dos reservatórios (CAMARGO et al., 2007).

O fato de os cães apresentarem maior prevalência e elevada quantidade de parasitos na pele quando comparado ao homem talvez, explique a constatação de que os casos humanos são precedidos dos casos caninos (BANETH, 2006).

O primeiro caso de leishmaniose visceral humana foi descrito em 1913 por Mignone, no Paraguai, ao examinar material de necropsia de um paciente que havia contraído a doença no município de Boa Esperança, Estado do Mato Grosso (MIGNONE *apud* BADARÓ; DUARTE, 2002).

O estreito convívio entre o homem e os reservatórios, bem como a elevada densidade do vetor, o desmatamento e/ou o processo migratório são os principais

responsáveis pela ocorrência de epidemias de leishmaniose visceral (GONTIJO; MELO, 2004). Um exemplo disso é o que vem acontecendo no Estado de São Paulo desde o ano de 1998, quando ocorreu a primeira descrição autóctone em um cão do município de Araçatuba (LUVIZOTTO et al., 1999), um ano após a captura de 23 espécimes de *Lutzomyia longipalpis* em duas casas na área urbana da mesma cidade (COSTA et al., 1997; CAMARGO-NEVES; KATZ, 1999; TOLEZANO et al., 1999). Desde então o número de casos identificados vem aumentando consideravelmente, sendo que, até julho de 2007, cerca de 37000 cães foram submetidos à eutanásia. No mesmo período foram confirmados 911 casos em humanos, dos quais 83 vieram a óbito (MARCONDES, 2007).

Embora a literatura compile informações que confirmam a participação de vários mamíferos na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral, o reservatório doméstico mais importante para a *Leishmania chagasi* é o cão (*Canis familiaris*) (BANETH, 2006). Entretanto, existem relatos de gatos naturalmente infectados, que levam a acreditar numa possível participação desta espécie na cadeia epidemiológica da doença (ROSSI, 2007; COSTA et al., 2010). A cultura de que as leishmanioses seriam enfermidades apenas de seres humanos, cães e de alguns animais selvagens, sem o acometimento de gatos, e a escassa literatura sobre os aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos em felinos, podem limitar o conhecimento sobre o verdadeiro papel dos gatos no ciclo epidemiológico da enfermidade.

Em 1756, ao viajar para a cidade de Aleppo, na Índia, Alexander Russel constatou que além do homem e dos cães, os gatos também eram acometidos pela leishmaniose visceral (NAUCKE, 2000). Na Argélia, Sargent et al. (1912) identificaram pela primeira vez um gato infectado por *Leishmania* spp.. A partir desta constatação, outros casos foram descritos na Espanha (HÉRVAS et al., 1999; LEIVA et al., 2005; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007, AYLLON et al., 2008), Itália (POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004; VITA et al., 2005), França (OZON et al., 1998; GREVOT et al., 2005), Suíça (RUFENACH et al., 2005), Portugal (COSTA-DURÃO et al., 1994; MAIA et al., 2008), Grécia (DAIKOU et al., 2009), Israel (NASEREDDIN et al., 2008), Iran (HATAM et al., 2009) e no Brasil (Da SILVA et al., 2008).

A equipe de Evandro Chagas identificou o primeiro caso de leishmaniose felina no Estado do Pará (MELLO, 1940), quando pesquisava possíveis reservatórios no Brasil. Somente em 1996 um novo caso foi descrito em Minas

Gerais (PASSOS et al., 1996). Posteriormente, dois relatos no Rio de Janeiro (SCHUBACH et al., 2004) e outro no Mato Grosso do Sul (SOUZA et al., 2005).

O primeiro diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral em gato nas Américas foi identificado no ano de 2000, em um animal do município de Cotia, Estado de São Paulo. O animal apresentava hipertermia, desidratação severa, atrofia da musculatura temporal, linfadenopatia, bem como aumento de volume ulcerativo e sangrante no focinho, lembrando uma formação neoplásica. O animal foi soropositivo pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), com título de 1:80, e possuía intensa carga parasitária observada na citologia aspirativa do nódulo cutâneo e da medula óssea. Contudo, não havia coinfeção pelo vírus da imunodeficiência felina e pelo vírus da leucemia felina. A Reação em Cadeia de Polimerase identificou *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em amostra obtida do fragmento do baço (SAVANI et al., 2004).

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral felina não são patognomônicos, ocorrendo manifestações clínicas tais como desidratação, diarreia, êmese, depressão, anorexia (DUNAN et al., 1989; PENNISI, 1999), estomatite, gengivite (LEIVA et al., 2005), uveíte, ulceração no estroma corneal, iridociclite granulomatosa, linfadenomegalia local ou generalizada (HÉRVAS et al., 1999, 2001; PENNISI, 1999), além de lesões cutâneas, dermatite seborréica úlcero-crostosa, alopecia difusa (OZON et al., 1998) e dermatite ulcerativa (GREVOT et al., 2005).

Maroli et al. (2007) submeteram um gato de 13 anos de idade, naturalmente infectado por *Leishmania infantum*, ao xenodiagnóstico com *Phlebotomus perniciosus* e constataram que o felino possuía capacidade infectiva aos vetores. O animal estava infectado há aproximadamente seis anos e apresentava infartamento de linfonodos submandibulares, periodontite, bem como títulos de anticorpos em 1:160 obtidos por meio da reação de imunofluorescência indireta.

No ano de 2007, Rossi, realizando um inquérito epidemiológico em 200 gatos encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP, identificou 14 gatos positivos, sendo oito por exame parasitológico direto e seis por exame sorológico por meio da técnica de ELISA indireto, identificando alguns felinos positivos em ambos os testes.

Costa (2008) pesquisando a prevalência de infecção por *Leishmania* spp. em 200 gatos de Araçatuba-SP, identificou 34 gatos positivos em pelo uma das técnicas

utilizadas, sendo oito por exame parasitológico direto, nove por sorologia pela técnica de ELISA indireto utilizando como conjugado a proteína A e 23 pela técnica de ELISA indireto utilizando como conjugado anticorpo anti-IgG.

Embora haja somente informações superficiais sobre o verdadeiro papel do gato no ciclo epidemiológico das leishmanioses acredita-se que estes animais infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade (PENNISI, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2007), provavelmente atrelados aos fatores genéticos, sem relacioná-la estritamente com a imunidade celular (MANCIANTI, 2004).

Estudos realizados em modelos murinos demonstraram que macrófagos parasitados e outras células apresentadoras de antígenos estimularam linfócitos T do subtipo CD4+, com desenvolvimento de duas subpopulações de linfócitos T auxiliares (Ta). A ativação de linfócitos Ta1 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 2 (IL-2), as quais elevam a eficiência dos fagócitos e dos linfócitos citotóxicos. Uma vez ativados, os macrófagos produzem radicais livres dependentes de oxigênio, os quais promovem controle do parasitismo com eliminação da infecção. Por outro lado, quando a infecção induz a uma resposta de linfócitos Ta2, há síntese de citocinas anti-inflamatórias como as IL-4, IL-5 e IL-10, bem como a proliferação de células B e consequente produção de anticorpos. Ainda que intensa, a proliferação de imunoglobulinas é pouco efetiva na resposta imune contra o parasito (BARBIÉRI, 2006, MICHALICK; GENARO, 2007).

Desta forma, a resposta mediada por linfócitos Ta1 está relacionada à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção e a resposta por linfócitos Ta2 está mais associada à progressão da doença (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK; GENARO, 2007). O balanço da resposta imune mediada por células está relacionado a fatores como às citocinas presentes no sítio biológico da estimulação, ao tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), à natureza e a quantidade de antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (ABBAS et al., 2000).

Em função dos reflexos clínicos causados pela leishmaniose canina, Feitosa et al. (2000), em uma revisão sobre a resposta imune do cão frente à uma infecção por *Leishmania* spp., comentaram que a leishmaniose se assemelha à uma doença imunemediada. Os aspectos relacionados ao sistema imunológico do felino infectado

por *Leishmania* spp. ainda não estão esclarecidos, ainda mais quando a enfermidade está associada à outras doenças infecciosas de caráter imunossupressivo, comumente encontradas nesta espécie.

De acordo com Gramiccia e Gradoni (2005) em felinos com viroses imunossupressivas concorrentes à leishmaniose, tais como a imunodeficiência viral e a leucemia viral felina, ocorre prejuízo da resposta imune e disseminação do protozoário à semelhança do quadro coinfectivo entre *Leishmania*-HIV em pacientes humanos.

Os vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o da imunodeficiência humana (HIV) pertencem à família Retroviridae e ao gênero dos lentivírus, sendo similares no que diz respeito às características biológicas e às disfunções imunológicas que causam nos hospedeiros (DUA et al., 1994). Neste contexto, a síndrome da imunodeficiência adquirida nos gatos domésticos tem ganhado um destaque especial na medicina veterinária, pois as semelhanças biológicas e morfológicas entre o FIV e o HIV propiciam estabelecer modelos experimentais para a infecção pelos Lentivírus, visando o estudo da patogenia e desenvolvimento de novos fármacos e vacinas (BACHMANN et al., 1997; WILLETT et al., 1997; FOOSHEE, 1998; AVERY, 2001).

O vírus da imunodeficiência felina é eliminado em altas concentrações na saliva de gatos infectados, sendo o ato da mordedura o modo de transmissão mais eficaz (YAMAMOTO et al., 1989). Os sintomas inespecíficos em gatos infectados com o FIV incluem linfadenopatia, mucosas pálidas, gengivite/estomatite, perda de peso rápido, alterações nos sistemas digestório, tegumentar, oftálmico e nervoso (YAMAMOTO et al., 1989; SHELTON et al., 1990; BURKHARD; HOOVER, 1999; TEIXEIRA; SOUZA, 2003).

A condição epidemiológica cosmopolita do FIV determina taxas de soroprevalência variando de 2,5% a 29,2% em populações de gatos de várias partes do mundo (RECHE Jr et al., 1997; ARJONA et al., 2000; YILMAZ; ILGAZ, 2000; DORNY et al., 2002; LEVY et al., 2006; MARTÍN-SANCHEZ et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; LARA et al., 2008).

Embora haja poucos relatos na literatura sobre a leishmaniose felina, alguns estudos evidenciaram coinfecção por *Leishmania* spp. e pelo FIV (GREVOT et al., 2005; POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

Hervás et al. (1999) afirmam que agentes imunossupressores, tais como o FIV, o FeLV e o estresse podem induzir uma disfunção imunológica com prejuízo na resposta imune celular, permitindo a multiplicação e disseminação visceral da *Leishmania*. Ademais, a marca imunológica da infecção pelo FIV é a depleção de linfócitos TCD4+ que, por conseguinte, promove a redução da relação CD4+/CD8+ e disfunção das células B e T (TANIGUCHI, 1991; ACKLEY et al. 1990), à semelhança do que acontece nos indivíduos HIV-positivos (GEBHARD, 1999).

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus do gênero Gammaretrovírus, que causa uma variedade de desordens proliferativas (neoplásicas) e degenerativas (não neoplásicas) (HARDY JUNIOR, 1987; PANTGINIS et al., 1997; ABUJAMRA et al., 2003; SOUZA; TEIXEIRA, 2003). Os felinos persistentemente infectados eliminam partículas virais em menor quantidade nas secreções respiratórias, lágrima, fezes, urina, sêmen e leite. Todavia, a via de transmissão efetiva ocorre na saliva, através do “grooming” e compartilhamento de recipientes de água e/ou alimento (ARJONA et al., 2000). O vírus induz várias doenças proliferativas, como linfomas e leucemias, e muitas enfermidades degenerativas associadas às propriedades imunossupressoras do vírus (HAGIWARA et al., 1997). Os sinais clínicos variam dependendo do tipo de doença e dos órgãos envolvidos, podendo incluir, anorexia, emagrecimento, febre, mucosas pálidas, gengivite, estomatite, uveíte, dispnéia, diarreia e abscessos que não cicatrizam (LAPPIN, 1998; SOUZA; TEIXEIRA, 2003). A soroprevalência de infecção pelo vírus da leucemia felina em diversos países varia de 2,3% a 35,7% (ARJONA et al., 2000; COSTA et al., 2000; YILMAZ; ILGAZ, 2000; DORNY et al., 2002; SOUZA; TEIXEIRA, 2002; LEVY et al., 2006; MARTÍN-SANCHEZ et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007).

A toxoplasmose é uma protozoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, um patógeno ubiqüitário. Os felinos são fundamentais para a disseminação da doença, pois são os únicos hospedeiros da forma sexuada e definitiva do parasito. As fezes dos gatos são a única fonte de infecção para os herbívoros, os quais permitem a ocorrência do ciclo extraintestinal com proliferação de taquizoítos nos órgãos e formação de cistos contendo bradizoítos, que são infectantes para os gatos, cães e o homem. Gatos que se infectam pela ingestão de bradizoítos podem desenvolver um quadro de diarreia autolimitante em decorrência da replicação enteroepitelial do parasito. No entanto, esta fase da doença pode ser clinicamente silenciosa e de

pouca importância. Por outro lado, gatos imunossuprimidos podem apresentar manifestações sistêmicas em decorrência de uma disseminação extraintestinal de taquizoítos. Dentre os sinais clínicos destacam-se anorexia, letargia e dispnéia causada por uma pneumonia. Outros sintomas incluem febre persistente ou intermitente, perda de peso, icterícia, causada por hepatite ou colangio-hepatite, êmese, diarreia, efusão abdominal, miopatias, neuropatias e morte. Também são frequentes as manifestações oculares da doença. Os sinais clínicos observados em adultos podem ser decorrentes de uma exposição aguda ou da reativação de uma infecção crônica, pela liberação de bradizoítos em decorrência de uma imunossupressão (GREENE, 2006b).

Os valores mundiais de soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos variam de 19,4% a 70,2% (LUCAS et al., 1998; LANGONI et al., 2001; DORNY et al., 2002).

Gennari et al. (2006) pesquisando a soroprevalência de toxoplasmose em uma população de 98 cães portadores de leishmaniose visceral, no município de Araçatuba-SP, identificaram 41% de soroprevalência, demonstrando a ocorrência da infecção e a presença de associação entre as duas enfermidades em cães. Estudos de soroprevalência de toxoplasmose em populações de gatos nos municípios de Araçatuba-SP e Porto Alegre-RS registraram taxas de 24,20% e 32,5%, respectivamente (PINTO et al., 2009; BRESCIANI et al., 2010).

Infecções por *Toxoplasma gondii* também tem sido associadas à infecção pelo FIV (LUCAS et al., 1998; DORNY et al., 2002). Lucas et al. (1998), avaliando três grupos de gatos, o primeiro naturalmente infectados por FIV, o segundo eram doentes e negativos para a pesquisa de anticorpos anti-FIV e o terceiro eram hígidos e soronegativos para o FIV, identificaram maior frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no primeiro grupo. Deste modo, os autores sugeriram que a coinfeção pelos dois agentes pode promover a reativação de uma infecção latente pelo *Toxoplasma gondii* e resultar em eliminação de oocistos nas fezes.

À semelhança do cão, o diagnóstico clínico da leishmaniose visceral felina é intrincado em virtude da variedade de sinais clínicos inespecíficos e, portanto, comuns a outras enfermidades. Deste modo, faz-se necessária a confirmação da suspeita por meio do exame parasitológico direto ou provas laboratoriais (FEITOSA, 2006), já que a notificação compulsória da doença é indispensável (BRASIL, 2003).

A comprovação do diagnóstico da leishmaniose visceral está fundamentada em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Embora haja disparidade entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, até o momento, teste ouro para o diagnóstico da doença (LEONTIDES et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

A citologia aspirativa por agulha fina é um método prático, de baixo custo, de fácil execução, ínfima agressão tecidual e amplamente utilizado como diagnóstico, principalmente na rotina de clínicas veterinárias (FERRER, 1999). Desta forma, a técnica é empregada com destaque no reconhecimento da infecção em gatos (SIMÕES-MATTOS, 2005). A especificidade é de 100%, contudo, a sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo transcorrido na procura do parasito (SLAPPENDEL; GREENE, 1990). Neste caso, passa a ser de 80% em animais sintomáticos e menor ainda em soropositivos e assintomáticos (GENARO, 1993). Rossi (2007), ao avaliar 200 gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, identificou formas amastigotas de *Leishmania* spp. em oito animais.

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. circulantes constitui o princípio das provas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino, como a reação de imunofluorescência indireta e o ELISA (BRASIL, 2003).

Na dependência do antígeno empregado, o teste de ELISA apresenta uma sensibilidade e especificidade que variam de 94% a 99,5% e de 84,4% a 100%, respectivamente (LAURENTI et al., 2005; ZANETTE, 2006). Em um estudo conduzido por Rossi (2007), em 200 gatos do município de Araçatuba-SP, área endêmica para leishmaniose visceral, o ensaio de ELISA indireto com proteína A demonstrou 16,7% de sensibilidade e 96,4% de especificidade. Costa (2008), ao avaliar também 200 gatos residentes no mesmo município, por meio de ELISA indireto utilizando como conjugados a proteína A e o anticorpo anti-IgG, obteve valores de sensibilidade de 12,5% e 25% e de especificidade de 65,4% e 19,2%, respectivamente.

Outro método sorológico empregado comumente no diagnóstico da leishmaniose visceral é a reação de imunofluorescência indireta. Em inquéritos caninos sua sensibilidade varia de 90% a 100% e sua especificidade de 80% a 100% (METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006). Este método é oneroso quando da

análise de grande número de amostras no que se refere ao tempo despendido para a leitura das lâminas. A dificuldade na execução da técnica de RIFI não é diferente da encontrada na realização do ELISA indireto (ZANETTE, 2006).

Há publicações com protocolos distintos quanto à escolha dos anticorpos e suas respectivas diluições, contudo, a maior parte dos autores consideram positividade em título igual ou superior a 1:40 (VITA et al., 2005; ROSSI, 2007; Da SILVA et al. 2008; FIGUEIREDO et al., 2009). Rossi (2007), avaliando a sensibilidade e a especificidade da RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral felina encontrou valores 12,5% e 100%, respectivamente.

Estudos relacionados à soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em gatos, por meio das técnicas de ELISA indireto, reação de imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, aglutinação direta e western blot, permitiram resultados oscilando de zero a 68% (SHERLOCK, 1996; PENNISI, 2002; GRAMICCI; GRADONI, 2005; VITA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006a; MÁRTIN-SÁNCHEZ et al., 2007). Estes valores podem variar conforme a amostragem, técnica sorológica, ponto de corte adotado e região geográfica de estudo (DANTAS-TORRES et al., 2006a). Os métodos sorológicos devem ser interpretados com cautela, haja vista que não há 100% de sensibilidade e especificidade, permitindo resultados falso-negativos e falso-positivos.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método direto e próspero para o diagnóstico da leishmaniose visceral, por meio do qual é possível identificar e ampliar fragmentos de DNA do protozoário em diversos tecidos como a medula óssea, linfonodos, baço, fígado, rins, pele, dentre outros (NOLI, 1999; MARY et al., 2004; BANETH, 2006). A sensibilidade e especificidade são próximas de 100%, dependendo do tipo de tecido avaliado (ASHFORD et al., 1995). Martín-Sánchez et al. (2007) avaliando 183 (31,6%) gatos, por meio das técnicas de PCR e RIFI, evidenciaram maior positividade na PCR em felinos com baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. (1:20), contrastando com a população de gatos que exibia títulos maiores que 1:160, que apresentava as menores proporções de PCR positivos (18,2%).

Dantas-Torres et al. (2006) salientaram que o diagnóstico exclusivamente clínico não permite a determinação da prevalência de leishmaniose felina. Desta maneira, ainda que existam diversos métodos diagnósticos disponíveis, é preciso ter coerência e conhecimento ao escolhê-los e cautela ao interpretá-los, permitindo que

o conjunto racional e fundamentado dos mesmos garanta uma conduta ética e veracidade do estudo.

O significativo impacto clínico-epidemiológico em saúde pública faz do cão doméstico o modelo experimental mais estudado para melhor compreensão das leishmanioses. No entanto, é no mínimo intrigante e digno de serem pesquisadas outras espécies, como prováveis participantes do ciclo epidemiológico da doença, haja vista a constante expansão da mesma e modificações biológicas dos agentes etiológicos e entomológicos. Ademais, os gatos estão se tornando tão comuns quanto os cães nos lares, o que impulsiona a necessidade de atentar para esta espécie em áreas endêmicas para a zoonose em questão.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1. Verificar a prevalência de infecção por *Leishmania* spp., pelo vírus da imunodeficiência felina, pelo vírus da leucemia felina e pelo *Toxoplasma gondii* em uma população de gatos residentes em Araçatuba, São Paulo, área endêmica para leishmaniose visceral;
2. pesquisar a presença de associação de infecção por *Leishmania* spp. com o vírus da imunodeficiência felina, vírus da leucemia felina e *Toxoplasma gondii* na população de gatos estudada;
3. determinar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de ELISA indireto e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em comparação com os resultados obtidos por meio do exame parasitológico direto para o diagnóstico de leishmaniose visceral felina;
4. determinar a concordância entre os métodos sorológicos indiretos e parasitológico direto empregados no diagnóstico de leishmaniose visceral felina;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais estudados

A presente pesquisa foi realizada com 302 felinos (escolhidos por conveniência), independentes de raça ou sexo, sintomáticos ou não, com faixa etária a partir de seis meses de idade, encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba-SP (200 animais) ou provenientes de duas residências (102 animais) localizados em bairros de classe social baixa do mesmo município. Foi confeccionada uma ficha de dados individuais, na qual constavam a procedência, idade aproximada (estimada pela análise da arcada dentária), sexo, raça e possíveis sintomas encontrados durante o exame físico geral. Parte dos animais foi castrada como medida de controle populacional.

4.2 Delineamento experimental

Amostras de sangue de 302 gatos foram colhidas e mantidas à temperatura ambiente até a coagulação e retração visível do coágulo e em seguida, foram centrifugadas a 3000 r.p.m., durante cinco minutos para melhor separação do soro. Este, por sua vez, foi transferido para “eppendorfs” e congelado a - 80°C até o momento do seu processamento. A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) e da reação de imunofluorescência indireta. As mesmas amostras foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), enquanto que os anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) foram testados por meio do comercial assay Kit¹ (SNAP®FIV Antibody/FeLV Antigen Combo Test).

Amostras de sangue total de três animais foram colhidas em EDTA e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da IDEXX Reference Laboratories² para a realização de PCR em tempo real e identificação da espécie de *Leishmania*.

¹ IDEXX Laboratories Inc., EUA

² West Sacramento, CA 95605

O diagnóstico para toxoplasmose foi realizado em 251 animais, pois não havia alíquota de soro suficiente para o seu processamento nos outros animais.

Em todos os gatos foram realizadas também citologias aspirativas por agulha fina (CAAF) de linfonodo e medula óssea para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. por meio de exame parasitológico direto. As lâminas foram coradas com corante hematológico e observadas ao microscópio óptico em objetiva de 100X.

As fêmeas foram castradas por meio da técnica de ováriosalpingo-histerectomia (OSH) e os machos submetidos à orquiectomia pela técnica aberta; ambos receberam Enrofloxacin³ (5 mg/Kg) e Meloxicam⁴ (0,1 mg/Kg), durante o período pós-operatório.

O experimento foi delineado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA), conforme o protocolo nº 2008-005699.

4.3 Colheita de sangue total

Após tricotomia e assepsia local, a colheita de sangue foi efetuada por punção da veia jugular com agulhas 25 x 7 mm, acopladas a seringas estéreis de 10 mL para obter um volume mínimo de cinco mililitros de sangue.

4.4 Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo e medula óssea

A CAAF do linfonodo foi realizada estritamente com a apreensão do órgão com os dedos e movimentos “em leque” com a agulha 25 x 7 mm, acoplada à seringa de 10 mL, já a amostra de medula óssea foi obtida com agulha 40 x 12 mm acoplada à seringa de 20 mL, posicionada na região da crista ilíaca, sempre após tricotomia e assepsia. As amostras de felinos provenientes de residências, quando submetidos à castração, foram colhidas no transoperatório mediante a anestesia dissociativa com Acepromazina⁵ (0,05 mg/Kg), Sulfato de morfina⁶ (0,3 a 0,5 mg/Kg), Midazolam⁷ (0,5 mg/Kg) e Cloridrato de cetamina⁸ (12 a 15 mg/Kg) por via intramuscular.

³ Flotril® 2,5% – Schering-Plough Animal Health – Intervet Brasil

⁴ Bioflac® – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA – Campinas, SP

⁵ Acepran® 0,2% – Univet AS Indústria Veterinária – São Paulo, SP

⁶ Dimorf® – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA – Campinas, SP

⁷ Dormonid® – Roche – São Paulo, SP

⁸ Vetaset® – Fort Dodge Saúde Animal – Campinas, SP

A manutenção foi administrada, quando requerida, por via intravenosa com os últimos dois fármacos na dose de 0,3 mg/Kg e 5 mg/Kg, respectivamente.

Após a confecção dos esfregaços dos órgãos supracitados, as lâminas foram coradas com corante hematológico⁹ e observadas ao microscópio óptico¹⁰, em objetiva de 100X para pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

4.5 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*.

4.5.1 Produção de antígeno total para o ELISA indireto e a RIFI

Foram isoladas, em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina, formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa46, a partir de baço de hamster cronicamente infectado. Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm (1620g) à 4°C, em centrífuga refrigerada da marca Eppendorf¹¹, durante 10 minutos. Para a realização do ELISA indireto, as promastigotas foram estocadas em freezer à -80°C na forma de precipitado no fundo do tubo. Para a preparação do antígeno, este precipitado contendo as formas promastigotas foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por três vezes consecutivas. Utilizou-se então uma alíquota para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford¹². Após a dosagem de proteínas, foram feitas alíquotas para que se evitassem congelamentos e descongelamentos sucessivos do antígeno, evitando possível ação de proteases.

Para a realização da RIFI o precipitado no fundo do tubo foi ressuspendido em solução de formalina tamponada 2% e mantida à 4°C por 24 horas. Após a fixação das formas promastigotas, estas foram novamente lavadas em solução salina tamponada e contadas em câmara de Neubauer. A concentração de parasitas foi ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL.

⁹ Panótico Rápido® – Laborclin – Curitiba, PR

¹⁰ Nikon® – Modelo YS 100

¹¹ Modelo 5804R

¹² Bio-Rad Protein Assay – Hercules, EUA

4.5.2 ELISA indireto

Os ensaios para a padronização das diluições apropriadas do soro de gatos e determinação da concentração do anticorpo IgG total anti-gato (ELISA-IgG) e da proteína A (ELISA-proteína A) foram realizados nas diluições de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 do soro dos animais controle positivo e negativo; bem como diluições de 1: 5000, 1: 10000, 1:20000, 1:40000 e 1:80000 do anticorpo anti-IgG¹³ e a proteína A¹⁴ marcados com peroxidase. Desta maneira, a escolha das melhores diluições foi estabelecida pelas diferenças das densidades ópticas médias dos dois controles, em duplicata, tendo sido consideradas a diluição de 1:200 de soro e 1:80000 de anticorpo IgG total anti-gato e proteína A.

Após a titulação em bloco, padronizaram-se as seguintes condições para o teste de ELISA indireto: as microplacas¹⁵ foram sensibilizadas com antígeno total de *Leishmania chagasi* numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,5 e incubadas 18 horas a 4°C. Após a lavagem¹⁶ com PBS-T por três vezes, as placas foram bloqueadas com 150 µL de solução salina tamponada acrescida de leite em pó desnatado a 10%¹⁷ e incubadas à 37°C durante duas horas em câmara úmida. Adicionaram-se 100 µL, por poço, das amostras de soro dos gatos, dos controles positivos e dos controles negativos. As mesmas foram testadas em duplicata e diluídas 1:200 em solução salina tamponada contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e, as placas foram incubadas por uma hora à 37°C. Aplicaram-se 100 µL, por poço, do conjugado anti-IgG total de gato¹³ ou Proteína A¹⁴ marcados com peroxidase, previamente diluídos 1:80.000 em PBS-T 0,05%. Após a incubação durante 45 minutos à 37°C foram adicionados 100 µL da solução de tetrametilbenzidina dihidroclorada¹⁸ (TMB). As microplacas foram incubadas em câmara escura por 30 minutos à 25°C. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) e, a densidade óptica (D.O.) foi determinada em leitor de ELISA¹⁹, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm. Entre cada etapa as microplacas foram lavadas¹⁶ com PBS-T por três vezes.

¹³ Catálogo nº A20-120P Bethyl – Montgomery, USA

¹⁴ Catálogo nº P8651 Sigma-Aldrich Brasil LTDA – São Paulo, SP

¹⁵ Costar® 3590

¹⁶ Lavadora de placa Wellwash 4 – Labsystems

¹⁷ Molico®, Nestlé

¹⁸ 555214, BD – San Diego, EUA

¹⁹ Labsystems Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, MA

Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata. Como controles positivos da reação utilizou-se soro de gatos parasitologicamente positivos com elevados títulos de IgG anti-*Leishmania chagasi* e como controles negativos, soro de gatos hígidos e provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral.

Os valores da D.O. do grupo experimental foram corrigidos em função das médias dos controles positivo e negativo, segundo o modelo matemático A/P.

$$A/P = \frac{\text{D.O. média da amostra} - \text{D.O. média do controle negativo}}{\text{D.O. média do controle positivo} - \text{D.O. média do controle negativo}}$$

4.5.3 Determinação do ponto de corte do método de ELISA

A determinação do ponto de corte foi estabelecido utilizando-se a média das densidades ópticas de 50 animais soronegativos, dentre os 302 avaliados, acrescida de três desvios padrões. Desta forma, foi considerado o ponto de corte de 0,148 para o ELISA indireto com proteína A e 0,165 para o ELISA indireto com conjugado anti-IgG total de gato.

4.5.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Cada círculo das lâminas de imunofluorescência²⁰ foi sensibilizado adicionando-se 20 µL/mL da suspensão de parasitos em solução salina tamponada (SST). Após a secagem em estufa, as mesmas foram embaladas em papel extrafino e papel alumínio e, acondicionadas em freezer à - 20°C. No momento do uso, as lâminas foram descongeladas em estufa durante cinco minutos. Em cada círculo, previamente impregnado com antígeno, foram aplicados 20 µL das amostras de soro dos gatos a serem testados, bem como os controles positivo (gato parasitologicamente positivo) e negativo (gato hígido e proveniente de área não endêmica para leishmaniose visceral), diluídas em SST com pH 7,2 na concentração de 1:20 e 1:40. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à 37°C por 30 minutos e lavadas, por imersão, três vezes com SST durante cinco minutos cada.

²⁰ Código 213 – Perfecta[®]

Após a secagem, foram acrescentados 20 µL de anticorpo anti-IgG de gato conjugado com isotiocinato de fluoresceína²¹ diluído a 1:100 em azul de Evans 4 mg%²². Optou-se pela diluição de 1:100 do conjugado por ter discriminado melhor os soros positivos dos negativos para leishmaniose visceral felina. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas como supracitado. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato em pH 8,0 e recobertas com lamínula para leitura em microscópio de imunofluorescência²³ com objetiva plan-neofluar 25/08 em imersão de água. Os soros sabidamente positivo e negativo foram utilizados em cada lâmina para a validação do teste. Foram considerados reagentes as amostras que demonstraram as promastigotas fluorescentes, inclusive o flagelo, e não reagentes as que apresentaram os parasitos sem fluorescência com coloração avermelhada. O ponto de corte da reação foi maior ou igual a 1:40.

As amostras de soro reagentes foram novamente testados em titulações seriadas na razão de 2 a partir de 1:40, ou seja, 1:80, 1:160, 1:320, até que a última diluição apresentasse promastigotas fluorescentes, para determinar o título de anticorpos presentes na amostra.

4.6 Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pela técnica de RIFI

Em cinco cavidades de uma microplaca foram adicionados 150 µL de solução salina tamponada (SST), aplicando-se, em seguida 10 µL de soro teste na primeira cavidade (diluição de 1:16). Após homogeneização, foram transferidos 50 µL do soro diluído da primeira cavidade para a segunda, repetindo o procedimento até a quinta cavidade, sendo 50 µL do último poço desprezados (diluições de 1:64, 1:256, 1:1024 e 1:4096). Os soros controle positivo e negativo seguiram o mesmo procedimento nesta microplaca. Cada cavidade da lâmina de imunofluorescência fixada com antígeno recebeu 10 µL das diluições do soro testado. Em seguida, foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida à 37°C, lavadas duas vezes com SST por 10 minutos e secas na estufa.

²¹ Catálogo nº F4262, FITC antibody produced in goat, Sigma-Aldrich – St. Luis, MO, EUA

²² Direct Blue 53, CI 23860, E-2129, 100 g, Sigma-Aldrich – St. Luis, MO, EUA

²³ Zeiss, West Germany

O anticorpo anti-espécie conjugado ao isotiocianato de fluoresceína²⁴, segundo seu título previamente estabelecido, foi diluído em azul e Evans a 20 mg%²⁵ (titulado 1:5 em SST). Distribuídos 10 µL do conjugado em cada diluição da lâmina procedeu-se com a incubação por 30 minutos em câmara úmida à 37°C. foram lavadas duas vezes em SST por 10 minutos e secas em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, lamínula 24 mm x 60 mm e examinadas em microscópio de fluorescência com objetiva de 40X²⁶. Após a leitura dos controles, foi considerada como título final a mais alta diluição do soro em que houve fluorescência completa da borda de pelo menos 50% dos taquizoítos. A fluorescência polar, ou seja, aquela em que apenas a extremidade dos parasitos ficou fluorescente foi atribuída às reações inespecíficas e, portanto, negativa. O ponto de corte foi de 1:16.

4.7 Pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV)

A presença de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina e do antígeno do vírus da leucemia felina foram realizadas por meio do comercial assay Kit SNAP®FIV Antibody/FeLV Antigen Combo Test²⁷ que utiliza o antígeno p27 do vírus da leucemia felina e anticorpos monoclonais p24 para o vírus da imunodeficiência felina. A metodologia e a interpretação dos resultados seguiu a recomendação do fabricante.

4.8 Amplificação de DNA de *Leishmania* spp. pela reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

4.8.1 Extração de DNA

As amostras de sangue total de três gatos, acondicionadas em EDTA, foram estocadas a - 20°C antes da extração total do ácido nucléico e da realização da PCR em tempo real. A extração foi realizada por meio do protocolo padrão do sistema Corbett XTractor-Gene platform. O controle interno da reação foi obtido pela amplificação de fragmentos do gene 18S-rRNA.

²⁴ A20-120F, antibody FIFC conjugated – Bethyl, USA

²⁵ AG-Fluka, Deutschland

²⁶ Zeiss, modelo sh 250, Deutschland

²⁷ IDEXX Laboratories Inc., EUA

4.8.2 PCR em tempo real (TaqMan)

A reação em cadeia da polimerase foi fundamentada em oligonucleotídeos para PCR em tempo real de propriedade da IDEXX²⁸, que são derivados do gene Metaloproteinase gp63, com sonda desenhada para o sistema TapMan.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através dos testes não-paramétricos de Qui-quadrado, de Fisher e de Mc Nemar com o intuito de verificar se existia uma maior predisposição ao aparecimento de FIV e FeLV em gatos com leishmaniose e se os mesmos possuíam maior chance de desenvolverem toxoplasmose.

A sensibilidade e a especificidade dos métodos de ELISA indireto e da reação de imunofluorescência indireta foram determinadas considerando-se como referência os resultados obtidos no exame parasitológico direto.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{(\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos}}{(\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})} \times 100$$

O coeficiente *Kappa* foi usado para avaliar a concordância entre os métodos, e sua interpretação foi feita de acordo com Landis e Koch (1977) (Tabela 1). As análises estatísticas foram determinadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1999) e consideradas significativas quando $p < 0,05$.

²⁸ West Sacramento, CA 95605

Tabela 1. Valores de coeficiente *Kappa* e sua respectiva concordância, de acordo com Landis e Koch (1977).

<i>Kappa</i>	Concordância
0,20-0,0	Não significativa
0,21-0,40	Fraca
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Boa
0,81-1,00	Excelente

5. RESULTADOS

5.1 População estudada

A população estudada foi composta por 302 gatos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP (200 animais) e de duas residências (102 animais) com livre acesso à rua, sendo 152 (50,33%) fêmeas e 150 (49,67%) machos, 287 (95,03%) animais sem raça definida e 15 (4,97%) gatos da raça siamês. Os animais entre seis meses e um ano de idade compreendiam 41,39% (125 gatos) da população estudada, 34,77% possuíam entre um e três anos (105 gatos), 15,90% de três a cinco anos (48 gatos) e 7,95% tinham idade superior a cinco anos (24 gatos). No que concerne à condição clínica dos felinos estudados, 65,56% (198/302) dos animais eram clinicamente sadios, enquanto 34,44% (104/302) apresentavam sintomas inespecíficos no exame físico geral. Das alterações clínicas mais comumente identificadas na população de gatos estudada constatou-se a presença de dermatopatias em 14,24% (43/302) dos animais, linfadenomegalia em 12,58% (38/302), perda de peso em 11,92% (36/302), desidratação em 5,30% (16/302), alteração no estado de consciência em 2,98% (9/302), secreção nasal em 2,64% (8/302), secreção ocular em 2,32% (7/302), hepatoesplenomegalia em 1,66% (5/302), mucosas pálidas e estomatite em 1,32% (4/302), diarreia em 0,99% (3/302), emaciação, hipertrofia de tonsilas e efusão torácica em 0,66% (2/302), efusão abdominal e opacidade de córnea em 0,33% (1/302).

As alterações dermatológicas dos 43 gatos em destaque foram a presença de alopecia em 25,58% (11/43), a deposição de crostas melicéricas em 16,28% (7/43), comedos e lesão ulcerativa em 9,30% (4/43), deposição de crostas hemorrágicas em 6,98% (3/43), eritema, lignificação, rarefação pilosa, hiperqueratose, hiperpigmentação e dermatite úmida aguda em 4,65% (2/43), seborréia, descamação cutânea furfurácea e colaretes epidérmicos em 2,33% (1/43). Do total de 302 animais examinados, 4,97% (15/302) apresentaram infestação por ectoparasitas.

5.2 Detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. por meio do exame parasitológico direto

Os esfregaços dos tecidos de linfonodo e de medula óssea foram realizados em duplicata, totalizando a leitura de aproximadamente 400 lâminas. Foram evidenciadas formas amastigotas do parasito em 9,93% (30/302) animais. Destes, 63,33% (19/30) animais apresentavam alterações clínicas sistêmicas e 70% (21/30) eram soronegativos. Cinquenta por cento dos felinos apresentaram parasitismo em ambos os órgãos linfóides, 30% (9/30) exclusivamente nos linfonodos e 20% (6/30) somente na medula óssea (Figura 1 e Tabela 2).

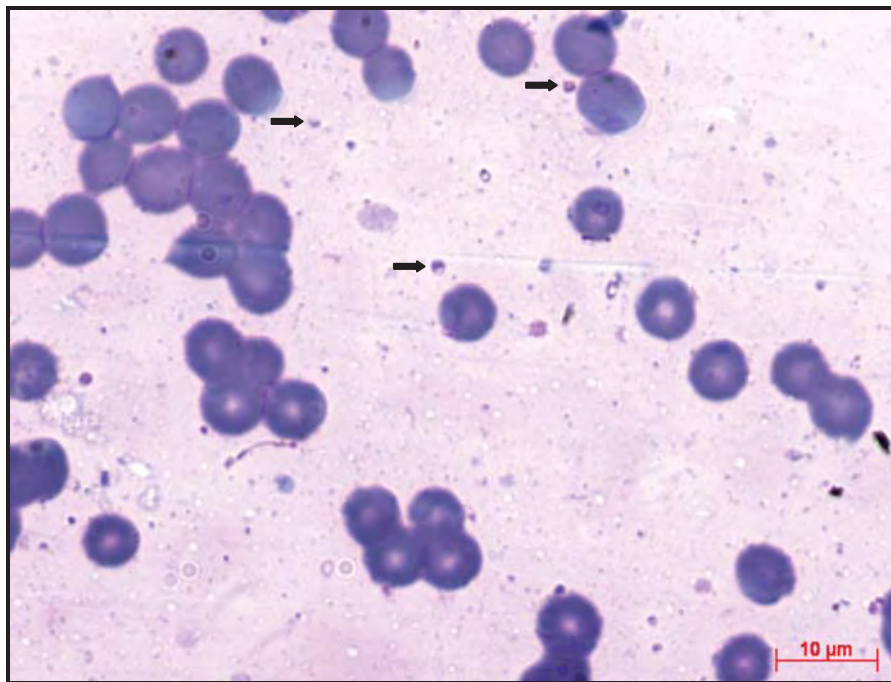


Figura 1 – Fotomicrografia de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de medula óssea de gato proveniente de área endêmica para leishmaniose visceral. Notar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas). Aumento de 1000X. (Araçatuba-SP, 2010)

Tabela 2 – Resultados da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. por meio do exame parasitológico direto em citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo e medula óssea, em número absoluto e percentagem, de 30 gatos provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2010)

Tecido	CAAF	
	Número de animais	Percentagem
Linfonodo	9	30%
Medula óssea	6	20%
Linfonodo e medula óssea	15	50%
Total	30	100%

5.3 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por meio da técnica de ELISA indireto e da RIFI

Dos 302 gatos submetidos à sorologia, 12,91% (39/302) apresentaram valores de densidade óptica (D.O.) acima do ponto de corte para a técnica de ELISA-proteína A, 10,93% (33/302) foram soropositivos por meio da técnica de ELISA-IgG e 4,64% (14/302) apresentaram fluorescência por meio da reação de imunofluorescência indireta. Destes, 71,43% (10/14) dos felinos obtiveram títulos de anticorpos iguais a 1:40, 21,43% (3/14) títulos de 1:80 e apenas 7,14% (1/14) foi sororeagente com títulos até 1:160.

Vinte e nove (9,60%) felinos obtiveram valores de D.O. acima do ponto de corte em ambas as técnicas de ELISA indireto, evidenciando uma boa concordância entre as mesmas ($p = 0,1088$; $Kappa = 0,7794$) (Tabela 3). Por outro lado, não se observou boa concordância entre a reação de imunofluorescência indireta e as técnicas de ELISA-proteína A ($p = 0,0001$; $Kappa = 0,2103$) (Tabela 4) e ELISA-IgG ($p = 0,0006$; $Kappa = 0,2945$) (Tabela 5). Desta forma, optou-se por desconsiderar os resultados da reação de imunofluorescência indireta, quando da determinação da prevalência de leishmaniose visceral na população estudada.

Considerando-se os resultados dos exames parasitológico e sorológicos por meio das técnicas de ELISA-proteína A e ELISA-IgG, a prevalência de leishmaniose visceral felina na população estudada foi de 21,85% (66/302).

Tabela 3 – Resultados de sorologia para leishmaniose visceral por meio das técnicas de ELISA indireto, utilizando como conjugados a proteína A (ELISA-proteína A) e o anticorpo anti-IgG (ELISA-IgG), em número absoluto e percentagem, de 302 gatos provenientes de área endêmica para a doença. Análise estatística e coeficiente de concordância entre os métodos. (Araçatuba-SP, 2010)

Métodos		ELISA-proteína A		<i>P</i>	<i>Kappa</i>
sorológicos		Positivo	Negativo		
ELISA-IgG	Positivo	29 (9,60%)	4 (1,32%)	0,1088 *	0,7794 ^a
	Negativo	10 (3,31%)	259 (85,76%)		

*Teste de McNemar ($p < 0,05$ significativo).

^aconcordância boa.

Tabela 4 – Resultados de sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA indireto, utilizando como conjugado a proteína A (ELISA-proteína A) e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 302 gatos provenientes de área endêmica para a doença. Análise estatística e coeficiente de concordância entre os métodos. (Araçatuba-SP, 2010)

Métodos		ELISA-proteína A		<i>P</i>	<i>Kappa</i>
sorológicos		Positivo	Negativo		
RIFI	Positivo	7 (2,32%)	7 (2,32%)	0,0001 *	0,2103 ^a
	Negativo	32 (10,60%)	256 (84,77%)		

*Teste de McNemar ($p < 0,05$ significativo).

^aconcordância fraca.

Tabela 5 – Resultados de sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA indireto, utilizando como conjugado o anticorpo anti-IgG (ELISA-IgG) e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 302 gatos provenientes de área endêmica para a doença. Análise estatística e coeficiente de concordância entre os métodos. (Araçatuba-SP, 2010)

Métodos		ELISA-IgG		P	Kappa
sorológicos		Positivo	Negativo		
RIFI	Positivo	8 (2,65%)	6 (1,99%)	0,0006 *	0,2945 ^a
	Negativo	25 (8,28%)	263 (87,09%)		

*Teste de McNemar ($p < 0,05$ significativo).

^aconcordância fraca.

5.4 Determinação da sensibilidade, especificidade e concordância entre o exame parasitológico direto e os métodos sorológicos para o diagnóstico de leishmaniose visceral

O exame parasitológico direto foi o método utilizado como referência para a determinação dos valores de sensibilidade e a especificidade das técnicas sorológicas. Deste modo, a sensibilidade e a especificidade foram respectivamente, 56,6% e 89,47% para a técnica de ELISA-proteína A; 55,55% e 90,96% para o método de ELISA-IgG e 54,55% e 96,80% para a RIFI. Dos 302 felinos parasitologicamente positivos em 2,32% (7/302) dos animais foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania* spp. e soropositividade por meio do ELISA-proteína A ($Kappa = 0,1067$); 1,99% (6/302) apresentaram anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por meio do ELISA-IgG ($Kappa = 0,0964$) e somente 1,66% (5/302) foram considerados infectados por meio da RIFI ($Kappa = 0,1751$). Os valores de sensibilidade, especificidade e concordância entre os métodos empregados estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados dos exames sorológicos por meio das técnicas de ELISA-proteína A, ELISA-IgG e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) de 302 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, considerando-se o exame parasitológico direto como padrão ouro. Sensibilidade, especificidade e coeficiente *Kappa*. (Araçatuba-SP, 2010)

Métodos	Parasitológico		Sensibilidade	Especificidade	Kappa
sorológicos	positivo	negativo			
ELISA-proteína A					
positivo	7 (2,32%)	32 (10,59%)	56,60%	89,47%	0,1067 *
negativo	23 (7,62%)	240 (79,47%)			
ELISA-IgG					
positivo	6 (1,99%)	27 (8,94%)	55,55%	90,96%	0,0964 *
negativo	24 (7,95%)	245 (81,13%)			
RIFI					
positivo	5 (1,66%)	9 (2,98%)	54,55%	96,80%	0,1751 *
negativo	25 (8,28%)	263 (87,09%)			

*concordância insignificante.

5.5 Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV)

Aproximadamente 20% (51/251) dos gatos submetidos à sorologia para toxoplasmose foram sororeagentes. Destes, 37,25% (19/51) possuíam títulos de 1:16; 47,06% (24/51) títulos de 1:64; 9,80% (5/51) títulos de 1:256 e 5,88% (3/51) títulos de 1:1024.

Dos 302 gatos testados, 5,63% (17/302) apresentaram anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina e apenas uma (0,33%) fêmea sintomática com idade superior a cinco anos possuía antígenos do vírus da leucemia felina.

5.6 Amostragem populacional infectada por *Leishmania* spp.

Dos 66 animais infectados por *Leishmania* spp., 51,51% (34/66) apresentaram sorologia positiva e exame parasitológico direto negativo, enquanto, 34,85% (23/66) possuíam formas amastigotas do parasito na citologia aspirativa de órgãos linfóides sem a presença de anticorpos séricos e 13,64% (9/66) dos animais possuíam exame parasitológico direto positivo e eram sororeagentes aos métodos de ELISA indireto (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da sorologia por ELISA indireto (proteína A e conjugado anti-IgG) e exame parasitológico direto de 66 gatos infectados por *Leishmania* spp., provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)

ELISA	Parasitológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	9 (13,64%)	34 (51,51%)	43
Negativo	23 (34,85%)	0	23
Total	30	36	66

Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre o sexo e a ocorrência de leishmaniose visceral ($p = 0,0316$), sendo os machos considerados mais predispostos. O mesmo foi observado quanto à presença de sinais clínicos sistêmicos ($p < 0,0001$). Todavia, não houve correlação no que concerne à faixa etária destes animais ($p = 0,1316$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Número e percentagem de 66 gatos infectados por *Leishmania* spp., provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral, segundo o sexo, faixa etária e condição clínica. (Araçatuba-SP, 2010)

Variáveis	Animais infectados	<i>P</i>
Sexo		
Macho	41 (62,12%)	0,0316 ^a
Fêmea	25 (37,88%)	
Faixa etária		
6 meses-1 ano	30 (45,45%)	0,1316 ^b
1-3 anos	16 (24,24%)	
3-5 anos	15 (22,73%)	
>5 anos	5 (7,58%)	
Condição clínica		
Sintomático	40 (60,61%)	< 0,0001 ^a
Assintomático	26 (39,39%)	

^aTeste de X²; ^bTeste de Fisher; ($p < 0,05$ significativo).

No que tange à presença de coinfeções, dos 17 animais soropositivos para imunodeficiência felina, 70,59% (12/17) apresentavam leishmaniose, demonstrando uma associação entre as duas enfermidades ($p < 0,0001$). Por outro lado, dos 66 animais infectados por *Leishmania* spp., apenas 25,76% (17/66) apresentavam anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, não havendo associação estatisticamente significativa entre a ocorrência das duas protozoonoses ($p > 1,000$). Sete animais apresentaram anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina e anti-*Toxoplasma gondii*. Destes, 71,43% (5/7) estavam também coinfectados por *Leishmania* spp., verificando-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença dos três agentes infecciosos ($p < 0,0001$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e anti-*Toxoplasma gondii* em número absoluto e percentagem de gatos infectados por *Leishmania* spp., provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)

Agentes infecciosos		<i>Leishmania</i> spp.	<i>P</i>
FIV	positivo	12 (70,59%)	< 0,0001
	negativo	5 (29,41%)	
<i>T. gondii</i>	positivo	17 (25,76%)	> 1,000
	negativo	34 (51,52%)	
FIV e <i>T. gondii</i>	positivo	5 (71,43%)	< 0,0001
	negativo	2 (28,57%)	

^aTeste de McNemar ($p < 0,05$ significativo).

Cerca de 60% (40/66) dos gatos infectados por *Leishmania* spp. manifestaram sintomas compatíveis com a doença. Destes, 52,50% (21/40) não apresentaram coinfeção pelos outros agentes testados (FIV, FeLV e *Toxoplasma gondii*). Os sinais clínicos mais observados nesses animais foram hipertrofia dos linfonodos poplíteos e submandibulares verificada em 25% (10/40) dos gatos, perda de peso em 15% (6/40), alopecia em 7,5% (3/40), secreção ocular em 7,5% (3/40), desidratação em 5,0% (2/40), rarefação pilosa em 5,0% (2/40), descamação cutânea furfurácea em 5,0% (2/40), apatia em 2,5% (1/40), hipertrofia de tonsilas em 2,5% (1/40), hepatoesplenomegalia em 2,5% (1/40), secreção nasal em 2,5% (1/40), opacidade de córnea em 2,5% (1/40), deposição de crostas hemorrágicas na pele de 2,5% (1/40) e deposição de crostas melicéricas na pele de 2,5% (1/40) dos gatos (Figura 2, 3 e 4).

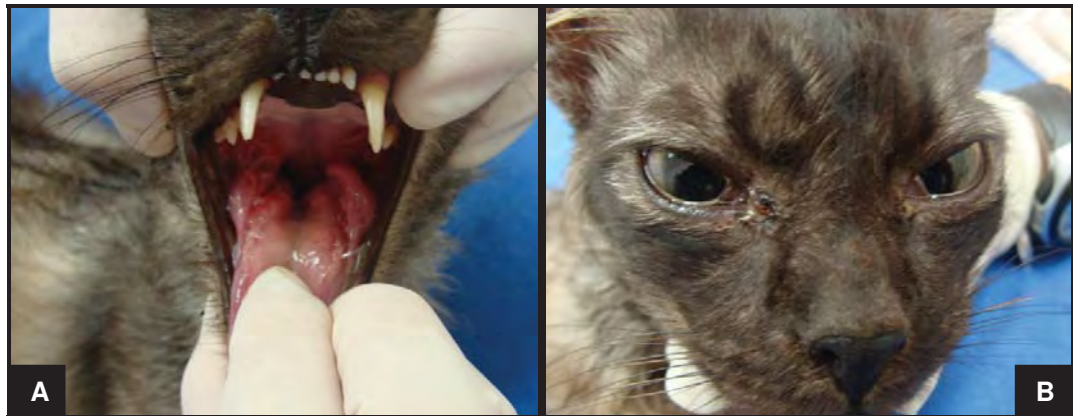


Figura 2 – Gato infectado por *Leishmania* spp.. Verificar a hipertrofia bilateral das tonsilas (A) e secreção ocular bilateral com aspecto purulento (B). (Araçatuba-SP, 2010)



Figura 3 – Gatos infectados por *Leishmania* spp.. Verificar desidratação, perda de peso e apatia (A); opacidade de córnea bilateral do tipo nébula (B). (Araçatuba-SP, 2010)

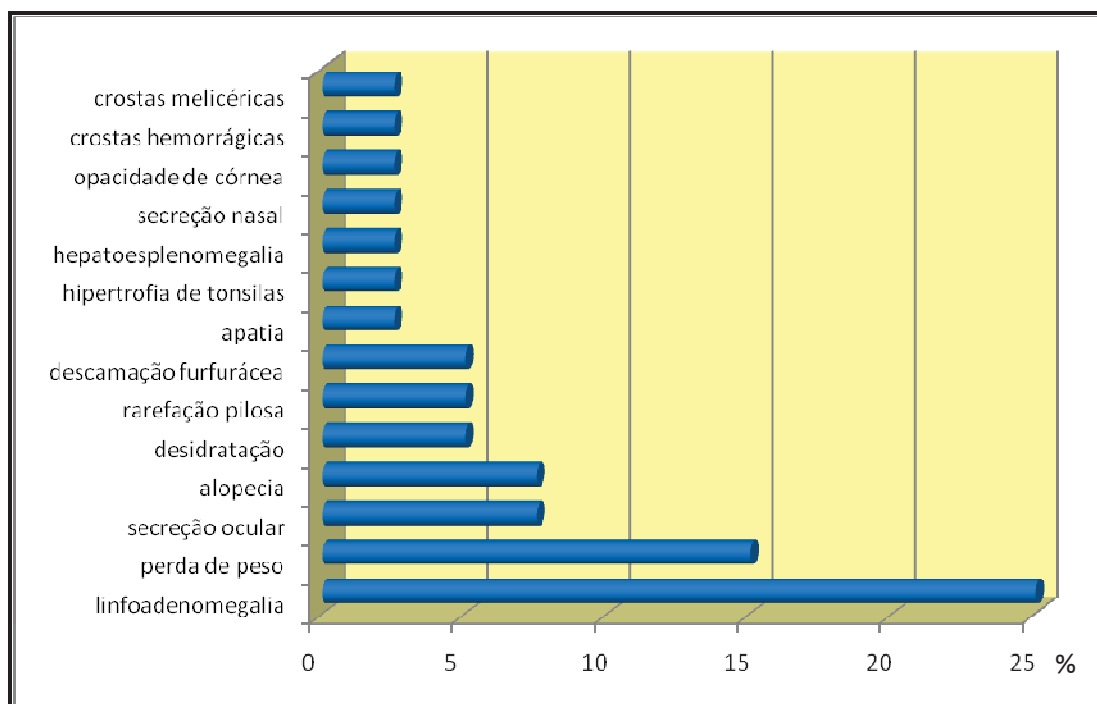


Figura 4 – Distribuição, em porcentagem, segundo as alterações clínicas sistêmicas, de 21 gatos acometidos exclusivamente por leishmaniose, provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)

Dos 40 gatos sintomáticos, quatro (10%) estavam acometidos por leishmaniose visceral e imunodeficiência felina. Dois destes apresentavam lesões crostosas na face (gatos nº 131 e 178), um felino possuía icterícia e hepatoesplenomegalia (gato nº 178), um apresentava perda de peso, hipertrofia dos linfonodos poplíteos, estomatite na região sublingual, alopecia, hiperqueratose e lignificação da pele em região de pavilhão auricular externo (Figura 5A) e outro possuía desidratação moderada, apatia, secreção ocular purulenta bilateral, hiperqueratose, lignificação e hiperpigmentação cutânea das regiões cefálica e cervical (Figura 5B).



Figura 5 – Gatos portadores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* e anti-vírus da imunodeficiência felina. Verificar alopecia, hiperqueratose, lignificação (A e B) em região de pavilhão auricular externo e hiperpigmentação cutânea na face dorsal da região cefálica e cervical (B). (Araçatuba-SP, 2010)

Dos 40 felinos sintomáticos, 12 (30%) estavam coinfectados por *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii*. Em cinco destes constatou-se hipertrofia de linfonodos poplíteos, acompanhada por linfadenomegalia dos submandibulares em três animais. Três gatos manifestaram lesões crostosas em região cervical e perda de peso e um apresentou tonsilas hipertrofiadas. No exame físico geral de um animal foi constatado emaciação, estupor e mucosas pálidas. Um gato (nº 219) possuía lesão ulcerativa na região externa dos pavilhões auriculares com deposição de crostas hemorrágicas bilateral, simétricas e comedos na região mentoniana (Figura 6A). Outro gato (nº 222) apresentou perda tecidual da maxila e dos dentes incisivos superiores, deposição de crostas hemorrágicas no bordo da lesão, desidratação e perda de peso (Figura 6B).



Figura 6 – Gatos portadores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* e anti-*Toxoplasma gondii*. Verificar lesão ulcerativa na região externa dos pavilhões auriculares com deposição de crostas hemorrágicas (A), perda tecidual da maxila e dos dentes incisivos superiores e deposição de crostas hemorrágicas no bordo da ferida (B). (Araçatuba-SP, 2010)

Três (7,5%) gatos dos 40 sintomáticos apresentaram coinfeção por *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e vírus da imunodeficiência felina. Os sinais clínicos observados no primeiro animal (nº 236) foram hipertrofia de linfonodos submandibulares e poplíteos, ulceração na língua (Figura 7A) e dermatite úmida aguda em mamas inguinais. Outro felino (nº 248) manifestou apenas linfadenomegalia de submandibulares e o último (nº 283) apresentava ulceração profunda na face externa dos pavilhões auriculares com deposição de crostas hemorrágicas, perda de peso e leve desidratação (Figura 7B).



Figura 7 – Gatos portadores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-vírus da imunodeficiência felina. Verificar a presença de úlcera na língua de um animal (A) e ulceração profunda em ponta de orelha esquerda com deposição de crostas hemorrágicas (B) em outro felino. (Araçatuba-SP, 2010)

5.7 Detecção de fragmentos de DNA

O sequenciamento do fragmento de DNA na PCR de três gatos resultou em 97% de identidade com as sequências XM 001463664.1, XM 001463663.1, XM 001463662.1, XM 001463661.1, AM 502228.1 (geneBank), confirmando se tratar *Leishmania* do complexo donovani: *Leishmania chagasi*.

6. DISCUSSÃO

O crescente aumento na prevalência de leishmaniose visceral canina no Brasil vem gerando preocupações em profissionais que atuam junto a órgãos de saúde pública, em clínicos veterinários de pequenos animais e também na população residente. Nesse contexto, surge a necessidade de identificar possíveis novos reservatórios domésticos, entre eles os gatos, bem como verificar a existência de fatores predisponentes da infecção por *Leishmania* spp. nesta espécie.

Embora haja alguns estudos pesquisando a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, ainda não está claro se as baixas taxas de prevalências são devidas às falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose (MANCIANTI, 2004; SIMÕES-MATTOS, 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; MAIA et al., 2008;).

A decisão de pesquisar a associação entre leishmaniose e doenças como a imunodeficiência viral felina e a leucemia viral felina baseou-se no fato das últimas serem enfermidades de caráter imunossupressor, o que poderia favorecer a infecção por leishmanias, à semelhança do que ocorre em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) (WHO, 1996). Por outro lado, a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foi devido ao importante papel dos felinos como hospedeiros deste agente. O objetivo desta avaliação foi determinar se um gato infectado por *Leishmania* spp. apresentaria uma maior predisposição ao desenvolvimento de toxoplasmose.

Dos 302 animais estudados, 200 eram oriundos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e 102 de duas residências, localizadas em bairros distintos, que serviam como abrigo de animais. Nestes locais, existiam inúmeros gatos das mais diversas faixas etárias, muitos deles em péssimo estado nutricional. Ademais, 34,44% (104/302) dos felinos possuíam alterações clínicas inespecíficas que poderiam ser decorrentes apenas de má nutrição ou pela presença de agentes infecciosos. A alteração mais frequente foi a ocorrência de dermatopatias em 14,24% (43/302) dos animais, seguida de linfadenomegalia em 12,58% (38/302), perda de peso em 11,92% (36/302) e desidratação em 5,30% (16/302). Os felinos conviviam no mesmo ambiente com cães e aves, tais como galinhas, gansos, perus e papagaios. É importante ressaltar que estes animais viviam em ambiente

promíscuo, ainda sujeitos a manejo alimentar e sanitário precários. Sob esta reflexão, esperava-se que esta amostragem populacional fosse mais suscetível ou tivesse maior predisposição em apresentar a infecção por *Leishmania* spp., bem como coinfeção com o FIV, FeLV e *Toxoplasma gondii*, haja vista o íntimo convívio entre os gatos e a presença de aves domésticas, as quais podem atrair os flebotomíneos (ALEXANDER et al., 2002).

Empregou-se o exame parasitológico direto como teste padrão ouro por este apresentar 100% de especificidade e ser considerado um método confirmatório para o diagnóstico da leishmaniose. Todavia, sua sensibilidade é baixa e sofre influência do grau de parasitismo, do tipo de material coletado (SLAPPENDEL; GREENE et al., 1990) e de uma possível terapia prévia com medicamentos leishmanicidas ou leishmanioestáticos.

Foram evidenciadas formas amastigotas do parasito por meio da citologia aspirativa por agulha fina de órgãos linfóides em 30 (9,93%) animais. Quinze (50%) felinos apresentaram parasitismo tanto em medula óssea quanto em linfonodos, nove (30%) nos linfonodos e seis (20%) somente na medula óssea, demonstrando que para elevar a sensibilidade desta técnica o ideal é realizar CAAF em ambos os órgãos linfóides (Tabela 2). Todavia, tanto a medula óssea quanto o linfonodo podem ser utilizados para realização do exame parasitológico, concordando com as observações de Ozon et al. (1998), Pennisi et al. (2004), Rossi (2007) e Costa et al. (2010).

Devido ao fato de não haver um consenso a respeito da padronização da técnica para o diagnóstico sorológico da leishmaniose felina é que se optou pelo emprego de três técnicas. Para a realização do ELISA indireto utilizou-se soro diluído em 1:200, concentração esta superior à usada para o diagnóstico de leishmaniose visceral em cães, no mesmo laboratório, confirmando as observações de Solano-Gallego et al. (2007). Estes autores sugeriram que os níveis de anticorpos séricos de gatos devam ser menores que os de cães com leishmaniose visceral, havendo, portanto, a necessidade de concentrar o soro de felinos para poder identificá-los. Após várias padronizações, verificou-se que a diluição do conjugado de 1:80.000 foi a que identificou melhor os animais positivos e negativos, discordando de Costa (2008) que, utilizando o mesmo conjugado anti-IgG e mesma técnica de ELISA indireto, optou por trabalhar com o conjugado diluído em 1:40.000. Optou-se pela utilização do cromógeno tetrametilbenzidina dihidroclorada (TMB)

devido à elevação na sensibilidade do teste de ELISA-IgG verificada no estudo conduzido por Costa (2008), quando comparado ao uso de ortofenilenediamina (OPD).

Pertinente à reação de imunofluorescência indireta, também existem divergências na escolha das diluições de soro, que variam de 1:2 a 1:2560 (VITA et al., 2005; Da SILVA et al., 2008; MAIA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; ROSSI, 2007) e de conjugados de 1:20 a 1:100 (MAIA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; ROSSI, 2007). No presente estudo o conjugado foi diluído em 1:100 e os soros foram diluídos em 1:20 e 1:40.

A sensibilidade do método de ELISA-proteína A (56,60%) foi semelhante à apresentada com a utilização de IgG (55,55%), valores estes superiores aos obtidos por Costa (2008) ao utilizar a proteína A com o cromógeno OPD (12,5%) e conjugado anti-IgG com TMB (25%). No que diz respeito à especificidade, o ELISA-proteína A apresentou resultado inferior (89,47%) ao ELISA-IgG (90,96%), divergindo dos resultados estabelecidos por Costa (2008) que obtiveram uma melhor especificidade no ELISA-proteína A. A reação de imunofluorescência indireta apresentou sensibilidade e especificidade de 54,55% e 96,80%, respectivamente, ao passo que Rossi (2007) obteve valores inferiores de sensibilidade (12,5%) e próximos aos de especificidade (100%) (Tabela 6).

Dos 14 gatos com diagnóstico de leishmaniose visceral por meio da reação de imunofluorescência indireta, 71,43% (10/14) apresentaram títulos de anticorpos de 1:40, concordando com os achados de Vita et al. (2005) ao detectarem anticorpos anti-*Leishmania infantum* com títulos de 1:40 na maioria (60,61%) dos felinos testados na Região de Abruzzo. Ao passo que apenas um (7,14%) animal foi sororeagente até a titulação de 1:160, semelhante ao observado por Poli et al. (2002) ao avaliarem 110 gatos da Itália e somente um animal sororeagir até 1:160. Nenhum animal avaliado sororeagiu apresentou título de 1:320, discordando dos achados de Mancianti et al. (2004) e Silva et al. (2008) que verificaram títulos de 1:320 em gatos naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

Com o objetivo de estimar mais fidedignamente a real prevalência de infecção por *Leishmania* spp. na população estudada, a presente pesquisa se baseou nos resultados do exame parasitológico e nos métodos sorológicos por ELISA indireto, uma vez que estes apresentaram boa concordância entre si. Como a concordância entre as técnicas de ELISA e de RIFI foi fraca, optou-se por não utilizar os

resultados obtidos com a utilização da última. A prevalência de leishmaniose felina de 21,85% (66/302), na população estudada foi superior às taxas determinadas em diversos países, as quais oscilaram de 0,9% a 16,3% (POLI et al., 2002; VITA et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; AYLLON et al., 2008; NASEREDDIN et al., 2008), e inferior ao valor de 60% observado por Martín-Sánchez et al. (2007) ao avaliarem gatos encaminhados à clínicas particulares do sudeste da Espanha.

Ao comparar os resultados da presente pesquisa com estudos prévios de prevalência da leishmaniose felina conduzidos também no município de Araçatuba, observou-se que as taxas foram superiores às estabelecidas por Rossi (2007), Neto (2009) e Costa et al. (2010) e que obtiveram valores de 6,5%, 3,5% e 11,5%, respectivamente. É importante salientar que as técnicas empregadas e os critérios de positividade nos estudos supracitados não foram os mesmos e podem também influenciar na diversidade dos resultados, como citado por Danta-Torres et al. (2006).

Na população avaliada, a maioria dos gatos positivos para leishmaniose eram machos (41/66), discordando dos achados de Daikon et al. (2009) que não observaram associação entre a ocorrência de leishmaniose e o sexo dos animais positivos ao pesquisarem anticorpos anti-*Leishmania* spp. em 284 gatos da Grécia. Não houve associação entre a faixa etária e a presença da infecção, corroborando com os achados de Solano-Gallego et al. (2007) e Nasereddin et al. (2008) ao avaliarem populações de felinos com idades variando de 3,6 meses a 17 anos.

As concordâncias entre o método parasitológico direto com o ELISA-proteína A ($Kappa = 0,1067$) e ELISA-IgG ($Kappa = 0,0964$) foram consideradas insignificantes, concordando com os relatos de Costa (2008) que encontrou valores de coeficiente $Kappa$ de 0,0782 e 0,0894 para o teste de ELISA-proteína A e ELISA-IgG, respectivamente. A concordância entre o exame parasitológico direto e a reação de imunofluorescência indireta ($Kappa = 0,1751$) também foi insignificante, semelhante aos achados de Rossi (2007) que obteve uma concordância sofrível entre os métodos ($Kappa = 0,2152$) (Tabela 6).

A discordância entre os resultados obtidos nos exames parasitológicos e nos testes sorológicos dos animais estudados reforça a hipótese de que os gatos não desenvolvem resposta imune humoral importante quando da infecção por *Leishmania* spp.. Tal observação é reforçada pelo fato de que dos 30 animais parasitologicamente positivos, 70% (21 gatos) eram soronegativos. De acordo com

Solano-Gallego et al. (2007), os felinos apresentam uma resposta imune predominantemente celular, o que poderia promover uma diminuição da carga parasitária e conferir resistência natural à infecção, exceto quando da ocorrência de eventos imunossupressores.

A soroprevalência de imunodeficiência viral felina na população foi de 5,63%, valor inferior à taxa de 6,5% observada por Solano-Gallego e colaboradores (2007) ao avaliarem 76 felinos da região noroeste do Mediterrâneo (6,5%), e de Martín-Sánchez e colaboradores (2007) que encontraram soroprevalência de 7,9% em gatos na Espanha. É importante ressaltar que, à semelhança deste trabalho, os animais avaliados por estas duas equipes de pesquisa eram provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.

Na população ora avaliada, a soroprevalência de FeLV foi de 0,33%, valor este inferior ao relatado por Solano-Gallego, Martín-Sánchez e seus colaboradores em 2007, cujas taxas de prevalência da doença foram de 7,8% e 35,7%, respectivamente. Apesar de terem observado taxas mais elevadas de infecção pelo vírus da leucemia felina nas populações estudadas, os autores supracitados não observaram associação entre a leishmaniose e a leucemia viral felina, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Nos animais em que foram pesquisados anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* a soroprevalência foi de 20,32%, valor próximo a 24,20% observado por Bresciani e colaboradores ao pesquisarem a doença em 500 felinos do mesmo município, por meio da reação de imunofluorescência indireta. Nos dois estudos conduzidos no município de Araçatuba-SP, as soroprevalências foram inferiores às observadas por Pinto e colaboradores, em 2009, que encontraram taxas de 32,5% em uma população de 245 felinos de Porto Alegre-RS.

Verificou-se uma correlação estatisticamente significativa entre a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) e por *Leishmania* spp.. Dentro da população estudada, 17 gatos possuíam FIV (5,63%), dos quais 12 (70,59%) apresentavam também leishmaniose visceral, contrapondo-se aos resultados obtidos por Martín-Sánchez et al. (2007), Solano-Gallego et al. (2007) e Ayllon et al. (2008), os quais não verificaram associação entre a ocorrência das duas enfermidades. Lucas et al. (1998) verificaram uma forte associação entre a ocorrência de toxoplasmose e de imunodeficiência viral felina, fato verificado em sete (2,32%) gatos da população avaliada. Destes, cinco (71,43%) possuíam também leishmaniose. Os resultados do

presente estudo sugerem que a ocorrência de imunodeficiência viral felina, uma doença imunossupressora, pode predispor à infecção por parasitos do gênero *Leishmania*.

Contudo, apesar da ocorrência de coinfecção por *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e/ou FIV em 29 gatos, 37 animais (56,06%) possuíam apenas leishmaniose visceral, sugerindo que numa área endêmica para a doença esta espécie animal pode se infectar independente da ocorrência de outras doenças infecciosas. De acordo com Mancianti (2004) as infecções por FIV e/ou FeLV, bem como o estresse, podem induzir a uma resposta imune celular prejudicada, favorecendo o desenvolvimento de leishmaniose visceral em gatos.

Dos 66 gatos infectados por *Leishmania chagasi*, apenas 17 possuíam anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (25,76%), não tendo sido verificada associação estatisticamente significativa entre a ocorrência das duas enfermidades (Tabela 9), concordando com os relatos de Nasereddin et al. (2008) e discordando de Pennisi e colaboradores (2004) atentaram para a presença de coinfecção pela *Leishmania* spp., pelo FIV e *Toxoplasma gondii* em um gato com hepatomegalia, anorexia, mucosas pálidas e alopecia. Gennari et al. (2006) avaliando 98 cães portadores de leishmaniose visceral, no município de Araçatuba-SP, identificaram 41% de soroprevalência para a toxoplasmose, revelando a presença de associação entre as duas enfermidades em cães.

A maioria dos gatos infectados por *Leishmania* spp. no presente estudo eram sintomáticos (40/66), discordando dos achados de Nasereeddin et al. (2008) que não observaram associação estatisticamente significativa entre a doença e os sintomas. Dentre as alterações clínicas dos animais que apresentavam somente leishmaniose destacam-se, em ordem decrescente, hipertrofia de linfonodos poplíteos e submandibulares, perda de peso (Figura 3A), alopecia, secreção ocular (Figura 2B), desidratação, rarefação pilosa, estomatite, descamação cutânea furfurácea, apatia (Figura 3A), hipertrofia de tonsilas (Figura 2A), hepatoesplenomegalia, secreção nasal, opacidade de córnea (Figura 3B), crostas hemorrágicas e melicéricas. Manifestações clínicas semelhantes foram relatadas por Poli e colaboradores (2002) que examinaram um felino de seis anos de idade e infectado por *Leishmania infantum* com quadro clínico de linfadenomegalia, estomatite, emaciação, letargia e nódulo ulcerado em pálpebra.

As desordens clínicas observadas exclusivamente nos gatos infectados por *Leishmania* spp. foram a presença de secreção nasal, opacidade de córnea e crostas melicéricas. Outras alterações sistêmicas comumente encontradas no estudo, tais como hipertrofia de linfonodos poplíteos e submandibulares, perda de peso, apatia, desidratação, hepatoesplenomegalia, hipertrofia de tonsilas, ulceração na língua (Figura 7A), secreção ocular, alopecia, hiperqueratose, lignificação (Figura 5 A e B) e ulceração cutânea profunda (Figura 7B) foram evidenciadas em felinos coinfectados por *Leishmania* spp., vírus da imunodeficiência felina e/ou *Toxoplasma gondii*.

Outros sinais clínicos foram descritos por Vita e colaboradores (2005), tais como diarreia crônica, depressão, hipertermia, distensão abdominal, natimortos, mucosas congestionadas ou pálidas, anorexia, êmese, poliúria, polidipsia, otite e secreção nasal, os quais não foram observados nos gatos da presente pesquisa. É importante detalhar que na pesquisa dos últimos autores foi diagnosticada imunodeficiência viral em 15,15% (5/33) dos gatos testados.

No que tange às lesões cutâneas dos gatos coinfectados por *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e vírus da imunodeficiência felina, as mais observadas foram alopecia, rarefação pilosa, descamação cutânea furfurácea, deposição de crostas hemorrágicas (Figura 7B) e melicéricas. Estas foram observadas principalmente em região cefálica e cervical. Tais achados, concordam parcialmente com os relatos de Hérvas et al. (1999) e Pennisi et al. (2004) que ao examinar gatos com leishmaniose visceral observaram alopecia, rarefação pilosa, descamação cutânea, à semelhança do presente trabalho. No entanto, também evidenciaram a presença de eritema e ulcerações profundas, as quais são observadas em cães acometidos por leishmaniose visceral como comentado por Feitosa et al. (2000). No presente trabalho, as alterações clínicas de hipertrofia de tonsilas, hepatoesplenomegalia, deposição de crostas hemorrágicas e melicéricas em gatos infectados por *Leishmania* spp. não foram relatadas na espécie felina por outros autores. Todavia, Feitosa e colaboradores (2000) chamaram a atenção para a ocorrência de manifestações dermatológicas como alopecia, lesões ulcerativas dermatite seborréica em cães.

Devido à dinâmica epidemiológica da leishmaniose e às diversas dermatopatias encontradas nos gatos acometidos pela doença, fez-se necessária a identificação da espécie de *Leishmania* nesses animais, haja vista que os padrões

cutâneos de lesões ulcerativas e hemorrágicas foram evidenciados, principalmente, em plano nasal e pavilhão auricular como descrito por autores que identificaram a forma cutânea da enfermidade (CRAIG et al., 1986; HERVÁS et al., 1999; SOUZA et al., 2009). Deste modo, a confirmação de infecção natural por *Leishmania chagasi* foi possível por meio da RT-PCR realizada em três felinos parasitologicamente positivos.

Apesar de poucos relatos na literatura no que diz respeito às manifestações clínicas da leishmaniose visceral felina, o presente estudo verificou que gatos residentes em área endêmica para leishmaniose visceral são predispostos à coinfeção por *Leishmania* spp. e vírus da imunodeficiência felina, e que parte deles desenvolvem sintomas inespecíficos e devem ser investigados em um diagnóstico diferencial.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitiram concluir que:

- a prevalência de infecção por *Leishmania* spp., pelo vírus da imunodeficiência e vírus da leucemia na população de 302 gatos foi de 21,85%, 5,63% e 0,33%, respectivamente;

- a soroprevalência de infecção pelo *Toxoplasma gondii*, na população de 251 felinos avaliados, foi de 20,32%;

- gatos residentes em área endêmica para leishmaniose visceral são predispostos à coinfeção por *Leishmania* spp. e vírus da imunodeficiência felina, e que parte deles desenvolvem sintomas inespecíficos e devem ser investigados em um diagnóstico diferencial;

- a presença de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina favorece a ocorrência e leishmaniose visceral, no entanto, em áreas endêmicas pode haver infecção por *Leishmania chagasi* mesmo na ausência de outras doenças infecciosas;

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.B.; LINHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 553p.
- ABUJAMRA, A.L.; FALLER, D.V.; GHOSH, S.K. Mutations that abrogate transactivation activity of the feline leukaemia virus long terminal repeat do not affect virus replication. **Virology**, v. 309, n. 1, p. 294-305, 2003.
- ACKLEY, C.D.; YAMAMOTO, J.K.; LEVY, N.B.; PEDERSEN, N.C.; COOPER, M.D. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v.64, p.5652-5655, 1990.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.1480-1485, 2002.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; LUCIA, E.G. Seropidemiological survey of infection by leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1, p.3448-3449, 2000.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JUNIOR, R. H.; BADARÓ, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, p.251-255, 1995.
- AVERY, P. R. Feline immunodeficiency virus. In: LAPPIN, M. R. **Feline internal medicine secrets**. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2001. cap.77, p.391-397.
- AYLLON, T.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; VILLAESCURA, A.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Serologic and Molecular Evaluation of *Leishmania infantum* in Cats from Central Spain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, p.361-364, 2008.
- BACHMANN, M. H.; MATUIASON-DUBARD, C.; LEARN, G. H.; RODRIGO, A. G.; SODORA, D. L.; MAZZETTI, P.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4241-4253, 1997.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Eds). **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 685-698. 2006
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**. v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

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

BRESCIANI, K.D.S.; PERRI, S.H.V.; VIOL, M.A.; AQUINO, M.C.C.; CAMOSE, L.G.; JUNIOR, H.G.; CORRÊA, A.F.L.; LANGONI, H. Avaliação da ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em felinos do município de Araçatuba, SP. *Veterinária e Zootecnia*, v.17, n.1 supl 1, p.87, 2010.

BURKHARD, M. J.; HOOVER, E. A. Feline immunodeficiency virus (FIV): clinical manifestations and management. **Feline Practice**, v. 27, n. 1, p. 10-14, 1999.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 71, p. 86-92, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. de, KATZ, G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, supl 2, p.63-64, 1999.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, may 2003.

COSTA, A. I. P.; CASANOVA, C.; RODAS, L. A. C.; GALATI, E. A. B. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 6, p. 632-633, 1997.

COSTA, C.H.N.; GOMES, R.B.B.; SILVA, M.R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.S.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **Journal Infectious Disease**. v.182, w.3, p.997-1000, 2000.

COSTA, T. A. C. **Utilização da técnica de ELISA com proteína A e anti-IgG para o diagnóstico sorológico da leishmaniose felina**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2008.

COSTA, T.A.C., ROSSI, C.N., LAURENTI, M.D., GOMES, A.A.D., VIDES, J.P., SOBRINHO, L.S.V., MARCONDES, M., "in press". Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**.

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

COSTA, U. M.; REISCHAK, D.; SCHMITT, A. C.; RENCK, L.; OLIVEIRA, E. S.; FERREIRO, L. Detection of feline leukemia virus (FeLV) antigen from 1992 to june 2000 by indirect immunofluorescence test in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v. 5, suppl. 1, p. 94-95, 2000.

COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p.149-155, 2005.

CRAIG, T.M.; BARTON, C.L.; MERCER, S.H.; DROLESKEY, B.E.; JONES, L.P. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, p. 1100-1102, 1986.

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

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F. L. C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose feline: revisão de literature. **Revista Clínica Veterinária**. v. 11, n. 61, p. 32-39, 2006.

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

DIETZE, R.; ALENCAR, J.E.; NEVES, J. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R.: Doenças infecciosas e parasitárias. 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara: Koogan, 1991, p.706-717.

DORNY, P.; SPEYBROECK, N.; VERSTRAETE, S.; BAEKE, M.; De BECKER, A.; BERKVENS, D.; VERCRUYSSSE, J. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. **Veterinary Record**, v.151, n.21, p.626-629, 2002.

DUA, N.; REUBEL, G.; MOORE, P.F. An experimental study of primary feline immunodeficiency virus infection in cats and a historical comparison to acute simian and human immunodeficiency virus diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 1, p. 337-335, 1994.

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.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1. **Anais**. Jaboticabal, 2006.

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

FERRER, L.M. **Clinical aspects of canine leishmaniasis**, In: PROCEEDINGS OF THE INTERNACIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. p.6-10.

FIGUEIREDO, F.B.; BONNA, I.C.F.; NASCIMENTO, L.D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T.M.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MADEIRA, M.F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.141-145, 2009.

FOOSHEE, S. K. Feline immunodeficiency virus infection. In: NORSWORTHY, G.D.; CRYSTAL, M.A.; FOOSHEE, S.K.; TILLEY, L. P.; CRYSTAL, M. **The feline patient: essentials of diagnosis and treatment**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. Cap.52, p.193-196.

GEBHARD, D.H.; DOW, J.L.; CHILDERS, T.A.; ALVELO, J.I.; TOMPKINS, M.B.; TOMPKINS, W.A.F. Progressive expansion of an L-selectin-negative CD8 cell with anti-feline immunodeficiency virus (FIV) suppressor function in the circulation of FIV-infected cats. **Journal of Infection Disease**, v.180, n.5, p.1503-1513, 1999.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GENNARI, S.M.; CAÑON-FRANCO, W.A.; MARCONDES, M.; IKEDA, F.A.; LIMA, V.M.F.; AMAKU, M. Presence of anti-*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.43, n.5, p.613-619, 2006.

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

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal of Parasitology**. v.35, n.11-12, p.1169-1180, 2005.

GREENE, C.E. et al. Leishmaniasis. In : _____. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. ch.73, p.685-697, 2006. (a)

GREENE, C.E. et al. Toxoplasmosis and Neosporosis. In : _____. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. ch.80, p.754-775, 2006. (b)

GREVOT, A.; JAUSSAUD HUGUES, P.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; OZON, C.; HAAS, P.; BRETON, C.; BOURDOISEAU, G. Leishmaniosis due to *Leishmania*

infantum in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, sorological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v.12, n.3, p.271-275, 2005.

HAGIWARA, M. K.; RECHE JUNIOR, A.; LUCAS, S. R. R. Estudo clínico de infecção pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.4, p.35-38, 1997.

HARDY JUNIOR, W.D. Oncogenic viruses of cats: the feline leukemia and sarcoma viruses. In: HOLZWORTH, J. **Diseases of the cat: medicine & surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1987. p. 246-264.

HATAM, G. R.; ADNANI, S. J.; ASGARI, Q.; FALLAH, E.; MOTAZEDIAN, M. H.; SADJJADI, S. M.; SARKARI, B. First Report of Natural Infection in Cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. 2009. Disponível em <http://liebertonline.com/doi/pdfplus/10.1089/vbz.2009.0023cookieset=1>>Acesso em: 4 maio 2010.

HERVÁS, J.; CHANCON-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.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICH, R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. 2.ed. London: Academic Press, 1987, p.1-121.

LANDIS, J.R., KOCH, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, p.159-174.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; CUNHA, E.L.P.; CUTOLO, A.A. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.5, p.243-244, 2001.

LAPPIN, M. R. Feline leukemia virus. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE DOENÇAS INFECCIOSAS, 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1998. p. 36-44.

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2245-2249, 2008.

LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R; CORBETT, C.E.P.; DIETZE, R. Evaluation of Kalazar detect rapid test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 3, 2005. Italy. **Abstract book...**Italy, 2005. p.160.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T.; ROURA, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in cat. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.71-75, 2005.

LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, n.3, p.371-376, 2006.

LEONTIDES, L.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A.F.; GALATOS, A.D.; MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, p.19-27, 2002.

LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; RECHE Jr, A.; GERMANO, P. M. L. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.1, p.41-45, 1998.

LUVIZOTTO, M. C. R.; BIAZZONO, L.; EUGÊNIO, F. R.; ANDRADE, A. L. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 20., 1999, Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia**, 1999. p.24-25.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v.8, 2008. Disponível em <<http://liebertonline.com/doi/pdfplus/10.1089/vbz.2007.0247cookieset=1>> Acesso em: 4 maio 2010.

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

MARCONDES, M. **Leishmaniose uma zoonose**. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 7., SÃO PAULO, 2007.

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; Di MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, w.3-4, p.357-360, 2007.

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

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 5249-5255, 2004.

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

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

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O.; Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. ; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11.ed., São Paulo, Atheneu, 2007. p.67-83.

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

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11.ed., São Paulo, Atheneu, 2005. p.41-46.

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

NAUCKE, T. J. Leishmaniose bei katzen. **Rundsehreiben**, n.4, 2000. Capturado: 21 jan. 2007. Disponível em: <<http://members.aol.com/TJNaucke/letter04.html>>.

NETO, L.S. Uso dos Antígenos Total, FML e rK39 em ELISA Indireto para Detecção de Anticorpos anti-*Leishmania* spp. em *Felis catus*. 2009. 48f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina Veterinária – Universidade estadual Paulista, Araçatuba.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, London, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

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.

PANTGINIS, J.; BEATY, R. M.; LEVY, L .S.; LENZ, J. The feline leukemia virus long terminal repeat contains a potent genetic determinant of T-cell lymphomagenicity. **Journal of Virology**, v.71, n.12, p.9786-9791, 1997.

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

PENNISI, M. G. Case report of *Leishmania* spp. infection in two cats from Aeolian archipelago (Italy). In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 24. 1999, Lyon. **Proceedings...** Lyon: WSAVA, 1999.

PENNISI, M. G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: INTERNACIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla. **Proceedings...** Sevilla: Intervet, 2002. p.39-48.

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

PESSÔA, B.S.; MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 11ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988, p.66-124.

PINTO, L.D.; ARAUJI, F.A.P.; STOB, N.S.; MARQUEZ, S.M.T. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2464-2469, 2009.

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.

RECHE JÚNIOR, A.; HAGIWARA, M.R.; LUCAS, S.R.R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, n. 3, p.152-155, 1997.

REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991, p.182-226.

REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p.214-240.

ROSSI, C. N. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba - São Paulo - Brasil**. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

RUFENACH, S.; SAGER, H.; MULLER, N.; SCHAEERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M. M.; ROOSIE, P. J. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Record**. v.156, n.7, p.542-545, 2005.

SANTOS, V.C. **Determinação do pH e estudo dos mecanismos envolvidos em seu controle no intestino médio de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Díptera: Psychodidae) durante a digestão de sangue e açúcares** / Vânia Cristina dos Santos. Belo Horizonte: [s.n.], 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas, 2006. 124p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves - São Paulo: A Secretaria, 2006.158p.

SAS Institute Inc. **SAS OnlineDoc®**, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SAVANI, E.S.M.M.; OLIVEIRA CAMARGO, M.C.G.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'AURIA, S.R.M.; 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, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.3, p.229-233, 2004.

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

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

SHELTON, G. H.; ABKOWITZ, J. L.; LINENBERGER, M. L.; RUSSELL, R. G.; GRANT, C. K. Chronic leukopenia associated with feline immunodeficiency virus infection in a cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.194, n.2, p.253-255, 1990.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the States of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p.671-683, 1996.

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

SIMÕES-MATTOS, L. **O gato doméstico (*Felis catus*) com potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania* (*Viannia*) *brasiliensis***. 2005. 231f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2005.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.49, n.1, p.55-60, 2003.

SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B.Saunders, 1990. p.450-458.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PÓRTUS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, n.4, p.676-680, 2007.

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

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

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R. Leucemia viral felina. In: SOUZA, H. J. M. **Coletâneas em medicina e cirurgia felina**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2003. Cap.22, p.251-271.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do Município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, Curitiba, n.36, p.14-21, 2002.

TANIGUCHI, A.; ISHIDA, T.; WASHIZU, T.; TOMODA, I. Humoral immune response to T-cell dependent and independent antigens in cats infected with feline immunodeficiency virus. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.53, n.2, p.333-335, 1991.

TEIXEIRA, C. H. R.; SOUZA, H. J. M. Manifestações clínicas associadas à infecção pelo vírus da imunodeficiência felina. In: SOUZA, H.J.M. **Coletâneas em medicina e cirurgia felina**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2003. Cap.25, p.301-321.

TOLEZANO, J.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; ULIANA, S.R.B.; ARAÚJO, M.F.L.; TANIGUCHI, H.H.; BARBOSA, J.A.R.; BARBOSA, J.E.R.; PINTO, P.L.S.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região ;doença emergente em terras paulistas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, Supl. 1, p.218, 1999.

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

WILLETT, B. J.; FLYNN, J. N.; HOSIE, M. J. FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS. **Immunology Today**, v.18, n.4, p.182-189, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO apud CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) no éctopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras**, 1999. 84f. Tese (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of Control of Tropical Diseases. Epidemiological analyses of retrospective cases of *Leishmania*/HIV co-infection. World Health Organization/LEISH/96.39.1996.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of the American Medical Association**, v.194, n.2, p.213-220, 1989.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A. Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.2, p.69-70, 2000.

ZANETTE, M.F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEAA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"LEISHMANIOSE FELINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM IMUNODEFICIÊNCIA VIRAL, LEUCEMIA VIRAL E TOXOPLASMOSE EM GATOS DO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA"** sob responsabilidade de **Profa Dra MARY MARCONDES** e colaboração de **LUDMILA SILVA VICENTE SOBRINHO, Profa Dra SÍLVIA HELENA VENTUROLI PERRI, Profa Dra SOLANGE MARIA GENNARI** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 05 de agosto de 2008 de acordo com o protocolo no. 2008-005699.

Araçatuba, 05 de agosto de 2008

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Apêndice A – Valores de densidades ópticas médias (D.O.), corrigidos (A/P), títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (RIFI-leish) e anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI-toxo), de gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, obtidas por meio das técnicas de ELISA-proteína A (ELISA-protA), ELISA- IgG e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), respectivamente. (Araçatuba-SP, 2010)

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
1	0,156	0,018	0,169	-0,022	Negativo	Negativo
2	0,103	-0,019	0,125	-0,049	Negativo	Negativo
3	0,115	-0,010	0,038	-0,102	Negativo	Negativo
4	0,073	-0,039	0,071	-0,081	Negativo	Negativo
5	0,063	-0,046	0,131	-0,045	Negativo	Negativo
6	0,066	-0,044	0,085	-0,073	Negativo	Negativo
7	0,091	-0,027	0,085	-0,073	Negativo	Negativo
8	0,116	-0,009	0,179	-0,016	Negativo	Negativo
9	0,097	-0,022	0,165	-0,025	Negativo	Negativo
10	0,074	-0,038	0,084	-0,074	Negativo	Negativo
11	0,251	0,085	0,451	0,149	Negativo	1:256
12	0,063	-0,046	0,051	-0,094	Negativo	Negativo
13	0,091	-0,027	0,107	-0,059	Negativo	.
14	0,088	-0,029	0,053	-0,092	Negativo	Negativo
15	0,037	-0,064	0,043	-0,098	Negativo	Negativo
16	0,156	0,019	0,202	-0,002	Negativo	Negativo
17	0,103	-0,019	0,099	-0,064	Negativo	Negativo
18	0,158	0,019	0,104	-0,062	Negativo	.
19	0,105	-0,017	0,127	-0,048	Negativo	.
20	0,238	0,076	0,302	0,059	Negativo	Negativo
21	0,114	-0,011	0,192	-0,008	Negativo	.
22	0,089	-0,028	0,175	-0,018	Negativo	Negativo
23	1,454	0,919	2,016	1,097	Negativo	1:64
24	0,153	0,017	0,175	-0,019	Negativo	.
25	0,085	-0,031	0,063	-0,087	Negativo	.
26	0,081	-0,034	0,137	-0,041	Negativo	Negativo
27	0,122	-0,005	0,158	-0,029	Negativo	1:64
28	0,050	-0,055	0,062	-0,087	Negativo	Negativo
29	0,345	0,149	0,309	0,063	Negativo	Negativo
30	0,333	0,142	0,428	0,135	Negativo	.
31	0,049	-0,056	0,036	-0,103	Negativo	.
32	0,144	0,009	0,156	-0,030	Negativo	Negativo
33	0,111	-0,013	0,156	-0,030	Negativo	Negativo
34	0,186	0,039	0,178	-0,017	Negativo	Negativo
35	0,140	0,007	0,222	0,009	Negativo	1:16
36	0,200	0,049	0,121	-0,051	Negativo	Negativo
37	0,121	-0,006	0,103	-0,062	Negativo	Negativo
38	0,155	0,018	0,184	-0,013	Negativo	Negativo
39	0,142	0,009	0,108	-0,059	Negativo	Negativo

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
40	0,150	0,014	0,272	0,040	Negativo	Negativo
41	0,05	0,047	0,075	-0,105	Negativo	Negativo
42	0,068	-0,051	0,153	-0,061	Negativo	Negativo
43	0,14	-0,002	0,181	-0,044	Negativo	Negativo
44	0,154	0,006	0,154	-0,060	Negativo	Negativo
45	0,202	0,039	0,219	-0,023	Negativo	Negativo
46	0,261	0,078	0,206	-0,030	Negativo	Negativo
47	0,378	0,157	0,443	0,105	Negativo	Negativo
48	0,191	0,031	0,247	-0,007	Negativo	Negativo
49	0,117	-0,018	0,261	0,001	Negativo	Negativo
50	0,093	-0,034	0,135	-0,070	Negativo	Negativo
51	0,284	0,094	0,322	0,036	Negativo	Negativo
52	0,186	0,028	0,355	0,055	Negativo	Negativo
53	0,037	-0,072	0,056	-0,116	Negativo	Negativo
54	0,227	0,056	0,315	0,032	Negativo	1:64
55	0,590	0,300	0,557	0,171	Negativo	Negativo
56	0,169	0,016	0,379	0,069	Negativo	Negativo
57	0,134	-0,007	0,264	0,003	Negativo	Negativo
58	0,119	-0,016	0,276	0,009	Negativo	1:16
59	0,096	-0,033	0,126	-0,076	Negativo	Negativo
60	1,922	1,196	2,376	1,210	1:160	.
61	0,105	-0,027	0,125	-0,076	Negativo	.
62	0,145	0,006	0,233	-0,015	Negativo	Negativo
63	0,026	-0,079	0,035	-0,128	Negativo	Negativo
64	0,142	-0,002	0,145	-0,065	Negativo	.
65	0,131	-0,008	0,225	-0,019	Negativo	Negativo
66	0,075	-0,046	0,169	-0,051	Negativo	1:64
67	0,119	-0,017	0,217	-0,024	Negativo	Negativo
68	0,069	-0,050	0,131	-0,073	Negativo	Negativo
69	0,044	-0,067	0,088	-0,098	Negativo	Negativo
70	0,14	-0,003	0,174	-0,049	Negativo	Negativo
71	0,138	-0,004	0,489	0,131	Negativo	.
72	0,284	0,094	0,439	0,103	Negativo	.
73	0,091	-0,036	0,147	-0,064	Negativo	Negativo
74	0,092	-0,035	0,211	-0,027	Negativo	Negativo
75	0,077	-0,045	0,092	-0,095	Negativo	Negativo
76	0,112	-0,022	0,289	0,018	Negativo	.
77	0,531	0,260	0,820	0,321	Negativo	.
78	0,406	0,176	0,502	0,139	Negativo	.
79	0,147	0,002	0,141	-0,067	Negativo	.
80	0,177	0,022	0,193	-0,038	Negativo	.
81	0,113	-0,021	0,146	-0,064	Negativo	.
82	0,082	0,012	0,247	0,108	Negativo	.
83	0,188	0,136	0,288	0,146	1:40	.

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
84	0,113	0,048	0,158	0,026	Negativo	.
85	0,162	0,106	0,287	0,145	Negativo	.
86	0,119	0,056	0,156	0,023	Negativo	.
87	0,068	-0,022	0,077	-0,050	Negativo	.
88	0,079	-0,009	0,119	-0,013	Negativo	.
89	0,031	-0,060	0,060	-0,064	Negativo	Negativo
90	0,086	-0,004	0,146	0,010	Negativo	.
91	0,128	0,042	0,123	-0,009	Negativo	Negativo
92	0,126	0,040	0,175	0,036	Negativo	Negativo
93	0,111	0,024	0,169	0,031	Negativo	Negativo
94	0,161	0,077	0,198	0,056	Negativo	Negativo
95	0,068	-0,021	0,086	-0,042	Negativo	1:16
96	0,098	0,010	0,254	0,105	Negativo	1:64
97	0,054	-0,036	0,099	-0,031	Negativo	1:64
98	0,023	-0,068	0,050	-0,073	Negativo	Negativo
99	0,095	0,007	0,117	-0,014	Negativo	Negativo
100	0,039	-0,052	0,074	-0,052	Negativo	Negativo
101	0,526	0,462	0,717	0,510	Negativo	1:64
102	0,055	-0,035	0,086	-0,042	Negativo	Negativo
103	0,142	0,057	0,090	-0,038	Negativo	1:16
104	0,042	-0,048	0,045	-0,078	Negativo	Negativo
105	0,055	-0,034	0,076	-0,051	Negativo	Negativo
106	0,053	-0,037	0,043	-0,079	Negativo	Negativo
107	0,058	-0,032	0,070	-0,059	Negativo	Negativo
108	0,064	-0,025	0,139	0,004	Negativo	Negativo
109	0,024	-0,068	0,025	-0,095	Negativo	Negativo
110	0,028	-0,064	0,034	-0,087	Negativo	Negativo
111	0,120	0,034	0,235	0,089	Negativo	Negativo
112	0,044	-0,046	0,149	0,014	Negativo	1:16
113	0,194	0,111	0,501	0,321	Negativo	Negativo
114	0,027	-0,064	0,083	-0,044	Negativo	Negativo
115	0,051	-0,039	0,066	0,068	Negativo	Negativo
116	0,02	-0,072	0,030	-0,091	Negativo	Negativo
117	0,038	-0,053	0,043	-0,079	Negativo	Negativo
118	0,052	-0,038	0,075	-0,052	Negativo	Negativo
119	0,052	-0,038	0,082	-0,045	Negativo	Negativo
120	0,151	0,067	0,220	0,076	Negativo	Negativo
121	0,084	-0,004	0,094	-0,035	Negativo	Negativo
122	0,058	-0,032	0,050	-0,073	Negativo	1:16
123	0,072	-0,017	0,109	-0,021	Negativo	Negativo
124	0,044	-0,047	0,076	-0,050	Negativo	1:256
125	0,084	-0,004	0,128	0,005	Negativo	Negativo
126	0,045	-0,046	0,071	-0,055	Negativo	Negativo
127	0,109	0,009	0,216	0,062	Negativo	1:16

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
128	0,065	-0,035	0,082	-0,055	Negativo	Negativo
129	0,092	-0,007	0,162	0,014	Negativo	1:16
130	0,032	-0,068	0,053	-0,080	Negativo	Negativo
131	0,303	0,206	0,371	0,196	Negativo	Negativo
132	0,197	0,098	0,213	0,059	Negativo	Negativo
133	0,070	-0,029	0,212	0,058	Negativo	Negativo
134	0,089	-0,009	0,109	-0,031	Negativo	Negativo
135	0,158	0,059	0,339	0,169	Negativo	Negativo
136	0,104	0,004	0,229	0,073	Negativo	Negativo
137	0,083	-0,016	0,194	0,042	1:80	Negativo
138	0,038	-0,062	0,051	-0,081	Negativo	.
139	0,147	0,048	0,145	-0,000	Negativo	Negativo
140	0,116	0,017	0,123	-0,019	Negativo	Negativo
141	0,546	0,452	0,304	0,138	Negativo	Negativo
142	0,144	0,045	0,115	-0,026	Negativo	1:64
143	0,049	-0,051	0,089	-0,048	Negativo	1:16
144	0,201	0,103	0,182	0,032	Negativo	Negativo
145	0,054	-0,046	0,091	-0,047	Negativo	Negativo
146	0,253	0,156	0,429	0,246	Negativo	.
147	0,09	0,021	0,177	0,043	Negativo	.
148	0,129	0,030	0,139	-0,005	Negativo	Negativo
149	0,229	0,131	0,332	0,162	Negativo	Negativo
150	0,013	-0,088	0,020	-0,108	Negativo	Negativo
151	0,047	-0,053	0,051	-0,082	Negativo	Negativo
152	0,055	-0,045	0,070	0,069	Negativo	Negativo
153	0,016	-0,085	0,032	-0,097	Negativo	Negativo
154	0,065	-0,035	0,153	0,006	Negativo	Negativo
155	0,108	0,008	0,493	0,301	Negativo	Negativo
156	0,026	-0,075	0,079	-0,057	Negativo	Negativo
157	0,072	-0,028	0,113	-0,028	Negativo	Negativo
158	0,038	-0,062	0,058	-0,075	Negativo	Negativo
159	0,079	-0,020	0,092	-0,046	Negativo	Negativo
160	0,183	0,085	0,135	-0,009	Negativo	Negativo
161	0,538	0,443	0,333	0,163	Negativo	Negativo
162	0,021	-0,079	0,042	-0,089	Negativo	1:16
163	0,130	0,031	0,114	-0,027	Negativo	1:64
164	0,073	-0,027	0,168	0,019	Negativo	Negativo
165	0,062	-0,038	0,080	-0,056	Negativo	Negativo
166	0,115	0,013	0,141	-0,004	Negativo	Negativo
167	0,014	-0,084	0,032	-0,097	Negativo	Negativo
168	0,067	-0,033	0,093	-0,045	Negativo	Negativo
169	0,232	0,124	0,261	0,098	1:160	1:64
170	0,064	-0,035	0,096	-0,042	Negativo	Negativo
171	0,117	0,014	0,111	-0,030	Negativo	Negativo

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
172	0,086	-0,015	0,123	-0,019	Negativo	Negativo
173	0,061	-0,039	0,121	-0,021	Negativo	Negativo
174	0,138	0,035	0,189	0,037	Negativo	1:64
175	0,098	-0,004	0,169	0,019	Negativo	1:16
176	0,092	-0,009	0,104	-0,036	Negativo	Negativo
177	0,169	0,006	0,197	0,044	Negativo	Negativo
178	0,369	0,256	0,539	0,335	Negativo	Negativo
179	0,330	0,219	0,451	0,260	Negativo	1:16
180	0,133	0,030	0,228	0,069	Negativo	1:16
181	0,106	0,004	0,145	-0,000	Negativo	Negativo
182	0,109	0,007	0,096	-0,042	Negativo	Negativo
183	0,251	0,143	0,239	0,080	Negativo	Negativo
184	0,074	-0,027	0,073	-0,062	Negativo	Negativo
185	0,116	0,014	0,202	0,048	Negativo	1:64
186	0,102	0,000	0,147	0,000	Negativo	Negativo
187	0,061	-0,039	0,070	-0,065	Negativo	Negativo
188	0,052	-0,048	0,103	-0,036	Negativo	Negativo
189	0,089	-0,012	0,165	0,016	Negativo	Negativo
190	0,056	-0,043	0,077	-0,059	Negativo	Negativo
191	0,095	-0,006	0,071	-0,064	Negativo	Negativo
192	0,213	0,107	0,325	0,153	Negativo	1:64
193	0,059	-0,041	0,076	-0,059	Negativo	Negativo
194	0,029	-0,069	0,047	-0,085	Negativo	Negativo
195	0,049	-0,049	0,103	-0,037	Negativo	Negativo
196	0,153	0,049	0,172	0,022	Negativo	Negativo
197	0,041	-0,058	0,076	-0,059	Negativo	1:256
198	0,077	-0,023	0,106	-0,034	Negativo	1:16
199	0,074	-0,026	0,112	-0,029	Negativo	Negativo
200	0,219	0,112	0,261	0,098	Negativo	1:64
201	0,494	0,375	0,657	0,436	1:80	Negativo
202	0,176	0,071	0,202	0,048	Negativo	1:16
203	0,112	0,105	0,167	0,157	Negativo	Negativo
204	0,086	-0,015	0,232	0,074	1:40	Negativo
205	0,114	0,012	0,089	-0,048	1:40	1:1024
206	0,141	0,029	0,141	-0,012	Negativo	Negativo
207	0,040	-0,067	0,043	-0,090	Negativo	Negativo
208	0,074	-0,034	0,115	-0,033	Negativo	Negativo
209	0,154	0,042	0,194	0,031	Negativo	Negativo
210	0,139	0,028	0,109	-0,038	Negativo	Negativo
211	0,065	-0,043	0,048	-0,087	Negativo	Negativo
212	0,217	0,077	0,166	0,059	Negativo	.
213	0,268	0,117	0,253	0,142	Negativo	.
214	0,125	0,003	0,069	-0,033	Negativo	.
215	0,140	0,028	0,127	-0,023	Negativo	Negativo

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
216	0,098	-0,011	0,135	-0,017	Negativo	Negativo
217	0,143	0,032	0,119	-0,029	Negativo	Negativo
218	0,121	0,010	0,111	-0,036	Negativo	Negativo
219	0,400	0,277	0,397	0,195	Negativo	1:16
220	0,405	0,282	0,405	0,201	Negativo	Negativo
221	0,067	-0,042	0,055	-0,080	Negativo	Negativo
222	0,298	0,179	0,313	0,127	Negativo	1:16
223	0,107	-0,003	0,146	-0,008	Negativo	Negativo
224	0,082	-0,027	0,104	-0,041	Negativo	Negativo
225	0,085	-0,024	0,071	-0,068	Negativo	Negativo
226	0,115	0,004	0,100	-0,045	Negativo	Negativo
227	0,121	0,011	0,137	-0,015	Negativo	Negativo
228	0,069	-0,039	0,071	-0,068	Negativo	Negativo
229	0,122	0,011	0,108	-0,038	Negativo	1:16
230	0,059	-0,050	0,036	-0,097	Negativo	Negativo
231	0,274	0,156	0,247	0,074	Negativo	Negativo
232	0,111	0,000	0,133	-0,018	Negativo	1:64
233	0,641	0,508	0,917	0,614	Negativo	Negativo
234	0,069	-0,039	0,081	-0,060	Negativo	Negativo
235	0,739	0,600	0,731	0,464	Negativo	Negativo
236	0,341	0,221	0,345	0,153	Negativo	1:64
237	0,102	-0,008	0,146	-0,008	Negativo	1:64
238	0,093	-0,016	0,093	-0,051	Negativo	Negativo
239	0,069	-0,039	0,086	-0,056	Negativo	Negativo
240	0,217	0,102	0,296	0,113	Negativo	Negativo
241	0,164	0,052	0,248	0,282	Negativo	Negativo
242	0,192	0,078	0,187	0,026	Negativo	1:256
243	0,159	0,046	0,122	-0,027	Negativo	Negativo
244	0,275	0,158	0,314	0,128	Negativo	1:256
245	0,098	-0,012	0,106	-0,040	Negativo	Negativo
246	0,121	0,010	0,125	-0,024	Negativo	Negativo
247	0,113	0,002	0,146	-0,008	1:40	1:16
248	1,436	1,267	1,429	1,027	1:40	1:64
249	0,204	0,089	0,305	0,120	Negativo	1:64
250	0,988	1,076	1,003	0,808	1:40	1:64
251	0,842	0,904	1,706	1,460	Negativo	Negativo
252	1,585	1,776	1,658	1,416	Negativo	1:1024
253	0,199	0,150	0,350	0,203	Negativo	Negativo
254	0,087	0,018	0,135	0,004	Negativo	Negativo
255	0,614	0,637	0,788	0,610	1:40	1:64
256	0,519	0,525	0,718	0,544	Negativo	1:1024
257	0,069	-0,003	0,076	-0,051	Negativo	Negativo
258	0,226	0,181	0,328	0,182	Negativo	Negativo
259	0,137	0,077	0,161	0,029	Negativo	Negativo

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	ELISA-protA		ELISA-IgG		RIFI-leish	RIFI-toxo
	D.O.	A/P	D.O.	A/P		
260	0,120	0,057	0,128	-0,002	Negativo	Negativo
261	0,130	0,068	0,157	0,025	Negativo	Negativo
262	0,052	-0,023	0,091	-0,037	Negativo	1:16
263	0,094	0,026	0,124	-0,006	Negativo	Negativo
264	0,274	0,237	0,351	0,205	Negativo	Negativo
265	0,068	-0,004	0,126	-0,004	Negativo	Negativo
266	0,071	-0,001	0,099	-0,028	Negativo	Negativo
267	0,095	0,027	0,158	0,026	Negativo	Negativo
268	0,095	0,027	0,180	0,046	Negativo	Negativo
269	0,065	-0,008	0,091	-0,036	Negativo	Negativo
270	0,057	-0,018	0,088	-0,039	Negativo	Negativo
271	0,073	0,000	0,085	-0,042	Negativo	Negativo
272	0,280	0,243	0,363	0,216	Negativo	Negativo
273	0,498	0,499	0,653	0,484	Negativo	Negativo
274	0,698	0,735	0,667	0,497	Negativo	Negativo
275	0,062	-0,012	0,266	0,125	Negativo	Negativo
276	0,029	-0,051	0,043	-0,081	Negativo	Negativo
277	0,076	0,004	0,166	0,033	Negativo	Negativo
278	0,025	-0,055	0,031	-0,092	Negativo	Negativo
279	0,021	-0,059	0,046	-0,078	Negativo	Negativo
280	0,028	-0,052	0,053	-0,072	Negativo	1:64
281	0,173	0,119	0,157	0,024	Negativo	Negativo
282	0,061	-0,013	0,079	-0,047	Negativo	Negativo
283	1,169	1,289	1,224	1,014	1:80	1:64
284	0,138	0,013	0,077	-0,026	Negativo	.
285	0,121	-0,000	0,132	0,026	Negativo	.
286	0,092	-0,024	0,067	-0,036	Negativo	.
287	0,086	-0,028	0,079	-0,024	Negativo	.
288	0,034	-0,070	0,056	-0,046	Negativo	.
289	0,174	0,076	0,182	0,042	Negativo	.
290	0,279	0,127	0,378	0,262	1:40	.
291	0,772	0,522	1,099	0,949	1:40	.
292	0,064	-0,046	0,034	-0,067	Negativo	.
293	0,277	0,125	0,267	0,155	Negativo	.
294	0,093	-0,022	0,076	-0,027	Negativo	.
295	0,455	0,267	0,843	0,705	Negativo	.
296	0,173	0,041	0,109	0,005	Negativo	.
297	0,511	0,312	0,441	0,322	Negativo	.
298	0,132	0,008	0,174	0,067	Negativo	.
299	0,105	-0,013	0,112	0,007	Negativo	.
300	0,173	0,042	0,142	0,036	Negativo	.
301	0,160	0,031	0,022	-0,079	Negativo	.
302	0,087	0,017	0,135	0,004	Negativo	Negativo

Negativo: amostras de soro não reagentes; (.) ausência de soro para o teste.

Apêndice B – Resultados do exame parasitológico direto (linfonodo: Linf., medula óssea: M.O.), ELISA indireto (prot.A, IgG) e reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (RIFI-L) e anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI-T), e pesquisa de anticorpos anti-FIV e antígenos do FeLV (SNAPtest), de gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2010)

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	.
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	.
19	-	-	-	-	-	-	-	.
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	.
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	+	+	-	-	-	+
24	-	-	-	-	-	-	-	.
25	-	-	-	-	-	-	-	.
26	-	-	-	-	-	+	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	+
28	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	.
31	-	-	-	-	-	-	-	.
32	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	+
36	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
39	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	+	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	+
55	-	-	+	+	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	+
59	-	-	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	+	-	-	.
61	-	-	-	-	-	-	-	.
62	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	.
65	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	+
67	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	+	-	.
72	-	-	-	-	-	-	-	.
73	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	.
77	-	-	+	+	-	-	-	.
78	-	-	+	-	-	-	-	.
79	-	-	-	-	-	-	-	.
80	-	-	-	-	-	-	-	.
81	-	-	-	-	-	-	-	.
82	-	-	-	-	-	-	-	.

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
83	-	-	-	-	+	-	-	.
84	-	-	-	-	-	-	-	.
85	-	-	-	-	-	-	-	.
86	-	-	-	-	-	-	-	.
87	-	-	-	-	-	-	-	.
88	-	-	-	-	-	-	-	.
89	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	.
91	-	-	-	-	-	+	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	+
96	-	-	-	-	-	-	-	+
97	+	+	-	-	-	-	-	+
98	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-
101	-	-	+	+	-	+	-	+
102	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	+
104	-	-	-	-	-	-	-	-
105	+	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-	+
113	-	-	-	+	-	-	-	-
114	-	-	-	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-	-	-	-
116	-	-	-	-	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	-
119	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-
121	-	-	-	-	-	-	-	-
122	-	-	-	-	-	-	-	+
123	-	-	-	-	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-	-	-	+
125	-	-	-	-	-	-	-	-
126	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
127	-	-	-	-	-	-	-	+
128	-	-	-	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	-	-	-	+
130	-	-	-	-	-	-	-	-
131	-	-	+	+	-	+	-	-
132	-	-	-	-	-	-	-	-
133	-	-	-	-	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-	-	-	-
135	-	-	-	+	-	+	-	-
136	-	-	-	-	-	-	-	-
137	-	-	-	-	+	-	-	-
138	-	-	-	-	-	-	-	.
139	-	-	-	-	-	-	-	-
140	-	-	-	-	-	-	-	-
141	-	-	+	-	-	+	-	-
142	-	-	-	-	-	-	-	+
143	-	-	-	-	-	-	-	+
144	-	-	-	-	-	-	-	-
145	-	-	-	-	-	-	-	-
146	-	-	+	+	-	-	-	.
147	-	-	-	-	-	-	-	.
148	-	-	-	-	-	-	+	-
149	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-
151	-	-	-	-	-	-	-	-
152	-	-	-	-	-	-	-	-
153	+	-	-	-	-	-	-	-
154	-	-	-	-	-	-	-	-
155	-	-	-	+	-	-	-	-
156	-	-	-	-	-	-	-	-
157	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	-	-	-
159	-	-	-	-	-	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-	-	-
161	-	-	+	-	-	-	-	-
162	-	-	-	-	-	-	-	+
163	-	-	-	-	-	-	-	+
164	+	-	-	-	-	-	-	-
165	-	-	-	-	-	-	-	-
166	-	-	-	-	-	-	-	-
167	-	-	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-	-	-
169	-	-	-	-	+	-	-	+
170	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
171	-	-	-	-	-	-	-	-
172	-	-	-	-	-	-	-	-
173	-	-	-	-	-	-	-	-
174	-	-	-	-	-	-	-	+
175	-	-	-	-	-	+	-	+
176	-	-	-	-	-	-	-	-
177	-	-	-	-	-	-	-	-
178	-	-	+	+	-	+	-	-
179	-	-	+	+	-	+	-	+
180	-	-	-	-	-	-	-	+
181	-	-	-	-	-	-	-	-
182	-	-	-	-	-	-	-	-
183	-	-	-	-	-	-	-	-
184	-	-	-	-	-	-	-	-
185	-	-	-	-	-	-	-	+
186	-	-	-	-	-	-	-	-
187	-	-	-	-	-	-	-	-
188	-	-	-	-	-	-	-	-
189	-	-	-	-	-	-	-	-
190	-	-	-	-	-	-	-	-
191	-	-	-	-	-	-	-	-
192	-	-	-	-	-	-	-	+
193	-	-	-	-	-	-	-	-
194	-	-	-	-	-	-	-	-
195	+	+	-	-	-	-	-	-
196	-	-	-	-	-	-	-	-
197	-	-	-	-	-	-	-	+
198	-	-	-	-	-	-	-	+
199	+	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	+
201	+	+	+	+	+	-	-	-
202	+	+	-	-	-	-	-	+
203	+	+	-	-	-	-	-	-
204	+	+	-	-	+	-	-	-
205	+	+	-	-	+	-	-	+
206	+	+	-	-	-	-	-	-
207	-	-	-	-	-	-	-	-
208	-	-	-	-	-	-	-	-
209	+	+	-	-	-	-	-	-
210	+	+	-	-	-	-	-	-
211	+	-	-	-	-	-	-	-
212	-	-	-	-	-	-	-	.
213	-	-	-	-	-	-	-	.
214	-	-	-	-	-	-	-	.

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
215	+	+	-	-	-	-	-	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-
217	-	-	-	-	-	-	-	-
218	-	-	-	-	-	-	-	-
219	-	-	+	-	-	-	-	+
220	-	-	+	+	-	+	-	-
221	-	-	-	-	-	-	-	-
222	+	+	+	-	-	-	-	+
223	-	-	-	-	-	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-
225	-	-	-	-	-	-	-	-
226	-	-	-	-	-	-	-	-
227	-	-	-	-	-	-	-	-
228	+	+	-	-	-	-	-	-
229	-	+	-	-	-	-	-	+
230	+	+	-	-	-	-	-	-
231	-	-	+	-	-	-	-	-
232	-	-	-	-	-	-	-	+
233	+	-	+	+	-	+	-	-
234	+	-	-	-	-	-	-	-
235	-	-	+	+	-	-	-	-
236	-	-	+	-	-	+	-	+
237	-	-	-	-	-	-	-	+
238	-	-	-	-	-	-	-	-
239	-	-	-	-	-	-	-	-
240	-	-	-	-	-	-	-	-
241	-	-	-	-	-	-	-	-
242	-	-	-	-	-	-	-	+
243	-	-	-	-	-	-	-	-
244	-	-	+	-	-	-	-	+
245	-	-	-	-	-	-	-	-
246	-	-	-	-	-	-	-	-
247	-	-	-	-	+	-	-	+
248	-	-	+	+	+	+	-	+
249	-	-	-	-	-	-	-	+
250	-	-	+	+	+	-	-	+
251	-	-	+	+	-	-	-	-
252	-	-	+	+	-	-	-	+
253	-	+	+	+	-	-	-	-
254	-	-	-	-	-	-	-	-
255	-	-	+	+	+	-	-	+
256	-	-	+	+	-	-	-	+
257	-	-	-	-	-	-	-	-
258	-	-	+	+	-	-	-	-

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

continua...

continuação...

ANIMAL	Parasitológico		ELISA indireto		RIFI-L	SNAPtest		RIFI-T
	Linf.	M.O.	prot.A	IgG		FIV	FeLV	
259	-	-	-	-	-	-	-	-
260	-	-	-	-	-	-	-	-
261	-	-	-	-	-	-	-	-
262	-	-	-	-	-	-	-	+
263	-	-	-	-	-	-	-	-
264	-	-	+	+	-	-	-	-
265	-	-	-	-	-	-	-	-
266	-	-	-	-	-	-	-	-
267	-	-	-	-	-	-	-	-
268	-	-	-	-	-	-	-	-
269	-	-	-	-	-	-	-	-
270	-	-	-	-	-	-	-	-
271	-	-	-	-	-	-	-	-
272	-	-	+	+	-	-	-	-
273	-	-	+	+	-	+	-	-
274	-	-	+	+	-	-	-	-
275	-	-	-	-	-	-	-	-
276	-	-	-	-	-	-	-	-
277	-	-	-	-	-	-	-	-
278	-	-	-	-	-	-	-	-
279	-	-	-	-	-	-	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	+
281	-	-	-	-	-	-	-	-
282	-	-	-	-	-	-	-	-
283	+	-	+	+	+	+	-	+
284	-	+	-	-	-	-	-	.
285	-	-	-	-	-	-	-	.
286	-	-	-	-	-	-	-	.
287	-	-	-	-	-	-	-	.
288	-	+	-	-	-	-	-	.
289	-	-	-	-	-	-	-	.
290	-	-	-	+	+	-	-	.
291	-	-	+	+	+	-	-	.
292	-	-	-	-	-	-	-	.
293	-	-	-	-	-	-	-	.
294	-	-	-	-	-	-	-	.
295	-	-	+	+	-	-	-	.
296	-	+	-	-	-	-	-	.
297	-	+	+	+	-	-	-	.
298	-	-	-	-	-	-	-	.
299	-	-	-	-	-	-	-	.
300	+	-	-	-	-	-	-	.
301	-	-	-	-	-	-	-	.
302	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) animal negativo; (+) animal positivo; (.) ausência de soro para o teste.

Apêndice C – Descrição dos achados de exame físico geral de 302 gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2010)

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
1	Assintomático
2	Assintomático
3	Assintomático
4	Assintomático
5	Assintomático
6	Assintomático
7	Assintomático
8	Assintomático
9	Assintomático
10	Assintomático
11	Alopecia em cauda, crostas melicéricas na face externa dos pavilhões auriculares e na face.
12	Assintomático
13	Seborréia oleosa
14	Assintomático
15	Assintomático
16	Assintomático
17	Assintomático
18	Assintomático
19	Assintomático
20	Assintomático
21	Assintomático
22	Assintomático, gestante
23	Assintomático
24	Assintomático
25	Assintomático
26	Fratura de fêmur direito
27	Cerume enegrecido excessivo em orelhas
28	Assintomático
29	Assintomático
30	Lesões crostosas nas regiões perioculares e temporais
31	Assintomático
32	Lesões crostosas nas regiões temporais
33	Assintomático
34	Assintomático
35	Assintomático
36	Crostas melicéricas nas pontas das orelhas, contaminação secundária em região média do membros torácico esquerdo (secreção purulenta)
37	Assintomático
38	Alopecia generalizada, crostas melicéricas na face
39	Assintomático
40	Magro
41	Assintomático

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
42	Assintomático
43	Assintomático
44	Assintomático
45	Assintomático
46	Assintomático
47	Assintomático
48	Assintomático
49	Assintomático
50	Assintomático
51	Assintomático
52	Assintomático
53	Magro, prostração e secreção ocular serosa bilateral
54	Assintomático
55	Magro
56	Magro
57	Assintomático
58	Lesões crostas melicéricas em região de flanco esquerdo
59	Alopecia generalizada e lesões crostosas em região de jarrete direito
60	Assintomático
61	Assintomático
62	Assintomático
63	Assintomático
64	Assintomático
65	Assintomático
66	Assintomático
67	Assintomático
68	Assintomático
69	Assintomático
70	Assintomático
71	Alopecia, piodermite generalizada, eritema e colarete epidérmico
72	Assintomático
73	Assintomático
74	Assintomático
75	Assintomático
76	Assintomático
77	Assintomático
78	Assintomático
79	Assintomático
80	Caquexia
81	Assintomático
82	Caquexia e estupor
83	Assintomático
84	Assintomático
85	Assintomático
86	Lesões crostosas na cabeça

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
87	Assintomático
88	Assintomático, gestante
89	Assintomático
90	Assintomático
91	Assintomático
92	Assintomático
93	Assintomático
94	Lesões crostosas na face externa dos pavilhões auriculares
95	Assintomático
96	Lesões crostosas em cabeça e região cervical dorsal
97	Lesões crostosas em região cervical dorsal
98	Assintomático
99	Lesões crostosas em região da maxila direita
100	Assintomático
101	Assintomático
102	Assintomático
103	Magro
104	Assintomático
105	Assintomático
106	Assintomático
107	Assintomático
108	Assintomático
109	Assintomático
110	Assintomático
111	Assintomático
112	Assintomático
113	Assintomático e lactante
114	Magro
115	Magro
116	Assintomático
117	Assintomático
118	Assintomático
119	Assintomático
120	Assintomático
121	Assintomático
122	Assintomático
123	Assintomático
124	Assintomático
125	Assintomático
126	Assintomático
127	Assintomático
128	Assintomático
129	Assintomático
130	Assintomático
131	Alopecia e lesões crostosas em região da cabeça e cervical ventral

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
132	Assintomático
133	Assintomático e lactante
134	Assintomático
135	Assintomático
136	Assintomático
137	Assintomático
138	Assintomático
139	Assintomático
140	Assintomático
141	Assintomático
142	Assintomático
143	Assintomático e lactante
144	Efusão torácica
145	Assintomático
146	Assintomático
147	Linfoadenomegalia em submandibulares, pré-escapulares e poplíteos
148	Perda do tônus dos membros pélvicos e cauda, hepatoesplenomegalia
149	Lesões crostosas em região cervical dorsal, cauda e membros pélvicos, linfoadenomegalia em submandibulares e poplíteos
150	Caquexia, prostração, icterícia, hepatoesplenomegalia e efusão torácica
151	Assintomático
152	Efusão peritoneal de coloração amarelada
153	Assintomático
154	Assintomático
155	Assintomático
156	Assintomático
157	Assintomático
158	Lesões crostosas em região externa dos pavilhões auriculares e na face
159	Assintomático
160	Assintomático
161	Lesões crostosas em região cervical dorsal, cabeça, linfoadenomegalia em submandibulares e poplíteos, hepatoesplenomegalia
162	Assintomático
163	Assintomático
164	Assintomático
165	Assintomático
166	Assintomático
167	Lesões crostosas na face externa dos pavilhões auriculares e na região cervical dorsal, linfoadenomegalia em submandibulares e poplíteos, magro
168	Assintomático
169	Lesões crostosas em face e membros torácicos, hepatoesplenomegalia e magro
170	Assintomático
171	Lesões crostas melicéricas nas pontas das orelhas, linfoadenomegalia em submandibulares e poplíteos

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
172	Assintomático
173	Assintomático e gestante
174	Assintomático
175	Assintomático
176	Assintomático
177	Assintomático
178	Lesões crostosas e úlceras nos quatro membros e na face, icterícia e hepatoesplenomegalia
179	Assintomático
180	Assintomático
181	Assintomático
182	Assintomático
183	Assintomático
184	Assintomático
185	Assintomático
186	Assintomático
187	Assintomático
188	Assintomático
189	Assintomático
190	Assintomático
191	Assintomático
192	Assintomático
193	Assintomático
194	Assintomático
195	Assintomático
196	Assintomático
197	Assintomático
198	Assintomático
199	Assintomático
200	Assintomático
201	Paraparesia (atropelamento)
202	Emaciação, estupor, infestação moderada por carrapatos, mucosas pálidas, cálculo dentário e lesão ulcerativa em região de tarso direito
203	Magro, secreção ocular translúcida e fluida bilateral e opacidade de córnea bilateral do tipo nébula
204	Lesão granulomatosa/tumoral em globo ocular direito e magro
205	Emaciação, exposição das falanges distais dos membros pélvicos (gangrena seca)
206	Magro
207	Magro e desidratação (6% a 8%)
208	Lesão crostosa em região cervical dorsal, linfadenomegalia em submandibulares e magro
209	Assintomático
210	Linfadenomegalia em submandibulares
211	Assintomático

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
212	Lesão crostosa em extremidade dos membros torácicos, desidratação (8%), linfadenomegalia em poplíteos e magro
213	Lesão crostosa em plano nasal, lesão ulcerativa com secreção purulenta próxima a jugular direita, mucosas pálidas, linfadenomegalia de poplíteo direito e magro
214	Hiperqueratose/hiperemia em face, desidratação (8%), linfadenomegalia de submandibulares e poplíteos, magro
215	Linfadenomegalia de poplíteos
216	Assintomático
217	Linfadenomegalia de poplíteos
218	Assintomático, cálculo dentário
219	Lesão ulcerativa na face externa dos pavilhões auriculares (bordos hemorrágicos/crostas hemorrágicas), comedos em região mentoniana e apatia
220	Hiperqueratose, lignificação, hiperpigmentação em toda região cervical, secreção ocular purulenta bilateral, desidratação (8% a 10%), apatia
221	Lesão ulcerativa arredondada em região de cadeia mamária direita, nódulos de aspecto cístico (subcutâneo) em cadeia mamária esquerda, magro
222	Perda de grande parte do plano nasal (úlceras profundas) com bordos hemorrágicos/crostosos/fragilidade tecidual/hiperemia, perda dos dentes incisivos superiores, desidratação (8%) – carcinoma de células escamosas bem diferenciado, pulcrose e magro
223	Alopecia em região de gradio costal esquerdo e de mandíbula ventral, comedos em região mentoniana, halitose, linfadenomegalia de submandibulares e poplíteos
224	Assintomático
225	Assintomático
226	Linfadenomegalia de poplíteos
227	Assintomático
228	Assintomático
229	Lesão crostosa com contaminação secundária/aglutinação de pelos/hiperemia em região cervical dorsal e occipital
230	Descamação furfurácea em face e pavilhões auriculares externos, linfadenomegalia de poplíteos
231	Assintomático
232	Linfadenomegalia de poplíteos
233	Estomatite em região ventral da língua, linfadenomegalia de poplíteos e magro, alopecia, hiperqueratose e lignificação no bordo das orelhas
234	Alopecia em região cervical dorsal com crostas melicéricas
235	Linfadenomegalia de poplíteos
236	Dermatite úmida aguda em mamas inguinais, ulceração na língua, linfadenomegalia em submandibulares e poplíteos
237	Secreção nasal purulenta unilateral direita, linfadenomegalia em poplíteo direito

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
238	Dermatite úmida aguda em face caudal da coxa direita, linfadenomegalia em poplíteo direito e gestante
239	Assintomático
240	Mucosas páldas, desidratação (6%), magro, membro torácico direito amputado
241	Assintomático
242	Mucosas páldas, secreção nasal serosa bilateral, espirro/tosse e linfadenomegalia em poplíteos
243	Estomatite em região ventral da língua, secreção nasal mucopurulenta bilateral, espirro/tosse, puliciose, linfadenomegalia de subandibulares e poplíteos
244	Linfadenomegalia de subandibulares e ausência do globo ocular esquerdo
245	Linfadenomegalia de subandibulares e poplíteos, puliciose
246	Linfadenomegalia de subandibulares
247	Assintomático
248	Linfadenomegalia de subandibulares e cálculo dentário
249	Assintomático
250	Linfadenomegalia de poplíteos
251	Linfadenomegalia de poplíteos e puliciose
252	Linfadenomegalia de submandibulares, tonsilas hipertrofiadas e presença de rânula
253	Assintomático
254	Assintomático
255	Linfadenomegalia em submandibulares e poplíteos
256	Magro
257	Assintomático
258	Abcesso em região de flanco direito, secreção nasal fluida bilateral, secreção ocular viscosa unilateral esquerda, magro
259	Assintomático
260	Assintomático
261	Crostras melicéricas em face, secreção ocular hemorrágica unilateral esquerda, secreção nasal mucopurulenta bilateral, comedos, desidratação (6%), linfadenomegalia de submandibulares e poplíteo direito e magro
262	Lesão crostosa em face e região externa dos pavilhões auriculares, secreção nasal mucóide bilateral, desidratação (6%), puliciose, criptorquida direito e magro
263	Magro
264	Alopecia de face, descamação furfurácea e puliciose
265	Assintomático
266	Alopecia na face externa do pavilhão auricular direito, linfadenomegalia em poplíteo direito
267	Assintomático
268	Assintomático
269	Assintomático

continua...

continuação...

ANIMAL	EXAME FÍSICO GERAL
270	Assintomático
271	Secreção ocular mucóide bilateral, desidratação (6%), pulciose e magro
272	Rarefação pilosa em extremidade dos membros torácicos e pélvicos, linfadenomegalia de poplíteos, desidratação (6% a 8%), pulciose e magro
273	Assintomático
274	Secreção ocular e nasal purulentas bilaterais, tonsilas hipertrofiadas, linfadenomegalia em submandibulares, pulciose e magro
275	Linfadenomegalia em submandibulares e magro
276	Assintomático
277	Assintomático
278	Assintomático
279	Assintomático
280	Alopecia com crostas hemorrágicas na base da cauda
281	Assintomático
282	Assintomático
283	Desidratação (6%), ulceração profunda em face externa dos pavilhões auriculares (crostas hemorrágicas), pulciose e magro
284	Assintomático
285	Assintomático
286	Linfadenomegalia de submandibulares e poplíteos, secreção nasal serosa unilateral esquerda e pulciose
287	Desidratação (10%), caquexia, diarreia, estupor e secreção nasal bilateral
288	Assintomático
289	Desidratação (6%), alopecia, diarreia com odor muito fétido e eritema anal
290	Lesão em pontas de orelhas com crostas hemorrágicas e sangramento ativo, desidratação (6%) e apatia
291	Assintomático
292	Lesões crostosas e alopecia em cauda
293	Pulciose e magro
294	Assintomático
295	Rarefação pilosa em região torácica dorsal
296	Lesões crostosas em face
297	Comedos na região mentoniana
298	Magro
299	Desidratação (8%), estomatite, estupor, miíase perianal e em prepúcio
300	Assintomático
301	Diarreia e desidratação (8%)
302	Linfadenomegalia de poplíteos