

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**OCORRÊNCIA DE *Leishmania sp.* EM GATOS DO MUNICÍPIO
DE ARAÇATUBA – SÃO PAULO – BRASIL.**

Claudio Nazaretian Rossi

Médico Veterinário

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Leishmania sp.* EM GATOS DO MUNICÍPIO
DE ARAÇATUBA – SÃO PAULO – BRASIL.**

Claudio Nazaretian Rossi

Orientadora: Profa. Dra. Mary Marcondes

Co- orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2007

R831o Rossi, Claudio Nazaretian
Ocorrência de *Leishmania sp.* em gatos do município de
Araçatuba – São Paulo – Brasil / Claudio Nazaretian Rossi. –
Jaboticabal, 2007
xvi, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007

Orientadora: Mary Marcondes

Co-orientador: Aparecido Antonio Camacho

Banca examinadora: Mary Marcondes, Mirela Tinucci Costa,
Márcia Dalastra Laurenti

Bibliografia

1. ELISA. 2. Gato. 3. Leishmaniose visceral. 4. Reação de
Imunfluorescência Indireta. 5. Zoonose. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993.161:636.8

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLAUDIO NAZARETIAN ROSSI – solteiro, nascido na cidade de São Paulo – SP, em 04 de setembro de 1977, médico veterinário formado pela Universidade Estadual de Londrina – UEL, em Londrina, Paraná, no ano de 2001. Fez residência médico-veterinária nas Áreas de Clínica, Cirurgia e Anestesiologia de Pequenos Animais na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – campus de Araçatuba, no período de fevereiro de 2003 a fevereiro de 2005. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal – SP, em março de 2005, sob orientação da Profa. Ass. Dra. Mary Marcondes. Árbitro de cães de todas as raças pela Confederação Brasileira de Cinofilia – CBKC – e Federação Cinológica Internacional – FCI.

Ode ao gato

Os animais foram imperfeitos,
compridos de rabo,
tristes de cabeça.
Pouco a pouco se foram compondo,
fazendo-se paisagem,
adquirindo pintas, graça, vôo.
O gato,
só o gato apareceu completo
e orgulhoso:
nasceu completamente terminado,
anda sozinho e sabe o que quer.

O homem quer ser peixe e pássaro,
a serpente quisera ter asas,
o cachorro é um leão desorientado,
o engenheiro quer ser poeta,
a mosca estuda para andorinha,
o poeta trata de imitar a mosca,
mas o gato quer ser só gato
e todo gato é gato do bigode ao rabo, (...)

Não há unidade como ele,
não tem a lua
nem a flor tal contextura:
é uma coisa só
como o sol ou o topázio,
e a elástica linha
em seu contorno firme e sutil
é como a linha da proa de uma nave.
Os seus olhos amarelos
deixaram uma só ranhura
para jogar as moedas da noite (...)

Minha razão resvalou na sua indiferença,
os seus olhos têm números de ouro.

Pablo Neruda.

DEDICO

Aos meus pais, Roberto e Lucia,

Pelo amor, educação e incentivo, que me permitiram chegar até aqui. O empenho e exemplo de vida de vocês foram de fundamental importância para eu concluir mais esta etapa. Meu muito obrigado.

Amo vocês!

Aos meus irmãos Frederico, Danilo e Eduardo,

Pelo carinho, apoio e estímulo demonstrados. Ser irmão de vocês é uma dádiva para mim e que, somando-se à nossa amizade, torna-se de imensurável importância. Agradeço a todos vocês.

Com amor!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Mary Marcondes,

Minha querida orientadora, inicialmente por me aceitar como orientado e, além disso, por acompanhar cada etapa deste trabalho, pela dedicação, incentivo, valiosos ensinamentos e, principalmente, pelas demonstrações de carinho e amizade em todos os momentos. Saio com a consciência tranqüila de que, se não consegui, pelo menos tentei assimilar o máximo que pude dos seus conhecimentos técnicos e, o que me é mais importante e valioso, com a certeza de que aprendi muito com o seu exemplo de ser e agir. Sinceramente, a você, minha eterna gratidão e admiração.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por estar sempre me protegendo e guiando meus passos.

Aos meus pais, Roberto e Lucia, pelo carinho, incentivo e compreensão.

À minha orientadora, novamente e outras tantas vezes e que, tenho certeza, não serão suficientes para agradecê-la por tudo.

Aos meus irmãos Frederico, Danilo e Eduardo que, mesmo de longe, demonstraram seu companheirismo e sempre me apoiaram.

À Pós-graduação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV / UNESP, campus de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOA / UNESP, campus de Araçatuba, por permitir a realização de toda a fase experimental do projeto em sua estrutura física.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho, bem como pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV / UNESP, campus de Jaboticabal, pela co-orientação.

À Profa. Adjunto Caris Maroni Nunes, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da FOA / UNESP, campus de Araçatuba, por disponibilizar o uso irrestrito do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular na execução de parte experimental do projeto.

À Profa. Ass. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da FOA / UNESP, campus de Araçatuba, pela orientação na realização da técnica de ELISA para o diagnóstico de leishmaniose felina e por ter cedido as dependências do Laboratório de Imunologia para a realização deste método.

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, por ter cedido o Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) para apoio diagnóstico.

À Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, por ter cedido o Laboratório “Morcego” para apoio diagnóstico.

À pesquisadora Dra. Elisa San Martin Mouriz Savani, do CCZ da Cidade de São Paulo, pela orientação e execução da reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de leishmaniose felina e por ter cedido o Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmissíveis por Vetores para a realização deste método.

À Profa. Ass. Dra. Sílvia Helena Venturoli Perri, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da FOA / UNESP, campus de Araçatuba, pela paciência e dedicação na realização da análise estatística.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e à Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV / UNESP, campus de Jaboticabal, pelas sugestões na Prova de Qualificação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

À Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV / UNESP, campus de Jaboticabal e à Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, pelas sugestões na Defesa de Dissertação de Mestrado, que foram de extrema importância melhorar a apresentação final deste projeto.

Aos funcionários da biblioteca do Curso de Medicina Veterinária FOA / UNESP, campus de Araçatuba, em especial à bibliotecária Izabel Pereira Matos, pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas.

Aos pós-graduandos Maurício Franco Zanette e Fabiana Augusta Ikeda Garcia, pela cumplicidade, troca de conhecimentos e pelo apoio recebido nestes anos de convivência.

Aos graduandos e bolsistas de iniciação científica Ludmila Silva Vicente Sobrinho, Fernando Azadinho Rosa, Juliana Peloi Vides, Daniel Leite da Silva, Denis Carvalho Costa e Cristiana de Melo Trincone, do Curso de Medicina Veterinária da FOA / UNESP, campus de Araçatuba, pela contribuição e eficiência no auxílio da colheita e processamento de materiais, bem como pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos funcionários Almir Aparecido Spinosa Lemos, do Laboratório de Imunologia e às funcionárias Érica Ribeiro e Valquíria Gasola, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FOA / UNESP, campus de Araçatuba.

À funcionária Thayse Yumie, do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) e ao funcionário Ricardo Andrade Zampieri, do Laboratório “Morcego” da USP, pelo auxílio técnico.

Às médicas veterinárias residentes Celina Kazue Morinishi e Renata Formaggio, pelo apoio técnico.

Aos amigos de república em Araçatuba, Alexandre Redson (“Cabeça”), Ana Amélia (“Morceguinha”), Rômulo (“Cheira Pó”) e Thiago (“Pérola”), pelo ambiente tranqüilo e familiar nesses anos de agradável convivência.

Aos companheiros de república em Jaboticabal, Aline (“Mi rasga”), Diogo (“Fugido”), Regina (“Estrelinha”), Rodrigo (“Priscila”) e Taiana (“Tau”), pela acolhida e pelos bons momentos passados juntos.

Aos amigos Danilo (“Puff”) e Paula (“Paulete”), pelas demonstrações de sincera amizade e por toda a ajuda como meus “secretários” em Jaboticabal.

Novamente ao meu amigo “Puff”, também pelos serviços de motorista, “office-boy”, hospedagem, apoio, pela dedicação à nossa amizade e por todo o suporte prestado.

Aos meus animais de estimação, que muito contribuíram na escolha desta tão gratificante e bonita profissão.

Aos parentes, amigos, residentes, mestrandos e docentes que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir este projeto.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais utilizados.....	17
4.2 Colheita de sangue total.....	17
4.3 Colheita de material para a pesquisa direta de <i>Leishmania sp.</i>	17
4.4 ELISA para a pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i>	18
4.4.1 Produção de antígeno.....	18
4.4.2 Ensaio para a detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> nos soros.....	19
4.5 RIFI para a pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i>	20
4.6 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> pelo exame parasitológico direto.....	24
5.2 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> pelos métodos de ELISA e RIFI.....	25
5.2.1 ELISA.....	25
5.2.2 RIFI.....	26
5.3 Determinação dos valores de sensibilidade e especificidade relativas dos métodos empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral felina.....	26
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES.....	32

APÊNDICES

- Apêndice A - Densidades ópticas médias da padronização das diluições de soro e proteína A peroxidase (PTN A), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* na espécie felina, realizada com amostras positiva e negativa. (Araçatuba-SP, 2007).
- Apêndice B - Valores das diferenças das médias dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e proteína A peroxidase (PTN A), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* na espécie felina. (Araçatuba-SP, 2007).
- Apêndice C - Densidades ópticas médias (DO), pela técnica de ELISA, dos soros controle negativos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, de gatos provenientes do município de Santos-SP. (Araçatuba-SP, 2007).
- Apêndice D - Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em preparados citológicos obtidos por punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, medula óssea (MO), baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).
- Apêndice E - Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, no soro de 200 gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses no município de Araçatuba-S xii (Araçatuba-SP, 2007).
- Apêndice F - Títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, obtidos por meio de

reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, no soro de 200 gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).

Apêndice G - Resultados individuais da pesquisa de leishmaniose em 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, obtidos pelos métodos parasitológicos direto, ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). (Araçatuba-SP, 2007).

	Página
Tabela 1 - Valores do coeficiente Kappa e sua respectiva concordância, de acordo com Pereira (2002).....	23
Tabela 2 - Valores absolutos e percentuais encontrados para a presença de formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> por meio de punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, baço, fígado e medula óssea de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).....	24
Tabela 3 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), em número absoluto e percentagem, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).....	25
Tabela 4 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).....	26
Tabela 5 - Resultados positivos e negativos para o diagnóstico de leishmaniose visceral, obtidos por meio das técnicas de ELISA e do exame parasitológico, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).....	27
Tabela 6 - Resultados positivos e negativos para o diagnóstico de leishmaniose visceral, obtidos por meio das técnicas de RIFI e do exame parasitológico, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).....	27
Tabela 7 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas para as	

técnicas de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), empregadas no diagnóstico de leishmaniose em 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007).....

28

ARAÇATUBA – SÃO PAULO – BRASIL.

RESUMO - Apesar de alguns relatos da ocorrência de leishmaniose visceral em felinos, a literatura é escassa no que diz respeito à sua pesquisa em populações de gatos de áreas endêmicas para a doença. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo pesquisar em uma área endêmica para leishmaniose visceral canina, a possibilidade de infecção em gatos, por meio de exame parasitológico direto e da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelas técnicas de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para tanto, foram colhidas amostras de soro de 200 gatos, encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba – São Paulo – BRASIL, bem como realizadas punções biópsias aspirativas de linfonodo, medula óssea, baço e fígado, utilizados para a confecção de preparados citológicos para a pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania sp.* A prevalência da doença nessa população de gatos foi de 6,5%. Dos 200 animais avaliados, oito (4,0%) apresentaram resultado parasitológico positivo, seis (3,0%) apresentaram títulos sorológicos acima do ponto de corte (0,332) pela técnica de ELISA e um (0,5%) evidenciou título superior ao ponto de corte (1:40) pela RIFI, totalizando 13 gatos considerados positivos

Palavras-Chave: ELISA, gato, leishmaniose visceral, reação de imunofluorescência indireta, zoonose

**OCCURRENCE OF *Leishmania sp.* IN CATS OF THE MUNICIPAL DISTRICT OF
ARAÇATUBA – SÃO PAULO – BRAZIL.**

SUMMARY - In spite of some reports of the occurrence of feline visceral leishmaniasis, the literature is scarce about its research on populations of cats in endemic areas for the disease. The present work aimed to study, in an endemic area for canine visceral leishmaniasis, the infection possibility in cats using the direct parasitological test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescent antibody test (IFAT). For this purpose, a total of 200 cats directed to the Zoonosis Control Center of the municipal district of Araçatuba – São Paulo – Brazil were employed. Lymph node, bone marrow, spleen and liver aspiration biopsies were carried out and observed under optical microscope to search for amastigote forms of the parasite and serum samples were submitted to serological methods in order to detect anti-*Leishmania chagasi* circulating antibodies. The prevalence of the disease in this population of cats was 6.5%. Amastigote forms of the parasite were observed in eight (4.0%) cats; by ELISA method, six (3.0%) cats presented titer above the specie's cut off point (0,332) and one cat (0,5%) showed a titer above 1:40, a positive serological reaction, by IFAT, totalizing 13 positive cats.

Keywords: ELISA, cat, visceral leishmaniasis, indirect immunofluorescent antibody test, zoonosis

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose causada por um protozoário do gênero *Leishmania* e que se divide em dois grandes grupos, de acordo com a sua forma de apresentação, podendo ser cutânea ou visceral. No Brasil, ambas ocorrem, sendo que, no noroeste do estado de São Paulo, mais especificamente na cidade de Araçatuba, local de colheita das amostras para o presente projeto de pesquisa, até o momento, só se identificou a forma visceral da doença, cujo agente etiológico envolvido é a *Leishmania chagasi*.

Devido à grande susceptibilidade do homem e de alguns animais domésticos, particularmente o cão e o gato, torna-se de grande importância o estabelecimento do seu ciclo doméstico. Em alguns países, é a forma clínica mais frequentemente associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em humanos. O principal responsável pela sua transmissão entre hospedeiros vertebrados, no Brasil, é o flebotomíneo hematófago da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Embora seja descrita como uma doença rural, típica de ambientes silvestres, atualmente sabe-se que ela pode ser também contraída em zonas suburbanas e urbanas, tendo sido notificados casos humanos e caninos em 19 estados brasileiros.

A leishmaniose visceral canina causa, na maioria das vezes, um quadro sistêmico crônico, que apresenta manifestações clínicas inespecíficas e similares às dos humanos. A doença é mais prevalente na população canina que na humana, pela constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos e pelo fato dos cães apresentarem uma maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, o que favorece a infecção dos vetores. Uma das estratégias para o controle da leishmaniose, no país, indicada pela Fundação Nacional de Saúde, consiste na eliminação do cão doméstico positivo, assintomático ou não, por ser considerado o seu principal reservatório. Apesar da ocorrência de infecções esporádicas, os felinos não são considerados, até o momento, um reservatório importante da doença.

Existem basicamente três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose: os métodos parasitológicos, os métodos sorológicos e os métodos moleculares.

O método parasitológico direto, por meio da observação de formas amastigotas do parasito em preparados citológicos, é considerado por alguns autores como o teste ouro para o diagnóstico da doença, sendo que a sua sensibilidade pode ser baixa e é dependente do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina.

Outro meio de diagnóstico é a realização de provas sorológicas como a Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o ELISA-teste, que geralmente apresentam alta sensibilidade e especificidade, sendo os métodos diagnósticos preconizados pelo Ministério da Saúde. Além das provas sorológicas de rotina existem os testes comerciais de imunocromatografia, que são atrativos devido à simplicidade de uso e à rápida resposta, apesar dos relatos de que podem levar a uma grande proporção de diagnósticos falso-positivos.

O método do PCR (reação em cadeia da polimerase), por meio do qual é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do parasito, constituindo-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral por apresentar sensibilidade e especificidade muito elevadas, sendo as suas principais desvantagens o alto custo e a necessidade de laboratórios bem equipados. Em menor escala, também são utilizados no diagnóstico da doença os testes de aglutinação direta, hemaglutinação indireta, imunoprecipitação em gel e eletroforese e “imunobloting”.

A importância da leishmaniose visceral como zoonose, associada à sua crescente disseminação pelo país, exige que os veterinários e demais profissionais da área da saúde se mantenham atentos acerca da sua ocorrência. A gravidade da doença, por si só, já justifica a necessidade de tornar o problema público como a única forma de impedir sua disseminação. Para conter essa expansão é necessário um trabalho responsável e contínuo, baseado em inquéritos epidemiológicos freqüentes das populações caninas de áreas endêmicas e na pesquisa da possibilidade de outras espécies estarem envolvidas no ciclo biológico da doença. Apesar dos relatos da ocorrência de leishmaniose visceral em felinos, a literatura é muito escassa no que diz

respeito à pesquisa de *Leishmania chagasi* em animais de áreas endêmicas, sendo possível que infecções em gatos sejam relativamente comuns em algumas dessas regiões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanias fazem parte de dois grandes grupos, quais sejam, o que causa a leishmaniose tegumentar (leishmaniose cutânea, muco-cutânea, cutânea difusa e disseminada) e o que causa a leishmaniose visceral. A leishmaniose visceral é uma antroponose conhecida há muito tempo, tendo sido confundida com outras endemias por um longo período, em virtude da sua semelhança com determinadas enfermidades tropicais de caráter febril e da ausência de lesões patognômicas (REY, 2001).

O primeiro caso da doença em seres humanos foi descrito na Grécia, em 1835. Em 1903, Leishman reconheceu a semelhança do parasito com as formas redondas que se apresentavam nas infecções por *Trypanosoma sp.* e, neste mesmo ano, Donovan descreveu estes mesmos parasitos na enfermidade denominada Dumdum ou Calazar (PESSÔA; MARTINS, 1988). O relato da doença no Brasil é datado de 1913, quando da necropsia de um homem proveniente do município de Boa Esperança no Mato Grosso do Sul (CASTRO, 1996).

A leishmaniose é causada por um protozoário da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*. A espécie envolvida com a infecção na leishmaniose visceral depende da região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África, e a *Leishmania chagasi* nas Américas (SÃO PAULO, 2003).

A classificação da espécie oferece algumas dificuldades, pois os parasitos são morfológicamente muito semelhantes entre si, entretanto, estes causam enfermidades com características clínicas e epidemiológicas distintas (REY, 2001). Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie, permitindo que alguns autores denominem de *L. infantum* o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999).

As leishmanias são protozoários pleomórficos que completam seus ciclos de vida em dois hospedeiros, sendo um vertebrado e um invertebrado (KONTOS; KOUTINAS, 1993). São parasitos digenéticos e apresentam duas formas durante o ciclo biológico: uma aflagelada ou amastigota, intracelular obrigatória, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados e, outra flagelada ou promastigota, encontrada no trato digestório anterior dos insetos vetores (SLAPPENDEL, 1988; SÃO PAULO, 2003).

A transmissão entre hospedeiros vertebrados no Brasil ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (CASTRO, 1996; CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; POCAI et al., 1998; RIBEIRO, 2001), conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui ou tatuquiras (FEITOSA et al., 2000). Trabalhos recentes sugerem um possível envolvimento de outras espécies do gênero *Lutzomyia* na transmissão da doença em áreas não-endêmicas das Américas do Norte e do Sul (TRAVI, 2002).

Os flebotomíneos são mosquitos pequenos (com cerca de 2 a 3 mm), com hábitos intra e peridomiciliares, fazendo seu ciclo larvar na matéria orgânica úmida, o que dificulta o seu combate (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Possuem hábitos crepusculares e noturnos, permanecendo em locais tranquilos, sombrios e úmidos durante o dia. Deslocam-se em vôos curtos e silenciosos, o que não denuncia sua aproximação no momento da picada (REY, 2001; SOARES; TURCO, 2003). Alguns autores associam o período de maior transmissibilidade à estação chuvosa, quando os insetos invadem o domicílio picando o homem e outros animais (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Ao se alimentar em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania sp.*, as quais, posteriormente, sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas. Estas colonizam a parte anterior do tubo digestório do inseto vetor diferenciando-se em formas promastigotas, as quais, presas à parede intestinal do flebótomo, multiplicam-se e sofrem nova diferenciação, transformando-se em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (KONTOS; KOUTINAS, 1993; BANETH, 2006).

Quando realiza o repasto sanguíneo novamente, o inseto pode infectar a pele do hospedeiro vertebrado regurgitando a forma flagelada, a qual é fagocitada pelos macrófagos da pele, perde o flagelo e transforma-se em formas amastigotas, completando o ciclo biológico do parasito (REY, 2001; STRAUSS; BANETH, 2001). Ocorre então a multiplicação das formas amastigotas, com disseminação hematogênica e linfática para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (KONTOS; KOUTINAS, 1993; BANETH, 2006).

A doença era, até recentemente, considerada como rural, típica de ambientes silvestres, mas hoje pode ser também contraída em zonas suburbanas e urbanas. Atualmente surtos e epidemias de leishmaniose visceral têm sido observados em grandes centros urbanos do Brasil (SILVA et al., 2001). O crescente número de casos da doença nessas áreas pode ser explicado pelas alterações ambientais que forçaram a adaptação do vetor ao ambiente urbano (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SILVA et al., 2001).

O processo de urbanização crescente levou a uma expansão das áreas endêmicas com o aparecimento de novos focos, apontando a enfermidade como uma doença reemergente (CASTRO, 1996; ALVES; BEVILACQUA, 2004; MELO, 2004). A incidência de casos de leishmaniose visceral fatal em seres humanos está aumentando, tanto pela crescente urbanização da doença como pela associação com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Com isto, vem sendo observado o deslocamento da faixa etária de ocorrência da doença, aumentando o número de indivíduos com mais de 15 anos que contraem leishmaniose visceral (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Uma vez a doença instalada, esta acelera a replicação do HIV e piora a condição clínica do paciente por imunossupressão adicional (CAMARGO-NEVES; SANTUCCI, 2005).

A doença é endêmica em 88 países e, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 90% dos casos notificados ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh e Brasil (BORJA-CABRERA et al., 2002). No Brasil a ocorrência da leishmaniose visceral vem aumentando, não só em número de casos, mas também na sua dispersão geográfica (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997), sendo endêmica em vários estados (GOMES et al., 1999) e já tendo sido identificada em humanos em 19 dos 27

estados da Federação, com casos autóctones descritos em aproximadamente 1600 municípios (SÃO PAULO, 2003; MELO, 2004).

Devido à grande susceptibilidade do homem e de alguns animais domésticos, particularmente o cão e o gato, a certas doenças, tornou-se de grande importância o estabelecimento de um ciclo doméstico de infecções como a leishmaniose visceral (CAMARGO-NEVES; SANTUCCI, 2005). A doença já foi identificada em cães (*Canis familiaris*), gatos (*Felis domesticus*), canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*), marsupiais (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (GENARO, 1993; CASTRO, 1996; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; BANETH, 2006).

Até ao presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença, o cão, do ponto de vista epidemiológico, é considerado o mais importante, pois apresenta um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; MELO, 2004).

Essa importância baseia-se no fato da doença ser mais prevalente na população canina que na humana, pela constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos e, pelo fato dos cães apresentarem uma maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, o que favorece a infecção dos vetores (CASTRO, 1996; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SCOTT et al., 2001; BANETH, 2006).

A prevalência da leishmaniose visceral em cães de áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% da população (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; CAMPINO, 2002). Acredita-se que em áreas com alta infecção na espécie, a incidência na população humana varie de 1 a 2% (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Em um estudo feito na região metropolitana de Belo Horizonte – MG, de um total de 164 animais examinados, 64% eram soropositivos para *Leishmania chagasi* (SILVA et al., 2001). No Mato Grosso do Sul, de um total de 97 cães, 23,7% foram sororreagentes para leishmaniose visceral (NUNES et al., 2001). Em inquérito

epidemiológico realizado em Montes Claros – MG, de um total de 33.937 exames, 9,9% e 8,8% dos cães das áreas urbana e rural, respectivamente, eram soropositivos (SILVA et al., 2003). Na cidade de Barra do Guariba – RJ, de 365 cães, 25% foram soropositivos para *Leishmania chagasi* (CABRERA et al., 2003).

O primeiro caso de leishmaniose visceral canina no Estado de São Paulo foi diagnosticado no município de Araçatuba, região noroeste do estado, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba, em maio de 1998. A partir de então o número de casos caninos da doença na região vem aumentando consideravelmente, sendo que, de acordo com os dados da Direção Regional de Saúde, 41 municípios já apresentaram casos confirmados da doença, que está se difundindo para outras regiões do Estado, inclusive com casos autóctones identificados na região metropolitana da cidade de São Paulo a partir do ano de 2005 (SÃO PAULO, 2003; REICHMAN, 2006). No município de Araçatuba, cerca de 37.000 cães acometidos pela doença foram submetidos à eutanásia no período compreendido entre os anos de 2002 a 2006¹.

A leishmaniose canina pode ser considerada como uma doença imunomediada, devido à capacidade do parasito em modificar o sistema imunológico do hospedeiro (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; PUMAROLA et al., 1991; FERRER et al., 1995; FEITOSA et al., 2000; ROITT et al., 2003). Os sintomas no cão variam em decorrência dos mecanismos imunológicos ativados pelo hospedeiro, bem como dos órgãos acometidos (CIARAMELLA et al., 1997). A forma visceral é uma doença sistêmica, caracterizada pelo envolvimento do baço, fígado, medula óssea, pele e linfonodos. Essa forma é progressiva e quase sempre fatal, se não tratada (KEMP, 1996).

Na infecção natural, estão ativadas as respostas imunes humoral e celular, sendo que a variedade dos sintomas e a gravidade da doença dependem do equilíbrio entre esses dois sistemas (PINELLI et al., 1994; FEITOSA et al., 2000). A resposta imune humoral na leishmaniose canina é muito exuberante, entretanto, ela é deletéria e não protetora. Como as leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios, as defesas do hospedeiro são altamente dependentes da imunidade celular (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; POCAI et al., 1998; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; ROITT et al., 2003).

¹ MORGADO, A.A. Chefe do Serviço de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba- SP. Dados obtidos por comunicação oral, 2006.

A infecção por *Leishmania chagasi* no cão causa, na maioria das vezes, uma doença sistêmica crônica, que apresenta manifestações clínicas inespecíficas e similares às dos seres humanos, com um período de incubação variável, situando-se entre três e oito meses, em média (GENARO, 1993; SILVA, 1997). Os animais acometidos por leishmaniose visceral podem apresentar alterações digestórias, cardiorrespiratórias, hematológicas, renais, hepáticas, locomotoras, neurológicas, oculares e dermatológicas (GENARO, 1993; BURACCO et al., 1997; CIARAMELLA et al. 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000). O quadro clínico pode se apresentar complicado devido à ocorrência de infecções oportunistas concomitantes (CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; LAMOTHE, 1999; NOLI, 1999).

As principais manifestações clínicas na forma clássica da doença incluem apatia, emagrecimento progressivo, hiporexia ou anorexia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, hipertermia, êmese, diarreia, hemorragia intestinal, coriza, edema de membros, ceratoconjuntivite, blefarite, pelame opaco, alopecia, onicogribose, hiperqueratose, descamação e úlceras cutâneas (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER, 2002; CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

A doença pode apresentar duas formas de evolução, sendo uma aguda, que pode levar o animal a óbito em pouco tempo; e uma latente, na qual cães infectados podem permanecer assintomáticos por um longo período de tempo (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FEITOSA, et al., 2000). Deste modo, de acordo com a sua forma de apresentação pode-se agrupar os cães doentes em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (MANCIANTI, 2004). Os animais assintomáticos podem permanecer sem quadro clínico por toda a vida ou desenvolver sintomas após períodos que variam de três meses a alguns anos (FERRER et al., 1995) mas, uma vez iniciado o processo, a doença evolui inevitavelmente para a morte (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; FEITOSA, et al., 2000).

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral é difícil de ser realizado devido à grande variedade de sintomas, bem como pelo fato de se tratarem de achados clínicos inespecíficos, que podem sugerir outras enfermidades (FEITOSA et al., 2000; SINGH;

SIVAKUMAR, 2003; FEITOSA, 2006). Alterações encontradas no hemograma, na urinálise ou em exames bioquímicos são inespecíficas (GRADONI, 2002), e a presença de formas amastigotas nos esfregaços sangüíneos é um achado raro (IKEDA et al., 2003).

Existem basicamente três categorias de provas para a confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral: os métodos parasitológicos, os sorológicos e os moleculares. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da doença (LEONTIDES et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Formas amastigotas de *Leishmania sp.* podem ser observadas em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sangüíneos corados com corantes de rotina (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996).

Os parasitos são reconhecidos pela sua forma esférica a ovóide, medindo 2-5 µm e contendo um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996). A especificidade deste método é virtualmente 100%. A sensibilidade da técnica depende do grau de parasitemia e do tipo de material biológico coletado (WOLSCHRIJN et al., 1996). Dependendo do tempo despendido procurando o parasito a sensibilidade passa a ser de, no máximo, 80% em indivíduos com sintomas e menor ainda em animais soropositivos assintomáticos (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; GENARO, 1993). Quanto mais severa a manifestação clínica, maior a probabilidade de se encontrar o parasito. Da mesma forma, em animais assintomáticos o achado do parasito é pouco freqüente (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Outro meio de diagnóstico é a realização de provas sorológicas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* circulantes, que se constitui no instrumento mais utilizado para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Elas devem ser interpretadas com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicas, podendo gerar resultados falso-positivos e falso-negativos (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Os testes sorológicos podem falhar em detectar animais que não fizeram soroconversão e soropositivos que se convertem em soronegativos, mas que ainda permanecem infectados (FERRER, 2002; LEONTIDES et al., 2002; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006). Animais com menos de três meses de

idade não devem ser avaliados através desses métodos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (BRAGA et al., 1998).

As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino são a imunofluorescência indireta e o ELISA (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; BRASIL, 2003). O teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania sp.* apresenta, dependendo do antígeno empregado, uma sensibilidade que varia entre 94% e 99,5% e uma especificidade entre 84,4% a 100% (MANCIANTI et al., 1995; LAURENTI et al., 2005; ZANETTE, 2006). A determinação do ponto de corte da reação ocorre por meio da média das densidades ópticas de animais sadios acrescida do desvio padrão da média, o qual pode variar entre dois e cinco desvios (MANCIANTI et al., 1995; RAJASEKARIAH et al., 2001). As alterações dos valores do ponto de corte podem, conseqüentemente, alterar a sensibilidade e especificidade do método de ELISA (FERRER et al., 1995; ZANETTE, 2006).

As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, mas também com organismos filogeneticamente distintos, tais como *Ehrlichia canis* e *Babesia sp.* (RACHAMIN et al., 1991; MELO, 2004; ZANETTE, 2006; FERREIRA et al., 2007). Com o objetivo de tentar elevar a sensibilidade e a especificidade das provas sorológicas, têm sido utilizados antígenos purificados específicos do gênero *Leishmania*, entretanto, ainda assim podem ocorrer reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (VEXENAT et al., 1996; SCALONE et al., 2002; ALVES; BEVILACQUA, 2004; ZANETTE, 2006; FERREIRA et al., 2007).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido a técnica sorológica mais utilizada no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, particularmente em inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2003), entretanto, possui a desvantagem de que, quando da análise de um grande número de amostras, o tempo despendido pelo profissional para a leitura das lâminas é muito grande (RACHAMIN et al., 1991; ZANETTE, 2006). A RIFI demonstra sensibilidade que varia entre 90 e 100% e especificidade entre 80 e 100% (ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006). A especificidade desta prova também é prejudicada devido à ocorrência de reações cruzadas com outras doenças, tais como a doença de Chagas

(COSTA et al., 1991; ALVES; BEVILACQUA, 2004; ZANETTE, 2006; FERREIRA et al., 2007) e a toxoplasmose (ZANETTE, 2006).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral, sendo possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do parasito (NOLI, 1999; BANETH, 2006) Apresenta sensibilidade e especificidade muito elevadas, próximas a 100%, (ASHFORD et al., 1995; ROURA et al., 1999), sendo sua principal desvantagem o requerimento de laboratórios bem equipados (FERRER, 1999; BRASIL, 2003).

Existem discordâncias na literatura com relação à susceptibilidade dos felídeos domésticos à infecção por *Leishmania sp.* Enquanto VITA et al. (2005) relatam haver uma baixa susceptibilidade do gato à enfermidade, estudos experimentais realizados por KIRKPATRICK et al. (1984) e SIMÕES-MATTOS et al. (2005) ratificam a susceptibilidade da espécie em desenvolver a doença.

Acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à doença (PENNISI, 2002; VITA et al., 2005), provavelmente relacionada à fatores genéticos (MANCIANTI, 2004). Apesar da ocorrência de infecções esporádicas, os felinos não são considerados, até o momento, um reservatório importante da doença (OLIVEIRA, 2004), havendo poucas informações quanto ao potencial desses animais servirem como reservatórios. Também são pouco conhecidas a prevalência, a transmissão e o quadro clínico da enfermidade nessa espécie, sendo a literatura muito escassa no que diz respeito à pesquisa de *Leishmania chagasi* em populações de regiões endêmicas.

A primeira referência à leishmaniose felina data de 1756 quando Russel, no relatório de sua viagem à cidade de Aleppo, na Índia, descreveu que, além do homem e dos cães, os gatos eram acometidos pela doença (NAUCKE, 2000). Casos esporádicos da enfermidade foram descritos a partir do século XX, notadamente nos países onde a infecção por *Leishmania sp.* é endêmica (PENNISI, 2002).

A infecção natural de um gato doméstico teve seu primeiro relato em 1912, na Argélia, em um animal que convivia com uma criança portadora de leishmaniose visceral. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasito na medula óssea, sem a identificação da espécie causadora de enfermidade (SERGENT

et al., 1912). Existem relatos da doença em felinos domésticos em países da África (BOSELUT, 1948; DENUZIERE, 1977), Ásia (BERGEON, 1927; MACHATTIE et al., 1931), Américas (SAVANI et al., 2004) e Europa (HERVÁS et al., 1999; POLI et al., 2002), embora, na maioria dos casos, não tenha sido feita a caracterização do agente etiológico no que diz respeito à espécie envolvida dificultando, dessa forma, um mapeamento da doença diferenciando as suas formas visceral e tegumentar.

Segundo PASSOS et al. (1996), é possível que infecções em gatos sejam relativamente comuns em algumas áreas endêmicas. No Brasil o primeiro diagnóstico de leishmaniose visceral na espécie ocorreu no ano de 2001, no município de Cotia, estado de São Paulo (SAVANI et al., 2004). No município de Araçatuba foram identificados outros três gatos parasitologicamente positivos, encaminhados pelo Centro de Controle de Zoonoses da cidade ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, campus de Araçatuba, sendo um no ano de 2003 (MIRACELLY, 2004), e outros dois no ano de 2004¹. Apesar do diagnóstico da enfermidade ter sido exclusivamente parasitológico sem definição da espécie, trata-se provavelmente de *Leishmania chagasi* por serem animais provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.

De uma maneira geral, o quadro clínico na leishmaniose felina é inespecífico e se assemelha ao quadro clínico observado na espécie canina, dificultando o diagnóstico (SHAW et al., 2001; SIMÕES-MATTOS et al., 2004). Sintomas como depressão, anorexia, (DUNAN et al., 1998; PENNISI, 1999; PENNISI et al., 2004), emaciação (OZON et al., 1998; PENNISI et al., 2004; SAVANI et al., 2004), estomatite (PENNISI, 1999; LEIVA et al., 2005), gengivite (LEIVA et al., 2005), êmese (DUNAN, et al., 1989; HERVÁS et al., 1999), diarreia (PENNISI, 1999), hipertermia (SAVANI et al., 2004), desidratação (PENNISI, 1999; PENNISI et al., 2004; SAVANI et al., 2004), hepatomegalia (LEIVA et al., 2005), linfadenomegalia local ou generalizada (DENUZIERE, 1977; HERVÁS et al., 1999; PENNISI, 1999; LEIVA et al., 2005), lesões cutâneas, dermatite seborréica úlcero-crostosa, alopecia difusa (OZON et al., 1998; HERVÁS et al., 1999; PENNISI et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; RÜFENACHT et al., 2005; SOUZA et al., 2005), uveíte (PENNISI et al., 2004; LEIVA et al., 2005) e

¹ BRESCIANI, K.D.S. Professora Assistente Doutora da Disciplina de Parasitologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da Unesp, campus de Araçatuba. Dados obtidos por comunicação oral, 2005.

atrofia da musculatura temporal (SAVANI et al., 2004) já foram descritos como formas de apresentação da leishmaniose visceral em gatos.

Eventualmente a doença pode assumir uma forma aguda típica e o animal evolui para o óbito em poucas semanas (OZON et al., 1998). As alterações hematológicas e bioquímicas encontradas em gatos doentes são similares às descritas para a espécie canina (COSTA-DURÃO et al., 1994; LAURELLE-MAGALON; TOGA, 1996; OZON et al., 1998; PENNISI, 1999; HERVÁS et al., 2001; LEIVA et al., 2005).

Os principais métodos sorológicos utilizados em inquéritos têm sido as técnicas de ELISA e RIFI (PENNISI, 2002; MANCIANTI, 2004; SIMÕES-MATTOS et al., 2004). Estudos acerca da soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania sp.* em gatos, utilizando as técnicas de RIFI, ELISA, hemaglutinação indireta, aglutinação direta e western blot, apresentaram resultados variando de zero a 68% (SHERLOCK, 1996; PENNISI, 2002; GRAMICIA; GRADONI, 2005; VITA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; MÁRTIN-SÁNCHEZ et al., 2006).

Da mesma forma que a soroprevalência canina, a felina pode variar sensivelmente de acordo com a metodologia utilizada (amostragem, técnica sorológica e ponto de corte adotado) e com a região geográfica estudada (DANTAS-TORRES et al., 2006). Além disso, segundo POLI et al. (2002), os gatos podem ser mais refratários que os cães à infecção por *Leishmania sp.*

Evidências apontam que a leishmaniose felina pode estar associada a doenças imunossupressoras, tais como a leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) viral felina (NAUCKE, 2000; RODRIGUEZ et al., 2002; MANCIANTI, 2004; GREVOT et al., 2005). O papel desses agentes precisa ser esclarecido, uma vez que em alguns estudos a presença de infecção por *Leishmania sp.* têm sido correlacionada com soropositividade para FIV e/ou FeLV (HERVÁS et al. 1999). PENNISI et al. (1999, *apud* DANTAS-TORRES et al., 2006) demonstraram que a sorologia positiva para FIV esteve significativamente associada à soropositividade para leishmaniose em gatos na Itália.

Os escassos relatos, no que concerne aos aspectos clínico-patológicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em felinos, restringem o entendimento sobre o papel do gato como hospedeiro reservatório de *Leishmania sp.* Apesar de, no sul da

Europa, um gato naturalmente infectado com *Leishmania infantum* ter sido fonte de infecção para um vetor flebotomíneo, comprovado por xenodiagnóstico (MAROLI et al., 2007), ainda não existem trabalhos que evidenciem o real envolvimento desses animais no ciclo biológico do parasito, fazendo com que muitos pesquisadores considerem o gato como um hospedeiro acidental das leishmanias.

3. OBJETIVOS

O presente experimento teve por objetivos pesquisar, em uma área endêmica para leishmaniose visceral canina, a ocorrência da infecção em gatos, por meio de exame parasitológico direto e da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelas técnicas de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), bem como determinar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de ELISA e RIFI em comparação com os resultados obtidos por meio do exame parasitológico direto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados

Foram colhidas amostras de 200 gatos, adultos, independente de sexo ou raça, encaminhados para eutanásia ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil, no período compreendido entre agosto de 2005 e dezembro de 2006.

Todos os animais foram testados para a presença de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, utilizando-se as técnicas de ELISA e de imunofluorescência indireta (RIFI). Foi também realizada a pesquisa de formas amastigotas do parasito em esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, medula óssea, baço e fígado.

4.2 Colheita de sangue total

A colheita de sangue foi realizada após anti-sepsia local, por punção da veia jugular, utilizando-se para tanto, agulhas 25 x 8 mm acopladas a seringas estéreis de 10 mL, com o intuito de se obter um volume mínimo de 5,0 mL de amostra, que foi mantido à temperatura ambiente até a retração visível do coágulo. Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação a 2500 r.p.m., durante 10 minutos, para melhor separação do soro. Este, por sua vez, foi estocado a -20° C, até o momento do seu processamento.

4.3 Colheita de material para a pesquisa direta de *Leishmania sp.*

Após a colheita de sangue, os felinos foram anestesiados com pentobarbital sódico¹ na dose de 25 mg/Kg, por via intravenosa e, em seguida, submetidos à eutanásia por infusão venosa de cloreto de potássio², independente do peso dos mesmos.

¹ Hypnol 3% – Fontoveter – Itapira, SP

² Cloreto de potássio a 19,1% – Darrow – Rio de Janeiro, RJ

Posteriormente os animais foram posicionados em decúbito lateral para exposição do linfonodo poplíteo, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, por incisão da musculatura e tendão adjacentes. Realizou-se então punção biópsia aspirativa com agulha 25 x 8 mm acoplada a uma seringa de 10 mL. Em seguida, acessou-se a cavidade abdominal, por incisão da pele e musculatura adjacentes à linha alba para a realização das PBA's de fígado e baço.

Após a incisão da musculatura adjacente ao fêmur, este foi serrado, com o auxílio de uma serra ortopédica, possibilitando a colheita de material da medula óssea com agulha 40 x 16 mm acoplada a uma seringa de 20 mL para a confecção dos esfregaços. Todas as lâminas foram coradas com corante hematológico¹ e observadas ao microscópio óptico, em objetiva de 100X (imersão), para a pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania sp.*

4.4 ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*

4.4.1 Produção de antígeno

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* foram isoladas a partir de baço de hamster cronicamente infectado, em meio de cultura em RPMI 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. Após duas a três passagens em cultura, promastigotas em fase estacionária de cultivo foram lavadas três vezes em solução salina tamponada estéril, através de centrifugação a 3000 r.p.m. por 10 minutos e estocadas em freezer a -80°C, na forma de um precipitado formado no fundo do tubo.

Para o preparo do antígeno, o precipitado contendo as formas promastigotas do parasito foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por três vezes consecutivas e, posteriormente, o sobrenadante foi retirado, sendo utilizada uma alíquota para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

¹ Panótico Rápido® – Laborclin – Curitiba, Paraná

4.4.2 Ensaio para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* nos soros

A presença de IgG anti-*Leishmania chagasi* no soro dos animais do grupo experimental foi determinada por meio da técnica de ELISA, como descrita por LIMA et al. (2005). As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi*, numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9.6, e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com solução salina tamponada contendo 0.05% de tween 20 (PBS-T) por quatro vezes, as placas foram bloqueadas com 150 µL de solução salina tamponada acrescida de soro fetal bovino (PBS-BSF) a 10% e incubadas à temperatura ambiente durante uma hora. Após nova lavagem com PBS-T por quatro vezes, adicionou-se 100 µL por poço das amostras de soros dos animais controle positivo, controle negativo (animal saudável de área não endêmica para leishmaniose visceral) e dos gatos do grupo experimental, testadas em duplicata, diluídas 1:50 em PBS contendo 0,05% de tween 20 e 10% de BSF e incubadas por três horas à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com PBS-T, colocou-se 100 µL por poço do anticorpo proteína A, marcada com peroxidase¹, previamente titulada, diluída 1:100 em tampão bloqueio tween 20. As padronizações das diluições de soro e do anticorpo estão descritas posteriormente.

Após a incubação por uma hora, em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada quatro vezes com PBS-T e adicionados 100 µL de uma solução contendo substrato ortofenilenediamina (OPD) (0,4 mg/mL) em diluente apropriado. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µL de HCl 16% e a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492 nm, utilizando o leitor de ELISA². Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata.

Para a padronização das diluições mais apropriadas do soro de gatos e para a determinação da concentração do anticorpo proteína A peroxidase, realizou-se ensaio com diluições de soro dos animais controle positivo e negativo de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, bem como anticorpo nas concentrações 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 e 1:1200. A escolha das melhores diluições foi determinada pelas diferenças das densidades ópticas médias dos dois controles, em triplicata, tendo sido preconizadas as

¹ Sigma – Aldrich Brasil LTDA

² Labsystems Multiskan EX

concentrações de soro de 1:50 e de proteína A peroxidase de 1:100, conforme demonstrado nos Apêndices A e B.

Posteriormente, fez-se a determinação do ponto de corte da técnica de ELISA para a espécie com soros de 54 gatos sadios, provenientes do município de Santos, estado de São Paulo, Brasil, área não endêmica para leishmaniose visceral. Para tanto, utilizou-se a equação $\bar{x} + 3 S$, sendo \bar{x} a média dos animais negativos e S o desvio padrão deste mesmo grupo, tendo sido estipulado o ponto a partir da média da leitura das densidades ópticas de todas as amostras, acrescida de três desvios-padrões, o qual foi de 0,332. Os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas) dos animais desse grupo encontram-se apresentados no Apêndice C.

Após a padronização da técnica e determinação do ponto de corte, os valores de densidade óptica média do grupo experimental foram corrigidos em função das médias dos controles positivo e negativo, utilizando-se o modelo de A/P.

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

4.5 RIFI para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*

As 200 amostras foram testadas frente ao antígeno obtido a partir de promastigotas da cepa de referência *Leishmania chagasi* (MCER/BR/81/M6445), mantida conforme descrito por SAN MARTIN-SAVANI (1998) e a técnica, bem como o preparo do antígeno, foram realizados segundo GUIMARÃES et al. (1974).

As lâminas foram sensibilizadas adicionando-se 15 μL da suspensão de parasitos, em solução salina tamponada (SST), em cada círculo. Após a secagem em estufa, as lâminas foram embaladas em papel extra-fino e papel alumínio e

armazenadas em freezer à -20°C . No momento do uso, as lâminas foram descongeladas em estufa durante cinco minutos. Em cada círculo, previamente impregnado com o antígeno, foram adicionados 20 μL das amostras de soro dos gatos a serem testados, bem como os seus respectivos controles positivo e negativo, diluídas na concentração de 1:20 em SST com pH 7,2. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e, em seguida, lavadas por imersão em dois banhos de SST de 10 minutos cada. Após a secagem em temperatura ambiente, foram acrescentados 20 μL de uma solução composta por anti-gamaglobulina total de gato¹ conjugada com isotiocianato de fluoresceína², diluído a 1:100 em azul de Evans 4mg%. Optou-se por utilizar a diluição 1:100 do conjugado, por ter sido esta a que melhor discriminou os soros positivos das amostras negativas para leishmaniose visceral felina.

As lâminas foram novamente incubadas e lavadas, como descrito acima. Posteriormente foram secas e montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 8,0) e recobertas por lamínula, sendo a leitura efetuada em microscópio de imunofluorescência³ em objetiva de 40X. Soros sabidamente positivos e negativos foram utilizados em cada lâmina como controles positivo e negativo da reação. Foram consideradas reagentes, as amostras que apresentaram as promastigotas fluorescentes, inclusive no flagelo, e não reagentes, as amostras que apresentaram o parasito sem fluorescência com cor avermelhada.

Os soros reagentes foram novamente testados para determinar o título de anticorpos presentes na amostra, em diluições seriadas na razão 2 a partir da diluição 1:20, ou seja, 1:40, 1:80 e 1:160, até a última diluição em que as formas promastigotas apresentaram fluorescência. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram título igual ou superior a 40.

¹ LabZoo – VIS

² Sigma – Aldrich Brasil LTDA

³ Axioskop da Zeiss®

4.6 Análise estatística

Foram determinadas a sensibilidade e a especificidade dos métodos de ELISA e imunofluorescência indireta considerando-se como referência os resultados obtidos no exame parasitológico direto para leishmaniose visceral felina. O cálculo da sensibilidade e especificidade seguiu as fórmulas apresentadas abaixo.

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

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

O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar a concordância dos métodos de ELISA e RIFI com o exame parasitológico. A interpretação da concordância entre os métodos a partir dos valores de Kappa, de acordo com Pereira (2002), encontra-se apresentada na Tabela 1.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa "Statistical Analysis System" (SAS) e as estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Tabela 1 - Valores do coeficiente Kappa e sua respectiva concordância, de acordo com Pereira (2002).

Kappa	Concordância
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

5. RESULTADOS

5.1 Pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* pelo exame parasitológico direto

De um total de 200 gatos avaliados pelo exame parasitológico direto, em oito (4,0%) foram evidenciadas formas amastigotas de *Leishmania sp.* Dos animais positivos, apenas dois (25,0%) apresentavam alterações ao exame físico, caracterizadas por lesões crostosas na região cervical dorsal e hepatoesplenomegalia.

Em quatro gatos foram observadas formas amastigotas do parasito somente em preparados citológicos de linfonodo e, em outro, em citologia de fígado. Já em um gato evidenciou-se *Leishmania sp.* tanto em linfonodo quanto em medula óssea e em outros dois, em preparados citológicos por PBA de linfonodo, baço e medula óssea. O número de gatos e sua respectiva percentagem, de acordo com a presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em linfonodo, baço, fígado e medula óssea, encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores absolutos e percentuais encontrados para a presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* por meio de punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, baço, fígado e medula óssea de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

Tecido	PBA	
	Número de Animais	Percentagem
Linfonodo	7	87,5%
Medula óssea	3	37,5%
Baço	2	25,0%
Fígado	1	12,5%
Total	8	100%

Os achados individuais para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em esfregaços obtidos por PBA de linfonodo, baço, fígado e medula óssea encontram-se apresentados no Apêndice D.

5.2 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelos métodos de ELISA e RIFI

5.2.1 ELISA

Todas as amostras de soro dos gatos de área endêmica para leishmaniose visceral foram submetidas à técnica de ELISA, e os números de animais positivos e negativos, com suas respectivas percentagens, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na Tabela 3. Os valores individuais das médias das densidades ópticas (DO) encontram-se apresentados no Apêndice E. As amostras com DO superior a 0,332 foram consideradas positivas, perfazendo um total de seis animais. Destes, nenhum apresentou alterações no exame físico.

Tabela 3 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), em número absoluto e percentagem, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

ELISA	Número de animais	Percentagem
Positivo	6	3%
Negativo	194	97%
Total	200	100%

5.2.2 RIFI

Todas as amostras de soro dos gatos de área endêmica para leishmaniose visceral foram submetidas à técnica de RIFI, e os números de animais positivos e negativos, bem como suas respectivas percentagens, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na Tabela 4. Os valores individuais dos títulos de anticorpos obtidos estão demonstrados no Apêndice F. Apenas um animal, assintomático, apresentou título igual ou superior à 1:40, considerado positivo para a doença.

Tabela 4 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

RIFI	Número de animais	Percentagem
Positivo	1	0,5%
Negativo	199	99,5%
Total	200	100%

5.3 Determinação dos valores de sensibilidade e especificidade relativas dos métodos empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral felina

Considerou-se como referência para a determinação da sensibilidade e especificidade relativas dos métodos de ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) os resultados obtidos no exame parasitológico para leishmaniose visceral felina. As comparações entre os resultados obtidos pelo exame parasitológico direto e as técnicas de ELISA e RIFI encontram-se apresentadas, respectivamente, nas Tabelas 5 e 6. Os valores de sensibilidade e especificidade, bem como o coeficiente Kappa, estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 5 - Resultados positivos e negativos para o diagnóstico de leishmaniose visceral, obtidos por meio das técnicas de ELISA e do exame parasitológico, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

ELISA	Parasitológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1	5	6
Negativo	7	187	194
Total	8	192	200

Dos 200 animais avaliados, seis (3,0%) foram considerados positivos pela técnica de ELISA, e oito (4,0%) foram considerados positivos no exame parasitológico direto. Destes, somente um obteve resultado positivo pelos dois métodos diagnósticos.

Tabela 6 - Resultados positivos e negativos para o diagnóstico de leishmaniose visceral, obtidos por meio das técnicas de RIFI e do exame parasitológico, de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

RIFI	Parasitológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	1	0	1
Negativo	7	192	199
Total	8	192	200

Os resultados demonstraram que, dos 200 animais avaliados, um (0,5%) foi considerado positivo pela RIFI, e oito (4,0%) foram considerados positivos no exame parasitológico direto. O animal positivo pelo método de RIFI também obteve resultado positivo pelo exame parasitológico direto.

Tabela 7 - Valores de sensibilidade e especificidade relativas para as técnicas de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), empregadas no diagnóstico de leishmaniose de 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
RIFI	12,5%	100,0%	0,2152
ELISA	16,7%	96,4%	0,1124

Dos 200 animais avaliados, 13 foram considerados positivos para *Leishmania sp.* por algum dos métodos diagnósticos utilizados. Desta forma, a prevalência da doença na população de gatos examinados foi de 6,5%. Destes, nove eram fêmeas (69,2%) e quatro machos (30,8%), dos quais apenas dois (15,4%) sintomáticos e os outros 11, assintomáticos (84,6%). Em relação à faixa etária aproximada, avaliada por análise da arcada dentária, cinco (38,5%) apresentavam idade entre seis meses e dois anos, sendo os demais com idade superior a dois anos (61,5%). Somente um gato (7,7%) apresentou positividade nos exames parasitológico direto, ELISA e RIFI, enquanto os outros 12 (92,3%) foram considerados positivos em apenas um destes. Os resultados individuais da pesquisa de *Leishmania sp.* em 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, obtidos pelos métodos parasitológico direto, ELISA e RIFI, estão apresentados no Apêndice G.

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma importante zoonose, cuja prevalência vem aumentando muito nos últimos anos no Brasil, sendo o cão considerado o principal reservatório no ambiente doméstico. Dentre os recentes relatos de novos hospedeiros vertebrados infectados com as diferentes espécies de *Leishmania sp.*, merece especial atenção o gato, devido à importância em saúde pública, uma vez que, assim como o cão, possui um contato próximo com os seres humanos.

Apesar de alguns inquéritos epidemiológicos para a presença de anticorpos anti-*Leishmania sp.* em felinos terem utilizado técnicas tais como hemaglutinação indireta, aglutinação direta e western blot (DANTAS-TORRES et al., 2006), no presente estudo a escolha dos métodos diagnósticos baseou-se nas recomendações do Ministério da Saúde para o diagnóstico da enfermidade em cães, bem como em autores que optaram pela utilização das técnicas de ELISA e RIFI para o diagnóstico da leishmaniose visceral em gatos (VITA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006). Baseando-se nos trabalhos de LEONTIDES et al. (2002), SINGH et al. (2003) e ZANETTE (2006), no presente experimento o exame parasitológico foi considerado o teste ouro para o diagnóstico da doença.

Dos 200 gatos avaliados, somente oito apresentaram formas amastigotas de *Leishmania sp.* no exame parasitológico. Tais achados corroboram com as observações de SLAPPENDEL (1988) e IKEDA-GARCIA e FEITOSA (2006) de que o diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral é mais sensível quanto mais adiantado for o estágio da doença e que, em animais assintomáticos, dificilmente consegue-se comprovar a presença do parasito. Essas observações podem justificar a ocorrência, no presente estudo, de resultados positivos pelo método de ELISA em animais parasitologicamente negativos.

Os baixos valores de sensibilidade obtidos em ambas as técnicas sorológicas utilizadas neste estudo, 12,5% para a RIFI e 16,7% para o ELISA (Tabela 7), quando comparados aos resultados obtidos em experimentos com cães (ZANETTE, 2006), podem ser justificados pelos relatos de FERRER (2002), LEONTIDES et al. (2002) e

IKEDA-GARCIA e FEITOSA (2006), os quais afirmaram que os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar animais infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, naqueles que nunca farão soroconversão e em animais soropositivos que se convertem em soronegativos, mas que ainda permanecem infectados.

Além disso, não existem estudos que descrevam a resposta imunológica de gatos à infecção por *Leishmania sp.*, e, não é possível afirmar que a resposta nesta espécie seja igual à de cães. Por outro lado, o fato de existirem gatos sorologicamente positivos demonstra que houve exposição do animal ao parasito, mas não indica, necessariamente, uma susceptibilidade do animal à doença com conseqüente desenvolvimento de sintomas.

A prevalência de leishmaniose visceral na população de gatos do presente estudo (6,5%) foi um pouco superior à observada em inquéritos epidemiológicos realizados no Egito nos anos de 1982 (3,7%), 1988 (3,6%) e 1994 (3,3%); um pouco abaixo da encontrada em estudos conduzidos em Fortaleza, no Brasil, no ano de 2001 (10,7% e 13,0%), na França nos anos de 1993 (12,7%) e 1998 (12,4%), nos Estados Unidos no ano de 2004 (10,0%) (DANTAS-TORRES et al., 2006) e na Itália em 2005 (16,3%) (VITA et al., 2005). No entanto, foram bem inferiores aos verificados em estudos realizados na Itália em 1999 (59%) e em 2000 (68,0%), na Espanha em 2002 (42,0%), no Rio de Janeiro, Brasil, em 2002 (50,5%) (DANTAS-TORRES et al., 2006) e na Espanha em 2006 (70,6%) (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006). Cabe ressaltar que as técnicas utilizadas nestes estudos não foram as mesmas e podem também ter influenciado na variação dos resultados, conforme as observações de DANTAS-TORRES et al. (2006)

As amostras de soro dos animais não foram testadas para a pesquisa de outros agentes infecciosos, o que não permite excluir a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, como foi observado em cães por RACHAMIN et al. (1991), MELO (2004), ROSÁRIO et al. (2005), ZANETTE (2006) e FERREIRA et al. (2007).

Não foram utilizados, no presente estudo, gatos com menos de seis meses de idade, porque animais com até três meses podem apresentar resultados

falso-positivos em métodos sorológicos devido à presença de anticorpos maternos (BRAGA et al., 1998).

Os resultados demonstraram uma maior prevalência de animais positivos com idade superior aos dois anos (61,5%), concordando com os achados de PENNISI (2002) que observou uma ocorrência de 65% em animais nesta mesma faixa etária.

Em relação ao sexo, dos 13 gatos infectados, nove (69,2%) eram fêmeas, confirmando os achados de PENNISI (2002) que encontrou uma percentagem de 73% de fêmeas positivas.

Apenas dois (25%) dos animais positivos apresentavam sinais clínicos, caracterizados por lesões crostosas na região cervical dorsal e hepatoesplenomegalia, corroborando com os relatos de OZON et al. (1998), HERVÁS et al. (1999) e LEIVA et al. (2005), os quais descreveram os mesmos sintomas em felinos com leishmaniose visceral. Entretanto, torna-se difícil correlacionar esses achados exclusivamente à leishmaniose visceral, uma vez que não foram pesquisadas outras enfermidades nos referidos animais. Além disso, evidências apontam que a leishmaniose felina pode estar associada a doenças imunossupressoras, tais como a leucemia viral felina e imunodeficiência felina, enfermidades estas que poderiam, por exemplo, justificar os sinais clínicos encontrados nos animais (NAUCKE, 2000; RODRIGUEZ et al., 2002; MANCIANTI, 2004; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2006).

Apesar da ausência de trabalhos que confirmem um possível papel dos felinos no ciclo zoonótico de transmissão das leishmanioses, o presente estudo verificou que gatos vivendo em áreas endêmicas para a leishmaniose visceral estão expostos ao contato com o agente etiológico, podendo apresentar replicação do parasito em alguns órgãos e desenvolvendo títulos de anticorpos anti-*Leishmania sp.*

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições do presente experimento, permitiram concluir que:

1. Do total de 200 animais avaliados, 13 (6,5%) foram considerados infectados por pelo menos um dos métodos diagnósticos utilizados,
2. A sensibilidade e a especificidade dos métodos sorológicos testados foram 16,7% e 96,4% para a técnica de ELISA e 12,5% e 100,0% para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

8. REFERÊNCIAS

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n.1, p.259-265, 2004.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.3, p.251-255, 1995.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.685-698.

BERGEON, M. P. Un cas de leishmaniose chez le chat. **Bulletin de la Société de Science Vétérinaire de Lyon**, v.30, p. 92-93, 1927.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C.B. Long last protection against canine kalazar using the FML-QuilA saponin vaccine in na endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v.20, n.27-28, p.3277-3284, 2002.

BOSELUT, H. Un cas de leishmaniose generale du chat. **Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie**, v.26, n.1, p.14, 1948.

BRAGA, M.D.M.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M.M.L.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W.O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.315, n.5, p.419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.120p.

BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *leishmania donovani* infection in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 29 - 30, 1997.

CABRERA, A. A. M.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A.; MARZOCHI, M. C.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V.; JANSEN, A. M. Canine Visceral leishmaniasis in barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assesment of risk factores. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 45, n.2, p.79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; SANTUCCI, S. G. **Leishmaniose visceral americana**. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.html>>. Acesso em: 21 fev. 2005.

CAMPINO, L. M. Canine reservoirs and Leishmaniasis: epidemiology and disease. In: FARRELL, J. P. **World class parasites: volume 4 Leishmania**. Norwell: Kluwer Academic, 2002. p.45-57.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n.21, p.539-543, 1997.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALIC, M.S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**, v.24, n.1, p.21-25, 1991.

COSTA-DURÃO, J. F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M. C.; CORRÊA, J. J.; SIMÕES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): nota preliminar. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, v.89, N.511, p. 140-144, 1994.

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

DENUZIERE, C. Un chat leishmanien. **La Semaine Vétérinaire**, v. 32, p. 1-2, 1977.

DUNAN, S.; MARY, C.; GARBE, L.; BRETON, Y.; OLIVON, B.; FERREY, P.; CABASSU, J.P. A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la région marseillaise. **Bulletin de la Société Française de Parasitologie**, v.7, n.2-3, p.273-277, 1998.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1. 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Editora UNESP, 2006. p.10 – 11.

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.

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine leishmaniasis in presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.146, n.3-4, p. 235 - 241, 2007.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2, 2002. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings...** Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.21-24.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain, **Anais...** Barcelona, 1999. p.6 - 10.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

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

GOMES, H. R.; RODRIGUES, M. S.; PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; SANTOS, W. L. C. Comparação entre ELISA de soro e de eluato para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999. Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 212.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM 2., 2002, Sevilla, Spain. **Anais...** Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.7-14. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution.

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

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

GUIMARÃES, M. C. S.; GIOVANNINI, V. L.; CAMARGO, M. E. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 16, p. 145-148, 1974.

HERVÁS J.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; LOPEZ, J.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; GUERRERO, M. J.; MORENO, A. Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. **Veterinary Record**, v. 149, n.20, p. 624-625, 2001.

HERVÁS J.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; SÁNCHEZ-ISARRIA, M. A.; PELISSER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J. C.; 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.

IBGE. **Normas de apresentação de tabelas**. 3.ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61p.

IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, v.8, n.47, p.42-48, 2003.

IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Clínica Veterinária**, v.11, n.62, p.32-38, 2006.

KEMP, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. The constrasting roles of CD4+T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, v.17, n.1, p.13-16, 1996.

KIRKPATRICCK, C.E.; FARRELL, J.P.; GOLDSCHMIDT, M.H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**. v.58, n.2, p.125-131, 1984.

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.

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from a (Amphotericin B) to Z (Zyloric®). In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain, **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 12 - 17.

LAURELLE-MAGALON, C.; TOGA, I. Un cas de leishmaniose feline. **Pratique Médicale Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v.31, p.255-261, 1996.

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 a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.71-75, 2005.

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.

LIMA, V.M.F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A.C.; CORREA, A.P.F.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.215-218, 2005.

MACHATTIE, C.; MILLS, E. A.; CHADWICK, M. C. R. Naturally occurring oriental sore of the domestic in Iraq. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, v.25, p.103-106, 1931.

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

MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.59, n.1, p.13-21, 1995.

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, n.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**, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL_udi=B6TD74MHPC0V2&_user=972052&_coverDate=12%2F08%2F2006&_rdoc=1&_fmt=&_orig=research&_sort=d&vie

w=c&+acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=fa57d0bc8d83ee460fd4c697902ac2d8> Acesso em: 26 mar. 2007>.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, pt.3, p.237-246, 1999.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., 2004. **Anais...** Minas Gerais, Ouro Preto, 2004.

METTLER, M.; GRIMN, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5515-5519, 2005.

MIRACELLY, K. Cidade tem primeiro caso de leishmaniose em gato. **Folha da Região**, Araçatuba, 18 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.folhadaregiao.com.br/noticia.php?44494>>. Acesso em: 21 fev. 2005.

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

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

NUNES, V. L.; GALATI, E. A.; NUNES, D. B.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S.; ISCHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C.; D'AAURIA, S. R.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.3, p.299-300, 2001.

OLIVEIRA, A. P. **Inquérito sorológico de *Leishmania sp* em gatos domésticos (*Felis catus*) da região de Guaratiba, município do Rio de Janeiro, Brasil.** 2002. 33f. (Monografia) – Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”, Rio de Janeiro, 2002.

OLIVEIRA, T. M. F. S. **Detecção de anticorpos anti- *Leishmania chagasi* em soros de cães do município de Jaboticabal, área não endêmica para a doença.** 2004. 46f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIEVRE, A.; HASS, P. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v.75, n.2-3, p.273-277, 1998.

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

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

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

PENNISI, M. G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; Lo GIUDICE, S. Case report of leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, suppl.1, p.363-366, 2004.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 501 - 515, 1998.

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.

PUMAROLA, M.; BREVIK, L.; BADIOLA, J.; VARGAS, A.; DOMINGO, M.; FERRER, L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 105, n. 3, p. 279 - 286, 1991.

RACHAMIN, N.; JAFFES, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; SCHNUR, L.F.; JACOBSON, R.L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Annal of Tropical and Parasitology**, v.85, n.5, p.503-508, 1991.

RAJASEKARIAH, G.H.R.; RYAN, J.R.; HILLIER, S.R.; YI, L.P.; STITELER, J.M.; CUI, L.; SMITHYMAN, A.M.; MARTIN, S.K. Optimization of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. **Journal of Immunological Methods**, v.252, n.1-2, p.105-119, 2001.

REICHMANN, M.L.A.B. Leishmaniose visceral canina: uma zoonose reemergente. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006. **Anais...** Jaboticabal, SP, 2006.

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

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.3, n. 11, p. 13 - 14, 1997.

RODRIGUEZ, J. H.; ARÉVALO, J. P.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F.; FERNANDEZ, J. L.; BOISO, A. M.; GOMEZ VILLAMANDOS, J. C. Evaluation of local immunoresponse in feline leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proccedings...** Granada: WSAVA, 2002. Disponível em: internet <<http://vin.com/proccedings/Proccedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2754>>. Acesso em: 12 jan. 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2003. 481p.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.2, p.197-203, 2005.

ROURA, X.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v.144, n.10, p.262-264, 1999.

RÜFENACHT, S.; SAGER, H.; MULLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M. M.; ROOSIE, P. J. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Record**, v.156, n.17, p.542-545, 2005.

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p.
Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_vis/LVA.pdf >
Acesso em: 13 de ago. 2006.

SAN MARTIN-SAVANI, E. **Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar americana em cães errantes do Município de São Paulo, 1995-1996**. 1998. 78f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v.104, n.4, p.275-285, 2002.

SCOTT, D.W.; WILLIAM, H.M.; GRIFFIN, G.E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. In:____. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.517-542.

SERGEANT E. T.; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La leishmaniose á Alger. Infection simultanée d'un elefant, d'un chien et d'un chat dans la même hatitation. **Bulletin de Societé de Pathologie Exotique**, v.5, p. 93-98, 1912.

SHAW, S. E.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline and Surgery**, v.3, n.4, p.193-209, 2001.

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.

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

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R. S. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.3, p.285-291, 2001.

SILVA, J. C. F.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO – COELHO, G.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2-3, p.161-173, 2003.

SILVA, J. C. F. Leishmaniose visceral canina no município de Montes Claros, MG, Brasil, 1997. 133f. Dissertação (mestrado em parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M. R. F.; POMPEUI, M. M. L. Feline leishmaniasis uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n.550, p.78-87, 2004.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M. R. F.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA-LIMA, J. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; PRATA JÚNIOR, R. C.; HOLANDA, C. M.; RONDON, F. M. C.; BASTOS, K. M. S.; COÊLHO, Z. C. B.; COÊLHO, I. C. B.; BARRAL, A.; POMPEU, M. M. L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.3-4, p.199-208, 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. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

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.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis*. (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.75, n.3, p.301-330, 2003.

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

STRAUSS, A.I.D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis (last update: 26-sep-2001). In: CARMICHAEL, L. (Ed.) **Recent advances in canines diseases**. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/baneth/> Acesso em: 2 de maio 2004.

SWENSON, C.L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P.C.; JOHNSON, S.E.; WILKIE, D.A.; EATON, K.A.; KOCIBA, G.J. Visceral leishmaniasis in an English Foxhound from an Ohio research colony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, n.9, p.1090-1092, 1988.

TRAVI B.L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-LERNA, J.; ADLER, G. H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic áreas. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n.1, p. 83 – 86, 2002.

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

VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniasis and erlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, v.29, suppl.2, p.319-321, 2005.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

WOLSCHRIJN, C.F.; MEYER, H.P.; HAZEWINDEL, H.A.W.; WOLVEKAMP, W.T. Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. **Journal Small Animal Practice**, v.37, n.12, p.601-603, 1996.

APÊNDICES

Apêndice A - Densidades ópticas médias (DO) da padronização das diluições de soro e proteína A peroxidase (PTN A), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* na espécie felina, realizada com amostras positiva e negativa. (Araçatuba-SP, 2007)

Diluição	DO	Diluição	DO
C+ 1A	1,668	C+ 3A	0,623
C- 1A	0,087	C- 3A	0,028
C+ 1B	1,428	C+ 3B	0,66
C- 1B	0,047	C- 3B	0,016
C+ 1C	1,11	C+ 3C	0,48
C- 1C	0,061	C- 3C	0,038
C+ 1D	1,134	C+ 3D	0,413
C- 1D	0,044	C- 3D	0,006
C+ 1E	0,863	C+ 3E	0,387
C- 1E	0,054	C- 3E	0,004
C+ 1F	0,68	C+ 3F	0,423
C- 1F	0,038	C- 3F	0,01
C+ 2A	0,97	C+ 4A	0,151
C- 2A	0,048	C- 4A	0,009
C+ 2B	1,051	C+ 4B	0,317
C- 2B	0,029	C- 4B	0,007
C+ 2C	0,773	C+ 4C	0,15
C- 2C	0,041	C- 4C	0,008
C+ 2D	0,618	C+ 4D	0,197
C- 2D	0,014	C- 4D	0,004
C+ 2E	0,480	C+ 4E	0,14
C- 2E	0,032	C- 4E	0,004
C+ 2F	0,490	C+ 4F	0,103
C- 2F	0,015	C- 4F	0,004

C+ = controle positivo, C- = controle negativo; 1 = soro felino na diluição 1:50, 2 = soro felino na diluição 1:100, 3 = soro felino na diluição 1:200 e 4 = soro felino na diluição 1:400; A = PTN A na diluição 1:100, B = PTN A na diluição 1:200, C = PTN A na diluição 1:400, D = PTN A na diluição 1:800, E = PTN A na diluição 1:1000 e F = PTN A na diluição 1:1200.

Apêndice B - Valores das diferenças das médias dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e proteína A peroxidase (PTN A), pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* na espécie felina. (Araçatuba-SP, 2007)

Diluição soros gatos	Diluição PTN A					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1200
1:50	1,581	1,381	1,049	1,09	0,809	0,655
1:100	0,922	1,022	0,732	0,604	0,448	0,475
1:200	0,595	0,644	0,442	0,407	0,383	0,422
1:400	0,142	0,310	0,142	0,193	0,136	0,099

Apêndice C - Densidades ópticas médias (DO), pela técnica de ELISA, dos soros controle negativos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, de gatos provenientes do município de Santos-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

Animal	DO	Animal	DO
1	0,226	28	0,062
2	0,181	29	0,249
3	0,103	30	0,22
4	0,092	31	0,233
5	0,071	32	0,165
6	0,117	33	0,08
7	0,075	34	0,186
8	0,203	35	0,159
9	0,147	36	0,12
10	0,157	37	0,209
11	0,059	38	0,131
12	0,073	39	0,149
13	0,241	40	0,24
14	0,066	41	0,202
15	0,14	42	0,176
16	0,183	43	0,088
17	0,172	44	0,048
18	0,139	45	0,162
19	0,039	46	0,107
20	0,142	47	0,06
21	0,062	48	0,055
22	0,181	49	0,045
23	0,26	50	0,226
24	0,1	51	0,233
25	0,091	52	0,085
26	0,047	53	0,054
27	0,169	54	0,114

Apêndice D - Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em preparados citológicos obtidos por punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, medula óssea (MO), baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

Animal	Linfonodo	MO	Baço	Fígado	Resultado
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	-	-	-	-	-

continua...

continuação...

Animal	Linfonodo	MO	Baço	Fígado	Resultado
31	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
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	-	-	-	-	-

continua...

continuação...

Animal	Linfonodo	MO	Baço	Fígado	Resultado
66	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-
87	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-
97	+	+	+	-	+
98	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-

continua...

continuação...

Animal	Linfonodo	MO	Baço	Fígado	Resultado
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	-	-	-	-	-
127	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	-
130	-	-	-	-	-
131	-	-	-	-	-
132	-	-	-	-	-
133	-	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-

continua...

continuação...

Animal	Linfonodo	MO	Baço	Fígado	Resultado
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	-	-	-	-	-

continua...

continuação...

Animal	Linfonodo	MO	Baço	Fígado	Resultado
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	-	-	-	-	-

Apêndice E - Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, no soro de 200 gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
1	0,154	0,17	Não Reagente	36	0,1	0,11	Não Reagente
2	0,79	0,28	Não Reagente	37	0,79	0,086	Não Reagente
3	0,031	0,032	Não Reagente	38	0,026	0,026	Não Reagente
4	0,113	0,124	Não Reagente	39	0,114	0,126	Não Reagente
5	0,135	0,149	Não Reagente	40	0,259	0,29	Não Reagente
6	0,0835	0,091	Não Reagente	41	0,313	0,165	Não Reagente
7	0,149	0,165	Não Reagente	42	0,258	0,289	Não Reagente
8	0,08	0,087	Não Reagente	43	0,286	0,32	Não Reagente
9	0,119	0,131	Não Reagente	44	0,142	0,157	Não Reagente
10	0,179	0,199	Não Reagente	45	0,295	0,33	Não Reagente
11	0,133	0,147	Não Reagente	46	0,079	0,089	Não Reagente
12	0,082	0,089	Não Reagente	47	0,056	0,062	Não Reagente
13	0,09	0,098	Não Reagente	48	0,042	0,046	Não Reagente
14	0,084	0,092	Não Reagente	49	0,003	0,0	Não Reagente
15	0,069	0,075	Não Reagente	50	0,072	0,08	Não Reagente
16	0,126	0,139	Não Reagente	51	0,052	0,057	Não Reagente
17	0,039	0,041	Não Reagente	52	0,057	0,063	Não Reagente
18	0,205	0,202	Não Reagente	53	0,029	0,03	Não Reagente
19	0,178	0,198	Não Reagente	54	0,099	0,112	Não Reagente
20	0,238	0,266	Não Reagente	55	0,069	0,077	Não Reagente
21	0,178	0,198	Não Reagente	56	0,097	0,11	Não Reagente
22	0,146	0,161	Não Reagente	57	0,056	0,061	Não Reagente
23	0,132	0,146	Não Reagente	58	0,085	0,096	Não Reagente
24	0,187	0,208	Não Reagente	59	0,046	0,024	Não Reagente
25	0,097	0,106	Não Reagente	60	1,495	1,0	Reagente
26	0,084	0,092	Não Reagente	61	0,05	0,026	Não Reagente
27	0,093	0,101	Não Reagente	62	0,219	0,14	Não Reagente
28	0,062	0,067	Não Reagente	63	0,087	0,051	Não Reagente
29	0,048	0,051	Não Reagente	64	0,129	0,08	Não Reagente
30	0,181	0,202	Não Reagente	65	0,033	0,015	Não Reagente
31	0,075	0,082	Não Reagente	66	0,03	0,012	Não Reagente
32	0,173	0,193	Não Reagente	67	0,211	0,135	Não Reagente
33	0,139	0,154	Não Reagente	68	0,102	0,06	Não Reagente
34	0,67	0,203	Não Reagente	69	0,096	0,057	Não Reagente
35	0,098	0,108	Não Reagente	70	0,013	0,001	Não Reagente

continua...

continuação...

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
71	0,566	0,207	Não Reagente	109	0,053	0,024	Não Reagente
72	0,603	0,233	Não Reagente	110	0,056	0,026	Não Reagente
73	0,044	0,022	Não Reagente	111	0,636	0,255	Não Reagente
74	0,227	0,103	Não Reagente	112	0,222	0,183	Não Reagente
75	0,097	0,058	Não Reagente	113	0,192	0,155	Não Reagente
76	0,244	0,157	Não Reagente	114	0,119	0,086	Não Reagente
77	1,016	0,513	Reagente	115	0,177	0,141	Não Reagente
78	0,44	0,257	Não Reagente	116	0,031	0,003	Não Reagente
79	0,182	0,115	Não Reagente	117	0,222	0,183	Não Reagente
80	0,149	0,093	Não Reagente	118	0,223	0,185	Não Reagente
81	0,051	0,093	Não Reagente	119	0,14	0,106	Não Reagente
82	0,089	0,053	Não Reagente	120	0,172	0,136	Não Reagente
83	1,882	1,102	Reagente	121	0,233	0,194	Não Reagente
84	0,213	0,136	Não Reagente	122	0,2	0,163	Não Reagente
85	0,13	0,108	Não Reagente	123	0,324	0,28	Não Reagente
86	0,289	0,187	Não Reagente	124	0,156	0,121	Não Reagente
87	0,251	0,162	Não Reagente	125	0,267	0,226	Não Reagente
88	0,227	0,145	Não Reagente	126	0,123	0,09	Não Reagente
89	0,057	0,031	Não Reagente	127	0,212	0,174	Não Reagente
90	0,042	0,021	Não Reagente	128	0,087	0,056	Não Reagente
91	0,101	0,06	Não Reagente	129	0,135	0,117	Não Reagente
92	0,318	0,207	Não Reagente	130	0,062	0,046	Não Reagente
93	0,144	0,09	Não Reagente	131	0,163	0,145	Não Reagente
94	0,222	0,142	Não Reagente	132	0,178	0,16	Não Reagente
95	0,016	0,003	Não Reagente	133	0,089	0,072	Não Reagente
96	0,385	0,252	Não Reagente	134	0,083	0,066	Não Reagente
97	0,153	0,096	Não Reagente	135	0,13	0,113	Não Reagente
98	0,089	0,053	Não Reagente	136	0,189	0,171	Não Reagente
99	0,16	0,1	Não Reagente	137	0,216	0,197	Não Reagente
100	0,414	0,272	Não Reagente	138	0,059	0,043	Não Reagente
101	0,734	0,487	Reagente	139	0,247	0,228	Não Reagente
102	0,14	0,087	Não Reagente	140	0,147	0,13	Não Reagente
103	1,307	0,873	Reagente	141	0,501	0,48	Reagente
104	0,218	0,139	Não Reagente	142	0,186	0,168	Não Reagente
105	0,336	0,219	Não Reagente	143	0,171	0,153	Não Reagente
106	0,397	0,26	Não Reagente	144	0,26	0,241	Não Reagente
107	0,233	0,194	Não Reagente	145	0,11	0,093	Não Reagente
108	0,116	0,084	Não Reagente	146	0,368	0,073	Não Reagente

continua...

continuação...

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
147	0,203	0,185	Não Reagente	174	0,097	NEG	Não Reagente
148	0,314	0,294	Não Reagente	175	0,453	0,32	Não Reagente
149	0,219	0,201	Não Reagente	176	0,184	NEG	Não Reagente
150	0,019	0,003	Não Reagente	177	0,35	0,193	Não Reagente
151	0,114	0,097	Não Reagente	178	0,34	0,181	Não Reagente
152	0,159	0,142	Não Reagente	179	0,017	NEG	Não Reagente
153	0,044	0,028	Não Reagente	180	0,302	0,134	Não Reagente
154	0,13	0,113	Não Reagente	181	0,247	0,067	Não Reagente
155	0,161	0,143	Não Reagente	182	0,132	NEG	Não Reagente
156	0,104	0,087	Não Reagente	183	0,288	0,116	Não Reagente
157	0,153	0,136	Não Reagente	184	0,268	0,092	Não Reagente
158	0,128	0,11	Não Reagente	185	0,3045	0,03	Não Reagente
159	0,176	0,158	Não Reagente	186	0,294	0,022	Não Reagente
160	0,232	0,213	Não Reagente	187	0,238	0,055	Não Reagente
161	0,445	0,237	Não Reagente	188	0,239	0,056	Não Reagente
162	0,166	0,011	Não Reagente	189	0,315	0,15	Não Reagente
163	0,195	0,044	Não Reagente	190	0,245	0,064	Não Reagente
164	0,164	0,009	Não Reagente	191	0,279	0,013	Não Reagente
165	0,155	NEG	Não Reagente	192	0,285	0,017	Não Reagente
166	0,148	NEG	Não Reagente	193	0,164	NEG	Não Reagente
167	0,078	NEG	Não Reagente	194	0,102	NEG	Não Reagente
168	0,15	NEG	Não Reagente	195	0,203	0,012	Não Reagente
169	0,096	NEG	Não Reagente	196	0,472	0,144	Não Reagente
170	0,026	NEG	Não Reagente	197	0,206	0,016	Não Reagente
171	0,057	NEG	Não Reagente	198	0,319	0,04	Não Reagente
172	0,033	NEG	Não Reagente	199	0,358	0,203	Não Reagente
173	0,065	NEG	Não Reagente	200	0,409	0,1	Não Reagente

NEG = negativa.

Apêndice F - Títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, obtidos por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, no soro de 200 gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2007)

Animal	Título	Resultado	Animal	Título	Resultado
1	< 1:40	Não Reagente	36	< 1:40	Não Reagente
2	< 1:40	Não Reagente	37	< 1:40	Não Reagente
3	< 1:40	Não Reagente	38	< 1:40	Não Reagente
4	< 1:40	Não Reagente	39	< 1:40	Não Reagente
5	< 1:40	Não Reagente	40	< 1:40	Não Reagente
6	< 1:40	Não Reagente	41	< 1:40	Não Reagente
7	< 1:40	Não Reagente	42	< 1:40	Não Reagente
8	< 1:40	Não Reagente	43	< 1:40	Não Reagente
9	< 1:40	Não Reagente	44	< 1:40	Não Reagente
10	< 1:40	Não Reagente	45	< 1:40	Não Reagente
11	< 1:40	Não Reagente	46	< 1:40	Não Reagente
12	< 1:40	Não Reagente	47	< 1:40	Não Reagente
13	< 1:40	Não Reagente	48	< 1:40	Não Reagente
14	< 1:40	Não Reagente	49	< 1:40	Não Reagente
15	< 1:40	Não Reagente	50	< 1:40	Não Reagente
16	< 1:40	Não Reagente	51	< 1:40	Não Reagente
17	< 1:40	Não Reagente	52	< 1:40	Não Reagente
18	< 1:40	Não Reagente	53	< 1:40	Não Reagente
19	< 1:40	Não Reagente	54	< 1:40	Não Reagente
20	< 1:40	Não Reagente	55	< 1:40	Não Reagente
21	< 1:40	Não Reagente	56	< 1:40	Não Reagente
22	< 1:40	Não Reagente	57	< 1:40	Não Reagente
23	< 1:40	Não Reagente	58	< 1:40	Não Reagente
24	< 1:40	Não Reagente	59	< 1:40	Não Reagente
25	< 1:40	Não Reagente	60	1:160	Reagente
26	< 1:40	Não Reagente	61	< 1:40	Não Reagente
27	< 1:40	Não Reagente	62	< 1:40	Não Reagente
28	< 1:40	Não Reagente	63	< 1:40	Não Reagente
29	< 1:40	Não Reagente	64	< 1:40	Não Reagente
30	< 1:40	Não Reagente	65	< 1:40	Não Reagente
31	< 1:40	Não Reagente	66	< 1:40	Não Reagente
32	< 1:40	Não Reagente	67	< 1:40	Não Reagente
33	< 1:40	Não Reagente	68	< 1:40	Não Reagente
34	< 1:40	Não Reagente	69	< 1:40	Não Reagente
35	< 1:40	Não Reagente	70	< 1:40	Não Reagente

continua...

continuação...

Animal	Título	Resultado	Animal	Título	Resultado
71	< 1:40	Não Reagente	109	< 1:40	Não Reagente
72	< 1:40	Não Reagente	110	< 1:40	Não Reagente
73	< 1:40	Não Reagente	111	< 1:40	Não Reagente
74	< 1:40	Não Reagente	112	< 1:40	Não Reagente
75	< 1:40	Não Reagente	113	< 1:40	Não Reagente
76	< 1:40	Não Reagente	114	< 1:40	Não Reagente
77	< 1:40	Não Reagente	115	< 1:40	Não Reagente
78	< 1:40	Não Reagente	116	< 1:40	Não Reagente
79	< 1:40	Não Reagente	117	< 1:40	Não Reagente
80	< 1:40	Não Reagente	118	< 1:40	Não Reagente
81	< 1:40	Não Reagente	119	< 1:40	Não Reagente
82	< 1:40	Não Reagente	120	< 1:40	Não Reagente
83	< 1:40	Não Reagente	121	< 1:40	Não Reagente
84	< 1:40	Não Reagente	122	< 1:40	Não Reagente
85	< 1:40	Não Reagente	123	< 1:40	Não Reagente
86	< 1:40	Não Reagente	124	< 1:40	Não Reagente
87	< 1:40	Não Reagente	125	< 1:40	Não Reagente
88	< 1:40	Não Reagente	126	< 1:40	Não Reagente
89	< 1:40	Não Reagente	127	< 1:40	Não Reagente
90	< 1:40	Não Reagente	128	< 1:40	Não Reagente
91	< 1:40	Não Reagente	129	< 1:40	Não Reagente
92	< 1:40	Não Reagente	130	< 1:40	Não Reagente
93	< 1:40	Não Reagente	131	< 1:40	Não Reagente
94	< 1:40	Não Reagente	132	< 1:40	Não Reagente
95	< 1:40	Não Reagente	133	< 1:40	Não Reagente
96	< 1:40	Não Reagente	134	< 1:40	Não Reagente
97	< 1:40	Não Reagente	135	< 1:40	Não Reagente
98	< 1:40	Não Reagente	136	< 1:40	Não Reagente
99	< 1:40	Não Reagente	137	< 1:40	Não Reagente
100	< 1:40	Não Reagente	138	< 1:40	Não Reagente
101	< 1:40	Não Reagente	139	< 1:40	Não Reagente
102	< 1:40	Não Reagente	140	< 1:40	Não Reagente
103	< 1:40	Não Reagente	141	< 1:40	Não Reagente
104	< 1:40	Não Reagente	142	< 1:40	Não Reagente
105	< 1:40	Não Reagente	143	< 1:40	Não Reagente
106	< 1:40	Não Reagente	144	< 1:40	Não Reagente
107	< 1:40	Não Reagente	145	< 1:40	Não Reagente
108	< 1:40	Não Reagente	146	< 1:40	Não Reagente

continua...

continuação...

Animal	Título	Resultado	Animal	Título	Resultado
147	< 1:40	Não Reagente	174	< 1:40	Não Reagente
148	< 1:40	Não Reagente	175	< 1:40	Não Reagente
149	< 1:40	Não Reagente	176	< 1:40	Não Reagente
150	< 1:40	Não Reagente	177	< 1:40	Não Reagente
151	< 1:40	Não Reagente	178	< 1:40	Não Reagente
152	< 1:40	Não Reagente	179	< 1:40	Não Reagente
153	< 1:40	Não Reagente	180	< 1:40	Não Reagente
154	< 1:40	Não Reagente	181	< 1:40	Não Reagente
155	< 1:40	Não Reagente	182	< 1:40	Não Reagente
156	< 1:40	Não Reagente	183	< 1:40	Não Reagente
157	< 1:40	Não Reagente	184	< 1:40	Não Reagente
158	< 1:40	Não Reagente	185	< 1:40	Não Reagente
159	< 1:40	Não Reagente	186	< 1:40	Não Reagente
160	< 1:40	Não Reagente	187	< 1:40	Não Reagente
161	< 1:40	Não Reagente	188	< 1:40	Não Reagente
162	< 1:40	Não Reagente	189	< 1:40	Não Reagente
163	< 1:40	Não Reagente	190	< 1:40	Não Reagente
164	< 1:40	Não Reagente	191	< 1:40	Não Reagente
165	< 1:40	Não Reagente	192	< 1:40	Não Reagente
166	< 1:40	Não Reagente	193	< 1:40	Não Reagente
167	< 1:40	Não Reagente	194	< 1:40	Não Reagente
168	< 1:40	Não Reagente	195	< 1:40	Não Reagente
169	< 1:40	Não Reagente	196	< 1:40	Não Reagente
170	< 1:40	Não Reagente	197	< 1:40	Não Reagente
171	< 1:40	Não Reagente	198	< 1:40	Não Reagente
172	< 1:40	Não Reagente	199	< 1:40	Não Reagente
173	< 1:40	Não Reagente	200	< 1:40	Não Reagente

Apêndice G - Resultados individuais da pesquisa de leishmaniose em 200 gatos provenientes do município de Araçatuba-SP, obtidos pelos métodos parasitológico direto, ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). (Araçatuba-SP, 2007)

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo	Negativo

continua...

continuação...

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI
36	Negativo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Negativo
41	Negativo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	Negativo
60	Positivo	Positivo	Positivo
61	Negativo	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo	Negativo
66	Negativo	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo	Negativo
71	Negativo	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo	Negativo
73	Negativo	Negativo	Negativo

continua...

continuação...

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI
74	Negativo	Negativo	Negativo
75	Negativo	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo	Negativo
77	Negativo	Positivo	Negativo
78	Negativo	Negativo	Negativo
79	Negativo	Negativo	Negativo
80	Negativo	Negativo	Negativo
81	Negativo	Negativo	Negativo
82	Negativo	Negativo	Negativo
83	Negativo	Positivo	Negativo
84	Negativo	Negativo	Negativo
85	Negativo	Negativo	Negativo
86	Negativo	Negativo	Negativo
87	Negativo	Negativo	Negativo
88	Negativo	Negativo	Negativo
89	Negativo	Negativo	Negativo
90	Negativo	Negativo	Negativo
91	Negativo	Negativo	Negativo
92	Negativo	Negativo	Negativo
93	Negativo	Negativo	Negativo
94	Negativo	Negativo	Negativo
95	Negativo	Negativo	Negativo
96	Negativo	Negativo	Negativo
97	Positivo	Negativo	Negativo
98	Negativo	Negativo	Negativo
99	Negativo	Negativo	Negativo
100	Negativo	Negativo	Negativo
101	Negativo	Positivo	Negativo
102	Negativo	Negativo	Negativo
103	Negativo	Positivo	Negativo
104	Negativo	Negativo	Negativo
105	Positivo	Negativo	Negativo
106	Negativo	Negativo	Negativo
107	Negativo	Negativo	Negativo
108	Negativo	Negativo	Negativo
109	Negativo	Negativo	Negativo
110	Negativo	Negativo	Negativo
111	Negativo	Negativo	Negativo

continua...

continuação...

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI
112	Negativo	Negativo	Negativo
113	Negativo	Negativo	Negativo
114	Negativo	Negativo	Negativo
115	Negativo	Negativo	Negativo
116	Negativo	Negativo	Negativo
117	Negativo	Negativo	Negativo
118	Negativo	Negativo	Negativo
119	Negativo	Negativo	Negativo
120	Negativo	Negativo	Negativo
121	Negativo	Negativo	Negativo
122	Negativo	Negativo	Negativo
123	Negativo	Negativo	Negativo
124	Negativo	Negativo	Negativo
125	Negativo	Negativo	Negativo
126	Negativo	Negativo	Negativo
127	Negativo	Negativo	Negativo
128	Negativo	Negativo	Negativo
129	Negativo	Negativo	Negativo
130	Negativo	Negativo	Negativo
131	Negativo	Negativo	Negativo
132	Negativo	Negativo	Negativo
133	Negativo	Negativo	Negativo
134	Negativo	Negativo	Negativo
135	Negativo	Negativo	Negativo
136	Negativo	Negativo	Negativo
137	Negativo	Negativo	Negativo
138	Negativo	Negativo	Negativo
139	Negativo	Negativo	Negativo
140	Negativo	Negativo	Negativo
141	Negativo	Positivo	Negativo
142	Negativo	Negativo	Negativo
143	Negativo	Negativo	Negativo
144	Negativo	Negativo	Negativo
145	Negativo	Negativo	Negativo
146	Negativo	Negativo	Negativo
147	Negativo	Negativo	Negativo
148	Positivo	Negativo	Negativo
149	Negativo	Negativo	Negativo

continua...

continuação...

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI
150	Negativo	Negativo	Negativo
151	Negativo	Negativo	Negativo
152	Negativo	Negativo	Negativo
153	Positivo	Negativo	Negativo
154	Negativo	Negativo	Negativo
155	Negativo	Negativo	Negativo
156	Negativo	Negativo	Negativo
157	Negativo	Negativo	Negativo
158	Negativo	Negativo	Negativo
159	Negativo	Negativo	Negativo
160	Negativo	Negativo	Negativo
161	Negativo	Negativo	Negativo
162	Negativo	Negativo	Negativo
163	Negativo	Negativo	Negativo
164	Positivo	Negativo	Negativo
165	Negativo	Negativo	Negativo
166	Negativo	Negativo	Negativo
167	Negativo	Negativo	Negativo
168	Negativo	Negativo	Negativo
169	Negativo	Negativo	Negativo
170	Negativo	Negativo	Negativo
171	Negativo	Negativo	Negativo
172	Negativo	Negativo	Negativo
173	Negativo	Negativo	Negativo
174	Negativo	Negativo	Negativo
175	Negativo	Negativo	Negativo
176	Negativo	Negativo	Negativo
177	Negativo	Negativo	Negativo
178	Negativo	Negativo	Negativo
179	Negativo	Negativo	Negativo
180	Negativo	Negativo	Negativo
181	Negativo	Negativo	Negativo
182	Negativo	Negativo	Negativo
183	Negativo	Negativo	Negativo
184	Negativo	Negativo	Negativo
185	Negativo	Negativo	Negativo
186	Negativo	Negativo	Negativo
187	Negativo	Negativo	Negativo

continua...

continuação...

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI
188	Negativo	Negativo	Negativo
189	Negativo	Negativo	Negativo
190	Negativo	Negativo	Negativo
191	Negativo	Negativo	Negativo
192	Negativo	Negativo	Negativo
193	Negativo	Negativo	Negativo
194	Negativo	Negativo	Negativo
195	Positivo	Negativo	Negativo
196	Negativo	Negativo	Negativo
197	Negativo	Negativo	Negativo
198	Negativo	Negativo	Negativo
199	Positivo	Negativo	Negativo
200	Negativo	Negativo	Negativo