

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

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DAS ARTICULAÇÕES
DOS MEMBROS LOCOMOTORES DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL NO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA-SP

Alexandre Redson Soares da Silva

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2009

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

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DAS ARTICULAÇÕES
DOS MEMBROS LOCOMOTORES DE CÃES
NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE
VISCERAL NO MUNICÍPIO DE ARAÇATUBA-SP

Alexandre Redson Soares da Silva

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Clínica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2009

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

S586i Silva, Alexandre Redson Soares da
Avaliação radiográfica das articulações dos membros locomotores de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP / Alexandre Redson Soares da Silva. - Araçatuba : [s.n.], 2009
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009
Orientador: Prof. Paulo César Ciarlini
Coorientador: Profa. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini

1. Artrocentese 2. Radiografia 3. Leishmania chagasi
4. Líquido sinovial 5. Poliartrite 6. Zoonose

CDD 636.0896

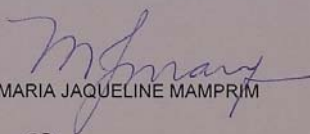
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

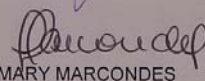
TÍTULO: Avaliação radiográfica das articulações dos membros locomotores de cães naturalmente acometidos por Leishmaniose visceral no município de Araçatuba-SP.

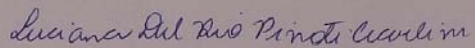
AUTOR: ALEXANDRE REDSON SOARES DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. PAULO CESAR CIARLINI

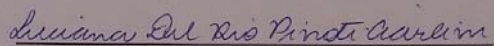
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr.ª MARIA JAQUELINE MAMPRIM


Dr.ª MARY MARCONDES


Dr.ª LUCIANA DEL RIO PINOTI CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 24 de agosto de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª LUCIANA DEL RIO PINOTI CIARLINI
- Co-Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Alexandre Redson Soares da Silva – natural de João Pessoa – PB, nascido aos 28 de junho de 1976; graduado em Medicina Veterinária, em maio de 2004, pela Universidade Federal de Campina Grande – *campus* de Patos, sob a orientação do Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto. Durante o período acadêmico desenvolveu atividades relacionadas à iniciação à docência como monitoria. Realizou especialização em Residência Médico Veterinária, com área de concentração em Radiologia Veterinária, durante o período de fevereiro de 2005 a janeiro de 2007, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – *campus* de Araçatuba, sob a orientação da Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini. Atuou, durante o período de residência, como membro suplente, representante dos médicos veterinários, junto ao Conselho de Residência em Medicina Veterinária do Programa de Residência Médico Veterinária, de fevereiro de 2005 a janeiro de 2006 e como membro titular, representante dos médicos veterinários, junto ao Conselho Deliberativo do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” – UNESP – *campus* de Araçatuba, de abril de 2006 a abril de 2007. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, da UNESP – *campus* de Araçatuba, em março de 2007, sob orientação do Prof. Dr. Paulo César Ciarlini e co-orientação da Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini, tendo sido classificado como primeiro aluno da turma. Foi contemplado com bolsa do Programa Institucional de Bolsas concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) a alunos de Pós-graduação. Atuou, durante o período de março a dezembro de 2007, como professor voluntário da Disciplina de Radiologia Veterinária, do Curso de Graduação em Medicina Veterinária e como membro titular, representante dos discentes, junto ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNESP – *campus* de Araçatuba, de junho de 2007 a março de 2008.

Algumas inverdades sobre os animais:

INFIÉIS,
INIMIGOS,
INGRATOS,
INSENSÍVEIS,
INDIFERENTES,
INDIVIDUALISTAS.

E um **"IN"** que explica tudo isso:

INCOMPREENDIDOS.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... aos meus pais, Edson e Mauricélia,

Por tudo que representam para mim, pelo amor, educação, incentivo e esforço,
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 por existirem em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pela oportunidade desta vida, colegas, amigos, docentes e todas as pessoas ao meu redor que de forma direta ou indireta fazem parte dela.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – *campus* de Araçatuba e ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, pelo ensejo da realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” – UNESP – *campus* de Araçatuba, pela disponibilidade de conceder instalações e equipamentos para realização da parte experimental.

Ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba – SP, pela permissão da colheita de materiais, em especial ao Dr. Morgado e o Sr. Júlio.

Aos médicos veterinários residentes Monally Conceição Costa de Aquino, Vanessa Borges Costa Ferreira, Breno Fernando Martins de Almeida e Carolina Soares Soeiro, do Setor de Laboratório Clínico do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” – UNESP – *campus* de Araçatuba, pela colaboração de parte experimental.

Aos médicos veterinários pós-graduandos Ana Amélia Domingues Gomes e Rafael Felipe da Costa Vieira, pela colaboração de parte experimental.

Aos funcionários da UNESP – *campus* de Araçatuba em especial a Beatriz Helena da Costa Cardoso, da Farmácia do HV, Diogo Reatto e Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, da Seção de Pós-graduação e Almir Aparecido Spinosa Lemos, do Laboratório de Imunologia por toda ajuda sempre dispensada.

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

Aos docentes Prof. Dr. Paulo César Ciarlini e Profa. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim, por terem permitido a utilização do Laboratório Clínico Veterinário, pela colaboração e orientações.

Ao Prof. Dr. Sérgio Diniz Garcia, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, pela amizade e por ter cedido as dependências do Setor de Clínica de Animais Silvestres para a realização da parte experimental.

Aos Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira e Profa. Dra. Mary Marcondes, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, pela amizade e auxílio na realização da parte experimental.

À Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, pela ajuda essencial na elaboração da análise estatística.

À Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, pela realização da técnica de ELISA para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

À Profa. Dra. Juliana Regina Peiró e à Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

À Profa. Dra. Mary Marcondes, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, por toda ajuda, dedicação, orientações, broncas e sincera amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, pela orientação, paciência e dedicação.

Em especial à Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini, pela oportunidade, confiança, paciência, dedicação, ensinamentos e co-orientação.

Aos amigos de república Claudio Nazaretian Rossi, Thiago André Carreo Costa, Rômulo Godik Antunes, Ana Amélia Domingues Gomes e Monally Conceição Costa de Aquino, pelo ambiente tranquilo e familiar nesses anos de agradável convivência.

Aos parentes, amigos, estagiários, residentes, pós-graduandos e docentes que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir este projeto.

À Profa. Dra. Luciana Del Rio Pinoti Ciarlini, Profa. Dra. Mary Marcondes, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP – *campus* de Araçatuba, e à Profa. Dra. Maria Jaqueline Mamprim, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – UNESP, pelas sugestões na Prova de Julgamento de Dissertação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

Novamente à minha amiga e noiva Ana Amélia Domingues Gomes pelo companheirismo, cumplicidade, amor, carinho e dedicação em todos os momentos compartilhados.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
I – INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	3
III – MATERIAL E MÉTODO.....	15
III.I - Ética animal.....	15
III.II - Local e tempo de execução.....	15
III.III - Animais utilizados.....	15
III.IV - Colheita de sangue total.....	17
III.V - Diagnóstico da leishmaniose visceral.....	17
III. V. I - Exame citológico de linfonodo.....	17
III.V.II - Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> no soro através da técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)....	18
III.VI - Exames radiográficos.....	19
III.VII - Exame do líquido sinovial.....	21
III.VIII - Teste de imunoensaio enzimático para a detecção de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> e anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	23
III. IX - Análise estatística.....	24
IV – RESULTADOS.....	25
V – DISCUSSÃO.....	33
VI – CONCLUSÃO.....	38
VII - REFERÊNCIAS.....	39
VIII – APÊNDICES.....	56

VIII.I – Apêndice A - Densidades ópticas médias (DO), obtidas por meio da técnica de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> , no soro de 154 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba - SP. (Araçatuba - SP, 2009).....	57
VIII.I – Apêndice B - Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. em preparados citológicos obtidos por citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo de 154 cães provenientes do município de Araçatuba - SP. (Araçatuba - SP, 2009).....	59
VIII.I – Apêndice C - Resultados individuais para a pesquisa de leishmaniose visceral em preparados citológicos obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo e sorologia por meio da técnica de ELISA em 154 cães provenientes do município de Araçatuba – SP. (Araçatuba – SP, 2009).....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Unidade radiológica fixa do Setor de Radiologia Veterinária do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do Curso de Medicina Veterinária – UNESP, *campus* de Araçatuba, utilizada nos exames de radiográficos: marca CRX – modelo SHF 730 – 500 mA / 150 kVp / tempo de exposição de 0,05 a 5 segundos (s) (**A**) e equipado com grade antidifusora Potter-Bucky (**B**). (Araçatuba – SP, 2009)..... **19**
- Figura 2** Posicionamentos radiográficos adotados conforme a articulação em estudo: úmero-rádio-ulnar (A e C) e fêmuro-tíbio-fibular (B e D) incidências craniocaudal (CrCa) e mediolateral (ML); rádio-cárpica-metacárpica (A e C) projeções dorsopalmar (DPa) e ML e para a articulação tibio-társica-metatársica (B e D) incidências dorsoplantar (DPI) e ML. (Araçatuba – SP, 2009)..... **20**
- Figura 3** Câmara escura (sala revelação): chassi metálico 24x30 cm (seta azul) e identificador radiográfico eletrônico (seta verde) (A). Processadora automática para filmes radiográficos (B). (Araçatuba – SP, 2009)..... **21**
- Figura 4** Palpação das articulações para realização da artrocentese: úmero-rádio-ulnar (**A**), rádio-cárpica-metacárpica (**B**), fêmuro-tíbio-fibular (**C**) e tibio-társica-metatársica (**D**). (Araçatuba – SP, 2009)..... **22**
- Figura 5** Demonstração da realização da punção articular rádio-cárpica-metacárpica (**A**) e amostra colhida de líquido sinovial (**B**). (Araçatuba – SP, 2009)..... **22**
- Figura 6** Kit sorológico SNAP® 3DX™ para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi*. (Araçatuba – SP, 2009)..... **24**

- Figura 7** Resultados obtidos pelo kit sorológico SNAP® 3DX™ para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi*. Resultados negativo (A) e positivo para erliquiose canina (B). (Araçatuba – SP, 2009)..... 24
- Figura 8** Distribuição (%), segundo a faixa etária em meses, de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. (Araçatuba – SP, 2009)..... 25
- Figura 9** Distribuição em número, segundo a raça, de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. (Araçatuba – SP, 2009)..... 26
- Figura 10** Freqüência (%) do envolvimento articular observada nos exames radiológicos de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Onde URUD representa a articulação úmero-rádio-ulnar direita, RCMD a articulação rádio-cárpica-metacárpica direita, FTFD a articulação fêmuro-tíbio-fibular direita, TTMD a articulação tíbio-társica-metatársica direita, URUE a articulação úmero-rádio-ulnar esquerda, RCME a articulação rádio-cárpica-metacárpica esquerda, FTFE a articulação fêmuro-tíbio-fibular esquerda e TTME a articulação tíbio-társica-metatársica esquerda. (Araçatuba – SP, 2009)..... 27
- Figura 11** Radiografias das articulações locomotoras distais de cão acometido por leishmaniose visceral, com sinais radiográficos compatíveis com artrite. Visualização do trabeculado ósseo grosseiro (seta branca), esclerose subcondral (seta verde), colapso articular (seta vermelha), osteólise (seta amarela) e osteólise associada à proliferação óssea (seta azul). (Araçatuba – SP, 2009)..... 29

- Figura 12** Frequência (%) dos achados radiográficos observados em articulações de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. (Araçatuba – SP, 2009)..... **29**
- Figura 13** Frequência (%) dos envoltimentos articulares observadas nos exames citológicos do líquido sinovial, de 55 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e negativos para erliquiose canina. (Araçatuba – SP, 2009)..... **30**
- Figura 14** Frequências (%) dos envoltimentos articulares observadas nos exames citológicos do líquido sinovial, de 45 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e positivos para erliquiose canina. (Araçatuba – SP, 2009)..... **31**
- Figura 15** Avaliação citológica de líquido sinovial de cão acometido por leishmaniose visceral. Imagens com intensa neutrofilia (seta vermelha), linfócitos (seta verde), macrófago (seta preta) fagocitando forma amastigota de *Leishmania* sp. (seta azul), coloração panótica, aumento de 400X (A) e 1000X (B). (Araçatuba – SP, 2009) **32**

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DAS ARTICULAÇÕES DOS MEMBROS
LOCOMOTORES DE CÃES NATURALMENTE NATURALMENTE
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE
ARAÇATUBA-SP**

RESUMO – A leishmaniose visceral pode ser incluída como uma das causas de poliartrite inflamatória em cães, entretanto, são escassas e contraditórias as informações sobre as lesões osteoarticulares associadas a esta enfermidade. Partindo-se da hipótese de que cães infectados por *Leishmania chagasi* apresentam distúrbios locomotores, investigou-se a frequência, distribuição e caracterização dos achados radiográficos e do líquido sinovial das articulações do cotovelo, cárpica, joelho e társica, de 100 cães com o diagnóstico parasitológico e sorológico positivo para leishmaniose visceral. Radiograficamente observou-se a presença de lesões osteoarticulares em 83% dos cães, tais como, irregularidade do trabeculado ósseo (28,62%), esclerose subcondral (20,77%), osteólise (18,12%), edema (12,93%), colapso articular (12,71%), osteólise e proliferação óssea associada (3,98%), proliferação óssea (2,65%), aumento de opacidade medular e fratura patológica (0,11%) respectivamente, sendo as articulações társicas (75%) e cárpicas (54%) as mais acometidas. A avaliação citológica foi realizada em 603 de 800 articulações estudadas, onde 199 apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* sp., enquanto 405 tinham ausência do parasito e 196 estavam contaminadas com sangue ou com material insuficiente para análise. A maioria das amostras de líquido sinovial apresentou alteração na contagem diferencial das células, sendo, o aumento do número de células mononucleares ativadas e neutrófilos o achado mais comumente encontrado. Os resultados obtidos permitiram concluir que cães com leishmaniose visceral apresentam lesões articulares com distribuição difusa, com maior acometimento das articulações distais e ausência de sinais radiográficos patognomônicos, e que se faz necessária a avaliação do líquido sinovial para auxiliar no diagnóstico diferencial das artropatias em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina.

Palavras-Chave – artrocentese, radiografia, *Leishmania chagasi*, líquido sinovial, poliartrite, zoonose

RADIOGRAPHIC EVALUATION OF THE JOINTS OF MEMBERS OF DOGS LOCOMOTOR NATURALLY INFECTED BY VISCERAL LEISHMANIASIS IN ARAÇATUBA-SP

SUMMARY - Visceral leishmaniasis can be included as a cause of dog inflammatory polyarthritis, however there is few and contradictory informations about osteoarticular lesions associated with this disease. Based from the hypothesis that dogs infected by *Leishmania chagasi* present locomotor disturbances, the frequency, distribution and characterization of radiographic findings and synovial fluid of elbow, carpus, knee and tarsus articulations from 100 dogs with positive parasitologic and serologic diagnosis for visceral leishmaniasis were studied. The presence of osteoarticular lesions were radiographically observed in 83 per cent of the dogs, and characterized by trabecular bone irregularity (28.62%), subchondral sclerosis (20.77%), osteolysis (18.12%), edema (12.93%), articular collapse (12.71%), association of osteolysis and bone proliferation (3.98%), periosteal proliferative reaction (2.65%), increased medullar opacity and pathologic fracture (0.11%). The most affected articulations were the tarsus (75%) and carpus (54%). The citologic assessment was realized on 603 of 800 studied articulations, whit 199 presenting amastigote forms of *Leishmania* sp., while 405 had no parasites and 196 were contaminated with blood or had insufficient sample. The most of synovial fluid samples showed a change differential cell counting alterations, with high number of activated mononuclear cells and neutrophils being the common findings. The results allowed to conclude that dogs affected by visceral leishmaniasis presented lesions joint with diffuse distribution, with more distal articulations involvement and absence of pathognomonic radiographic signs, and that is needed to asses the synovial fluid to assist in differential diagnosis of arthropathy in areas endemic for canine visceral leishmaniasis.

Keywords – arthrocentesis, radiography, *Leishmania chagasi*, synovial fluid, polyarthritis, zoonoses

I. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são descritas em 88 países dos cinco continentes, sendo endêmicas em regiões tropicais e subtropicais. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco da infecção, demonstrando sua importância pelo impacto que produzem em saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e implicações econômicas (DESJEUX, 2004; GRAMICCIA & GRADONI, 2005). Existem aproximadamente 14 milhões de pessoas infectadas pelas diferentes formas clínicas da enfermidade em todo mundo. Mundialmente a incidência anual é de aproximadamente dois milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) e cerca de 500.000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2000; WHO, 2006).

O Brasil é responsável por 90% dos casos de leishmaniose visceral humana no continente americano, sendo que, dos 27 estados brasileiros, 21 já apresentam casos notificados da doença. Sua ocorrência vem aumentando no país, não só em número de casos, mas também na sua dispersão geográfica, sendo endêmica em vários estados brasileiros (SÃO PAULO, 2003).

O primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) no estado de São Paulo foi diagnosticado em maio de 1998, no município de Araçatuba, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. A partir de então foram notificados novos casos em outros 54 municípios do estado (SÃO PAULO, 2003). Cerca de um ano após a identificação do primeiro caso canino, foi revelada, em abril de 1999, a primeira notificação da doença em seres humanos. Segundo dados da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, já foram descritos 1.431 casos humanos, com 122 óbitos. No município de Araçatuba, 294 casos, com 27 óbitos (SÃO PAULO, 2003).

As manifestações clínicas da leishmaniose visceral variam de acordo com a patogenicidade do parasita, que difere entre as espécies, e com as respostas imunológicas celulares geneticamente determinadas. Não há concordância entre os autores quanto ao envolvimento clínico do sistema

locomotor, de modo que os distúrbios ortopédicos têm sido descritos por alguns autores como incomuns em cães com leishmaniose visceral (KONTOS & KOUTINAS, 1993), enquanto outros autores relatam que cerca de 30% (TURREL & POOL, 1982; SLAPPENDEL, 1988) e 44,8% dos animais acometidos (AGUT et al., 2003) apresentam alteração locomotora.

São também escassas e contraditórias as informações sobre as lesões osteoarticulares associadas a esta doença. Spreng (1993) e Koutinas et al. (1999) relataram que a poliartrite por LV é do tipo não-erosiva, enquanto Wolschrin et al. (1996), Koutinas et al. (1999), Blavier et al. (2001), McConkey et al. (2002) e Agut et al. (2003) afirmaram ser do tipo erosiva. Também chamam a atenção alguns relatos de literatura, onde os pacientes acometidos pela doença, apresentando quadros de artrite ou poliartrite, não apresentavam alterações radiográficas ósseas dignas de nota (SPRENG, 1993; FEITOSA et al., 2000; JACQUES et al., 2002; EUGÊNIO et al., 2008; PARABONI et al., 2008).

Não há concordância também quanto à etiopatogenia das lesões na LV. Alguns acreditam que a poliartrite induzida por *Leishmania* sp. é decorrente de uma reação inflamatória granulomatosa (FERRER, 1992; MCCONKEY et al., 2002) e outros que é devida ao depósito de imunocomplexos circulantes na sinóvia (CUCINOTTA et al., 1991; FERRER, 1992).

A fim de preencher esta lacuna de conhecimento e contribuir para o melhor entendimento dos distúrbios locomotores em cães acometidos por leishmaniose visceral, investigou-se a frequência, distribuição e caracterização dos achados radiográficos e do líquido sinovial das articulações do cotovelo, rádio-cárpica-metacárpica, do joelho e tíbio-társica-metatársica de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma zoonose, endêmica em 88 países do mundo, e cerca de 350 milhões de pessoas são expostas ao risco da infecção. Estima-se que 14 milhões de pessoas estão infectadas, e a cada ano ocorre cerca de dois milhões de novos casos. A doença contribui significativamente para a propagação da pobreza, pois o tratamento é caro e nem sempre acessível, fazendo com que a mesma seja considerada importante pelo impacto que produz em saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e implicações econômicas, constituindo um sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho (DESJEUX, 2004; GRAMICCIA & GRADONI, 2005; WHO, 2006).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma enfermidade de caráter crônico, zoonótico e de distribuição mundial, causada por um protozoário pleomórfico do gênero *Leishmania* sp., pertencente à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae (ROSS, 1903). A espécie envolvida com a infecção depende da região geográfica, sendo a *Leishmania (leishmania) donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *Leishmania (leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África, e a *Leishmania (leishmania) chagasi* nas Américas (LAVERAN & MESNIL, 1903; ROSS, 1903; NICOLE, 1908; CUNHA & CHAGAS, 1937; LAINSON & SHAW, 1987).

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/chagasi* o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999; JERONIMO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006).

Classicamente a leishmania é subdividida em duas formas, quais sejam a que causa a leishmaniose tegumentar (LT), que apresenta manifestações cutâneas, muco-cutâneas, cutâneas difusas e disseminadas e a que causa a

LV, com manifestações sistêmicas e por vezes cutâneas (RIBEIRO, 1997; REY, 2001; BANETH, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

A primeira observação dos parasitos foi descrita por Cunningham, em 1855, na Índia (MICHALICK & GENARO, 2007). Em 1903, o agente etiológico foi relatado quase simultaneamente por Willian Leishman e Charles Donovan (DONOVAN, 1903). Ainda em 1903, em estudos na Índia, Laveran e Mesnil consideraram que o parasito associado ao Calazar indiano fosse um piroplasma, denominando-o de *Piroplasma donovani*. Ross, nesse mesmo ano, criou o gênero *Leishmania*, redenominando como *Leishmania donovani* o agente etiológico da LV.

Nas Américas, a primodescrição da doença data de 1913, quando Migone, em Assunção (Paraguai) descreve o primeiro caso autóctone em seres humano, observando a presença de “corpúsculos”, semelhantes ao da *Leishmania* sp., no sangue de um paciente. Tal paciente, de nacionalidade paraguaia, trabalhava na construção da estrada de ferro São Paulo-Corumbá e, após ter se deslocado para essas regiões desenvolveu quadro clínico característico da LV, sendo, no entanto, submetido a tratamento para malária, e vindo a óbito (MIGONE, 1973).

No Brasil os primeiros possíveis relatos datam de 1911 quando Carlos Chagas suspeitou da ocorrência dessa doença na região por onde percorria o rio Amazonas (CUNHA & CHAGAS, 1937). Em 1934, Penna, ao pesquisar a febre amarela no município de Salvador, Bahia, examinando 47.000 lâminas de viscerotomias, detectou 41 casos positivos de leishmaniose visceral americana em preparados histológicos de fígado (MICHALIK & GENARO, 2007). Posteriormente, através de estudos sobre a morfologia do parasito, bem como a sua patogênese, foi sugerido tratar-se de uma nova espécie do gênero *Leishmania*, denominada então de *Leishmania chagasi*, em homenagem a Carlos Chagas (CUNHA & CHAGAS, 1937).

Em 1936 Evandro Chagas realizou, por meio de punção esplênica, o primeiro diagnóstico *in vivo* da doença e também apontou a *Lutzomyia longipalpis* como provável vetor da LV no Brasil (CUNHA & CHAGAS, 1937; BRASIL, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

O ciclo da *Leishmania chagasi*, principal agente etiológico da leishmaniose no Brasil (GONTIJO & MELO, 2004), ocorre em dois hospedeiros: o vetor e os hospedeiros vertebrados. O vetor é representado por insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos, tendo como principal representante no país a *Lutzomyia longipalpis*, embora mais recentemente a *Lutzomyia cruzi* também tenha sido incriminada como vetor no Estado do Mato Grosso do Sul e a *Lutzomyia intermédia* no litoral do município do Rio de Janeiro. O hospedeiro vertebrado é representado pelo homem, por mamíferos domésticos ou selvagens (GONTIJO & MELO, 2004; GRAMICCIA & GRADONI, 2005) e por roedores.

O do parasito apresenta-se sob duas formas distintas, sendo 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 dos insetos vetores. As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária (SLAPPENDEL, 1988; BANETH, 2006).

Uma vez que o vetor ingere a forma amastigota no momento do repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, esta se transforma no interior do aparelho digestório, em uma forma infectante denominada de promastigota, que pode ser inoculada em outro hospedeiro ou reservatório (homem ou animal) ao promover o repasto sanguíneo. A forma flagelada, ao penetrar no hospedeiro vertebrado, transforma-se em amastigota, e multiplica-se ocorrendo a disseminação linfática e hematogênica para vários tecidos do organismo. Ao ser picado por outro vetor, o hospedeiro transmite as formas amastigotas fechando-se assim o ciclo de transmissão (FERRER, 2002; GONTIJO & MELO, 2004; GRAMICCIA & GRADONI, 2005; BANETH, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

Os flebotomíneos são insetos pequenos (com cerca de 2 a 3 mm), com hábitos intra e peridomiciliares, vivendo em fendas de rocha e cavernas, fazendo seu ciclo larvar em matéria orgânica vegetal ou animal em decomposição, o que dificulta o seu combate (SANTA ROSA & OLIVEIRA,

1997; TEODORO et al., 2003; BASANO & CAMARGO, 2004). 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). 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).

A doença já foi identificada em cães (*Canis familiaris*), gatos (*Felis domesticus*), cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), raposas (*Lycalopex vetulus*), gambás (*Didelphis marsupialis*, *Didelphis albiventris*) e ratos (*Proechymis oris*) (GENARO, 1993; CASTRO, 1996; BANETH, 2006; ROSSI, 2007; MIRANDA et al., 2008).

Até o presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença, o cão é considerado epidemiologicamente o mais importante, pois apresenta um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da LV (SLAPPENDEL & FERRER, 1990). A leishmaniose visceral canina, do ponto de vista epidemiológico, é considerada mais importante que a doença humana, pois, os cães infectados mesmo assintomáticos, servem como fonte de infecção para os vetores (MOLINA et al., 1994; GRAMICCIA & GRADONI, 2005; LAURENTI et al., 2009). Outro fator a ser levado em consideração é que essa espécie doméstica convive e compartilha o domicílio com o homem (GONTIJO & MELO, 2004; BARATA et al., 2005).

Enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a mais de 50%, a prevalência da doença varia entre três e 10% (FERRER, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2005).

A LV ocorre em 11 países das Américas do Sul e Central, sendo que no Brasil as principais áreas atingidas são o norte, nordeste e o centro oeste, embora existam focos crescentes na região sudeste e sul. 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 canina têm sido observados em grandes centros urbanos do Brasil (SILVA et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; SÃO PAULO, 2003; BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES, 2006; RIBEIRO, 2007).

No estado de São Paulo o primeiro caso autóctone de LVC foi registrado no município de Araçatuba, região noroeste do estado, em 1998, no Curso de Medicina Veterinária – UNESP – *campus* de Araçatuba. A confirmação foi feita pela observação direta de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em exame citológico de um nódulo cutâneo. Posteriormente identificou-se, como agente etiológico, a *Leishmania chagasi*. Estes fatos, associados à presença do inseto vetor, notificado em 1997, confirmam a autoctonia da LVC em Araçatuba. Em 1999, no mesmo município, foi notificado o primeiro caso humano autóctone no Estado. 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, 57 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).

Na dependência das propriedades do parasito e da resposta imune do hospedeiro a LVC pode desenvolver-se sob a forma de infecção aguda ou crônica (GENARO, 1993; PINELLI et al., 1999). Características genéticas determinam diferentes respostas imunológicas na espécie canina, sendo que alguns animais ou raças podem apresentar uma resposta mais efetiva do que outros (FERRER, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

O principal fator que influencia a evolução da enfermidade é a resposta imune mediada por células T. A resistência ao desenvolvimento de sintomas após uma infecção por *Leishmania* sp. é determinada por indução da resposta imune celular mediada por linfócitos CD4+ do subtipo Ta1 (DAY, 2007). Os macrófagos infectados por parasitas atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes linfócitos são estimulados a

produzir interleucinas e, dependendo do perfil estimulado, ocorre desenvolvimento de duas sub-populações de linfócitos T auxiliares, Ta1 ou Ta2 (NOLI, 1999; BANETH, 2006).

Caso sejam ativadas preferencialmente as células Ta1 ocorrerá a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (FNT), que por sua vez, estimularão a imunidade celular, aumentando a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos, desencadeando uma resposta imune celular protetora, podendo haver controle do parasitismo com eliminação da infecção. Em contraste, quando a infecção induz à ativação de linfócitos Ta2, ocorrerá à produção de citocinas antiinflamatórias, dentre elas as IL-4, 5, 6, 10 e 13, as quais desencadearão proliferação de células B, com subsequente produção de imunoglobulinas e desenvolvimento da infecção (SLAPPENDEL & FERRER, 1990; NOLI, 1999; CIARAMELLA & CORONA, 2003).

Um perigo potencial da regulação de linfócitos T prejudicada e da atividade exarcebada de linfócitos B é a formação de imunocomplexos circulantes, causando danos em vários órgãos pela deposição dos mesmos nas paredes de vasos sanguíneos, podendo causar quadros de vasculite, uveíte, glomerulonefrite, artrite e poliartrite (SLAPPENDEL & FERRER, 1990; KONTOS & KOUTINAS, 1993; NOLI, 1999; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BANETH, 2006).

Desta forma, a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção está associada à resposta Ta1, e a progressão da doença com a resposta Ta2. A indução preferencial de linfócitos Ta1 ou Ta2 depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação do antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006; MICHALICK & GENARO, 2007).

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, o que

se torna muitas vezes um desafio para o médico veterinário (FEITOSA et al., 2000; SINGH & SIVAKUMAR, 2003; IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006). As alterações laboratoriais 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 (VIEIRA et al., 2007).

Apesar de discordâncias entre alguns autores o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da doença, fundamentando-se na demonstração de formas amastigotas do parasito em esfregaços obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina de órgãos linfóides (MOREIRA et al., 2007) e, menos freqüentemente, em esfregaços sangüíneos, líquido ascítico e líquido sinovial, corados com corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico (WOLSCHRIJN et al., 1996; LEONTIDES et al., 2002; SINGH & SIVAKUMAR, 2003; IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006; SILVA et al., 2009). Trata-se de um método simples com especificidade de 100% e sensibilidade dependente do grau de parasitemia e do tipo de material biológico coletado. As formas amastigotas são reconhecidas pela sua forma esférica a ovóide, medindo 2-5 μm e contendo um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (KONTOS & KOUTINAS, 1993; BRASIL, 2006).

O diagnóstico sorológico da LV, que se baseia na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. circulantes, apesar de não apresentar 100% de sensibilidade ou especificidade, é o método mais utilizado para o diagnóstico da doença, principalmente em se tratando de inquéritos epidemiológicos. No entanto, seus resultados devem ser interpretados com cuidado, uma vez que podem gerar resultados falso-positivos e falso-negativos (SLAPPENDEL & GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). As técnicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde são a imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de ELISA (BRASIL, 2006).

Os sintomas no cão variam em decorrência dos mecanismos imunológicos ativados pelo hospedeiro, bem como dos órgãos acometidos. A forma visceral é uma doença sistêmica, caracterizada pelo envolvimento de

vários órgãos, entre eles o baço, fígado, medula óssea, pele e linfonodos (CIARAMELLA et al., 1997).

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, exceto pelo fato dos seres humanos não apresentarem lesões cutâneas. O período de incubação é variável, situando-se entre três e oito meses, em média (GENARO, 1993). Os animais acometidos por leishmaniose visceral podem apresentar alterações digestórias, cardio-respiratórias, renais, hepáticas, neurológicas, oculares, dermatológicas e locomotoras (GENARO, 1993; BURACCO et al., 1997; CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000; BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BANETH, 2006; SILVA et al., 2007a; FERRARO, 2008; MARCONDES, 2008). O quadro clínico pode se apresentar complicado devido à ocorrência de infecções oportunistas concomitantes (CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; NOLI, 1999).

As principais manifestações clínicas na forma clássica da doença incluem mucosas pálidas, apatia, emagrecimento progressivo, hiporexia ou anorexia, caquexia (FERRER, 1992; GENARO, 1993), alterações dermatológicas tais como pelame opaco, desqueratinização, alopecia ou rarefação pilosa, onicogrifose, hiperqueratose e ulcerações cutâneas (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999; SONODA, 2007; VIDES et al., 2009), ceratoconjuntivite, blefarite, uveíte (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999), linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia (BANETH, 2006), êmese, diarreia, hematoquezia e melena (FERRER, 1992; GENARO, 1993; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Em muitos animais portadores de leishmaniose visceral verifica-se diminuição da atividade física, associada à osteoartropatia (SLAPPENDEL & FERRER, 1990; NOLI, 1999). Segundo alguns autores, a incidência de distúrbios locomotores em casos de leishmaniose visceral pode chegar a 30% dos cães afetados (TURREL & POOL, 1982; YAMAGUCHI et al., 1983;

SLAPPENDEL, 1988; FERRER, 1992; WOLSKHRIJN et al., 1996; BURACCO et al., 1997). Entretanto, em estudo mais recentes, Agut et al. (2003) observaram o acometimento em 44,8% (26/58) da população em estudo. No Brasil há alguns relatos pretéritos citando o envolvimento articular em quadros de artrite ou poliartrites, em cães portadores de LV. Contudo tratam-se de relatos de apenas um caso clínico (BEVILACQUA et al., 2002; SOUZA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2007a; SILVA et al., 2007b; SILVA et al., 2007c; PARABONI et al., 2008).

O envolvimento osteoarticular em animais com leishmaniose visceral pode ser caracterizado clinicamente por claudicação, artralgia, edema, rigidez articular, paresia e atrofia muscular dentre outros, que podem ser decorrentes de poliartrites, sinovites, polimiosite, osteoartrite, periostite proliferativa, lesões osteolíticas e neuralgia (SLAPPENDEL, 1988; KONTOS & KOUTINAS, 1993; SPRENG; 1993; WOLSKHRIJN et al., 1996; BURACCO et al., 1997; MCCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; BANETH, 2006). Quanto às alterações musculares, em muitos animais observa-se uma mioatrofia, inicialmente nos músculos das fossas temporais, seguida, sucessivamente, pelo resto da musculatura corpórea (LONGSTAFFE, et al., 1983; KONTOS & KOUTINAS, 1993; KOUTINAS et al., 1999; NOLI, 1999).

Muitos agentes etiológicos podem causar poliartropatias, sendo estas classificadas em não inflamatórias e inflamatórias (FISHER, 2003; GREENE & BUDSBERG, 2006; EUGÊNIO, 2008; FERNANDES, 2009). Acredita-se que a poliartrite induzida por *Leishmania* sp. seja decorrente de uma reação inflamatória granulomatosa, causada pela presença de parasitos ou por uma resposta celular e humoral, à semelhança do que se observa em órgãos linfóides (MCCONKEY et al., 2002; REIS et al, 2009; GUINCHETTI et al. 2008a; GUINCHETTI et al. 2008b) rins, coração, músculo estriado esquelético e tecido nervoso (FERRER, et al.; 1988; COSTA et al., 2003; PACIELLO et al., 2008; FERRARO et al, 2009; GOMES, et al, 2009; MELO et al. 2009).

Estudos pretéritos sugeriram que a patogenia da lesão articular em cães com leishmaniose visceral é devida à liberação de citocinas por macrófagos

infectados, levando à absorção e destruição da cartilagem óssea (FERRER, 1992), ou ao depósito de imunocomplexos circulantes na sinóvia (CUCINOTTA et al., 1991; FERRER, 1992). Estes, podem produzir uma reação de hipersensibilidade tipo III, induzindo a uma ativação local de complemento e síntese de fatores quimiotáticos para neutrófilos (BENETT & MAY, 1995). Os neutrófilos produzem enzimas hidrolíticas, que causam destruição articular, vasculite e aumento da permeabilidade vascular (GORMAN, 1995).

No que diz respeito aos achados radiográficos, diferentes relatos têm descrito a poliartrite por LV como sendo do tipo não-erosiva (SPRENG, 1993; KOUTINAS et al., 1999; AGUT et al., 2003) ou erosiva (WOLSCHRIN et al., 1996; KOUTINAS et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; MCCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003). Entretanto, conforme a literatura compilada, os achados radiográficos freqüentemente descritos foram: destruição da região cortical (TURREL & POOL, 1982; WOLSCHRIJN et al., 1996; MCCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003), aumento de opacidade medular (TURREL & POOL, 1982; BURACO et al., 1997; AGUT et al., 2003), diminuição de opacidade medular (AGUT et al., 2003), reação periosteal proliferativa (TURREL & POOL, 1982; BURACO et al., 1997; AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2007a), osteólise (WOLSCHRIJN et al., 1996; BURACO et al., 1997; MCCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SOUZA et al., 2005; SILVA et al., 2007a), colapso dos espaços articulares (MCCONKEY et al., 2002; SILVA et al., 2007a) e edema de partes moles (TURREL & POOL, 1982; WOLSCHRIJN et al., 1996; SPRENG, 1993; SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2007a). Também chama a atenção alguns relatos de literatura onde os pacientes acometidos pela doença, com quadros de artrite ou poliartrite, não apresentavam alterações radiográficas ósseas dignas de nota, levando a acreditar que o tempo de evolução da enfermidade ainda não fora suficiente para tal (SPRENG, 1993; JACQUES et al., 2002; EUGÊNIO et al., 2008; PARABONI et al., 2008).

A leishmaniose visceral canina tem sido reportada em associação com infecção por *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi*, sendo muito comum a

infecção por *Leishmania* sp. ocorrer em regiões onde estes organismos também são endêmicos (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999; SLAPPENDEL & GREENE, 1990). Esses microrganismos podem afetar as articulações por via hematogena e/ou por inoculação direta (FISHER, 2003; FERNANDES, 2009). Por apresentarem curso clínico extremamente variável, torna-se importante a realização de diagnóstico diferencial devido à semelhança das alterações clínicas manifestadas por essas enfermidades que causam artropatias (NOLI, 1999).

A avaliação do líquido sinovial tem sido usualmente realizada para diferenciação de inflamação aguda e crônica, bem como para exclusão de processo infeccioso imunomediado (DE BIASE et al., 2001; ÅKERBLOM, 2007). Ao analisar o líquido sinovial, na dependência da quantidade de volume colhido, são obtidas valiosas informações sobre a cor, a turbidez, a viscosidade, a contagem total de células nucleadas, a qualidade da mucina e a concentração de proteínas totais (BOON, 1997; DE BIASE et al., 2001; FISHER, 2003; FERNANDES, 2009). Entretanto, as amostras de líquido sinovial podem ser difíceis de avaliar porque muitas vezes possuem um pequeno volume e são viscosas, gerando limitações na realização dos testes laboratoriais (FISHER, 2003; FERNANDES, 2009). Em caso de obtenção de pequeno volume, é priorizado o exame citológico por ser o componente mais importante (ROITT et al., 2003).

O processo inflamatório articular provoca um aumento na quantidade de líquido sinovial e promove a diminuição da viscosidade do fluido, pela diluição ou pela degradação do ácido hialurônico por hialuronidase originada de células ou agentes inflamatórios (PEDERSEN, 1978; WILKINS, 1993; LOZIER & MENARD, 1998; ULLMAN & TODOROFF, 1998; TODHUNTER & JOHNSTON, 2003). O líquido sinovial do cão normal é claro, viscoso, de cor amarelo-palha, com pH entre 7,0 e 7,8, não contém fibrinogênio e forma um bom coágulo de mucina pós-colheita (FERNANDEZ et al., 1983; HOULTON, 1994).

Em cães portadores de LV foi observada alta concentração de proteínas totais na avaliação do líquido sinovial (BURACCO et al., 1997), fato associado

a edema tecidual e que pode ser atribuído a uma elevação da permeabilidade vascular da membrana sinovial (BOON, 1997). Tem têm sido verificado um grande número de neutrófilos (CUCINOTA et al., 1991; SPRENG, 1993; BURACCO et al., 1997), o que é indicativo de uma doença inflamatória (BOON, 1997).

Muitos casos relatados demonstraram que o aumento na quantidade de células inflamatórias, associado com uma infiltração linfocítica, pode, de forma secundária, representar uma resposta ativa celular (FONT et al., 1996). Mudanças na coloração e turbidez do líquido sinovial também são visualizadas no calazar canino (SPRENG, 1993). Tais alterações são mais freqüentes em cães portadores de lesões osteolíticas (CUCINOTA et al., 1991; SPRENG, 1993) e de edema de partes moles (BURACCO et al., 1997). Além disso, tem sido descrita a visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em macrófagos de líquido sinovial (YAMAGUCHI et al., 1983; SPRENG, 1993; BURACCO et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; MCCONKEY et al., 2002; AGUT et al., 2003; SANTOS et al., 2006; PARABONI et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Como o líquido sinovial demonstra um espectro limitado de respostas quanto às doenças inflamatórias, além da difícil distinção entre as enfermidades infecciosas de longa duração, tais como erliquiose canina, doença de Lyme e LV, para buscar a causa base das artropatias se faz necessária a realização de exames complementares como radiografias, exames sorológicos, métodos de amplificação do DNA de possíveis agentes etiológicos, dentre outros, além da obtenção de um detalhado histórico e minucioso exame físico (FERNANDES, 2009).

III. MATERIAL E MÉTODO

III.I. Ética animal

O estudo realizado está de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UNESP – *campus* de Araçatuba, São Paulo, Brasil, aprovado na reunião de 28/09/2007, estando registrado sob protocolo nº. 2007/003292.

III.II. Local e tempo de execução

O ensaio foi realizado nas dependências do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – *campus* de Araçatuba, SP, Brasil, nos Setores de Radiologia Veterinária, Laboratório Clínico Veterinário e Laboratório de Imunologia do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, durante o período entre março de 2008 a junho de 2009.

III.III. Animais utilizados

Foram colhidas amostras de 154 cães, adultos, independentes de sexo, raça e peso, sintomáticos ou assintomáticos, encaminhados para eutanásia ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba, SP, Brasil.

O diagnóstico da doença baseou-se nos resultados da pesquisa de formas amastigotas do parasita por meio do exame citológico de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo, e da reação sorológica imunoenzimática (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp., como descrito por Lima et al. (2003). Do total de animais examinados, foram incluídos 100 cães positivos para a presença de formas amastigotas de

Leishmania sp. no exame citológico e/ou sorologia reagente para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

Antes da avaliação radiográfica os animais recebiam uma medicação pré-anestesia (MPA) com Acepromazina¹, na dose de 0,055 mg/kg por via intravenosa, seguida, de uma anestesia geral com Pentobarbital Sódico², na dose de 15 mg/kg por mesma via para a realização da eutanásia. Os cães infectados receberam aplicação de uma ampola de 10 mL cloreto de potássio a 19,1%³, por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto n°. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devam ser submetidos à eutanásia. O método utilizado seguiu recomendações da Resolução n°. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

As amostras de líquido sinovial foram obtidas por meio de artrocentese objetivando avaliar a celularidade a partir da contagem de 100 células e pesquisar formas amastigotas de *Leishmania* sp.

Em todos os animais soropositivos foi realizado o teste de imunoenensaio enzimático para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi* utilizando-se o kit comercial SNAP[®] 3DX^{TM4}, com o objetivo de determinar a ocorrência de possíveis co-infecções.

¹ Acepran 0,2% – Vetnil – Louveira - São Paulo

² Hypnol 3% – Fontoveter – Itapira, SP

³ Cloreto de potássio a 19,1% – Darrow – Rio de Janeiro, RJ

⁴ SNAP[®] 3DXTM – IDEXX Laboratories – Sacramento, Califórnia

III.IV. Colheita de sangue total

Para realização da sorologia para leishmaniose visceral, erliquiose canina e doença de Lyme, colheu-se por flebocentese da veia jugular cinco mililitros (mL) de sangue total, utilizando-se, agulhas 25x8 milímetros (mm) acopladas a seringas estéreis de 10 mililitros (mL). Após a retração do coágulo, a amostra foi submetida à centrifugação a aproximadamente 1.500 G, durante 10 minutos, para melhor separação do soro. Este, por sua vez, foi estocado a - 20° C, até o momento do seu processamento.

III.V. Diagnóstico da leishmaniose visceral

III.V.I. Exame citológico de linfonodo

O exame citológico dos linfonodos foi realizado após a CAAF dos linfonodos poplíteos e pré-escapulares, na dependência de aumento de volume dos mesmos e da facilidade de punção de acordo com o animal, com o auxílio de uma seringa descartável de polietileno de 10 mL, acoplada a uma agulha hipodérmica descartável, com espessura e comprimento de 25x7 mm, onde era exercido vácuo para a aspiração do material a ser colhido. Após esse procedimento, imediatamente realizava-se o esfregaço do material aspirado em lâminas de vidro, estes eram secos ao ar e corados com o corante hematológico¹ para a posterior avaliação à microscopia de luz no aumento de 100x, com imersão, e pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

¹ Panótico Rápido - Laborclin – Curitiba, Paraná

III.V.II. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* no soro através da técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

As amostras de soro de todos os animais foram submetidas à pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* sp. por meio da técnica de ELISA, como descrita por Lima et al (2003).

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/74/PP75, numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, e incubadas “overnight” a 4°C. Após a lavagem com PBS-tween 20 (PBS-T) por três vezes as placas foram bloqueadas por uma hora com 150 µl de PBS-BSA 1%, e incubadas à temperatura ambiente durante duas horas. Após nova lavagem com PBS-tween por três vezes, 100 µl do controle positivo, do controle negativo (animal de área não endêmica saudável) e das amostras de soro, diluídas em PBS contendo 0,05% de tween 20 e 1% de BSA, foram adicionadas a cada poço e incubadas por três horas à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-tween 20, adicionou-se à placa 100 µl de anticorpo anti-IgG de cão marcado com peroxidase¹ previamente titulado.

Após a incubação por uma hora em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com PBS-tween 20 e foram adicionados 100 µl de uma solução contendo substrato de ortofenilenediamina (OPD)² (0,4mg/ml) em diluente apropriado com peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida adicionando-se, a cada poço, 50 µl de H₂SO₄ 1M. A densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492nm, utilizando o leitor automático de ELISA³. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida das amostras em duplicata.

¹ Sigma – Aldrich Brasil LTDA

² Sigma – Aldrich Brasil LTDA

³ Labsystems Multiskan EX - Flow Laboratories International SA, Lugano, Switzerland

Para a determinação do ponto de corte foi realizado o teste de ELISA em amostras de 20 cães sadios de área não endêmica para leishmaniose visceral. O ponto foi estipulado a partir da média acrescida de três desvios-padrões da leitura da densidade óptica (DO), o qual foi considerado 0,270.

III.VI. Exames radiográficos

Para a realização dos exames radiográficos utilizou-se uma unidade radiológica fixa da marca CRX¹ – modelo SHF 730, com capacidade para 500 miliamperes (mA) e 150 quilovoltagem (kVp), tempo de exposição de 0,05 a 5 segundos (s) e equipado com grade antidifusora Potter-Bucky (Figura 1).



Figura 1. Unidade radiológica fixa do Setor de Radiologia Veterinária do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, do Curso de Medicina Veterinária – UNESP, *campus* de Araçatuba, utilizada nos exames de radiográficos: marca CRX – modelo SHF 730 – 500 mA / 150 kVp / tempo de exposição de 0,05 a 5 segundos (s) (A) e equipado com grade antidifusora Potter-Bucky (B). (Araçatuba – SP, 2009)

¹ SHF 730 – CRX® – Campinas, São Paulo

As avaliações foram realizadas nas articulações distais dos membros torácicos e pélvicos: úmero-rádio-ulnares (cotovelos), rádio-cárpica-metacárpicas (cárpicas), fêmuro-tíbio-fibulares (joelhos) e tíbio-társica-metatársicas (társicas) (Figura 2).

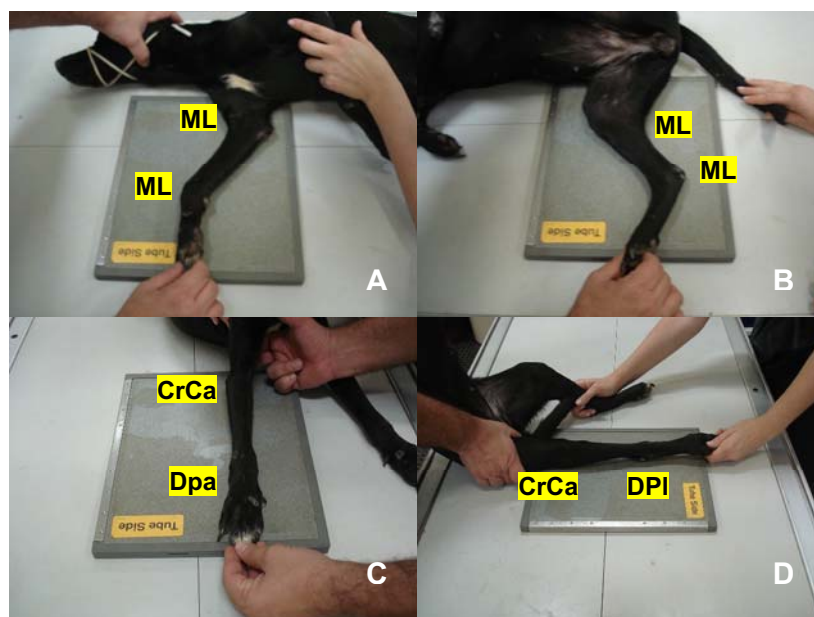


Figura 2. Posicionamentos radiográficos adotados conforme a articulação em estudo: úmero-rádio-ulnar (**A e C**) e fêmuro-tíbio-fibular (**B e D**) incidências craniocaudal (**CrCa**) e mediolateral (**ML**); rádio-cárpica-metacárpica (**A e C**) projeções dorsopalmar (**DPa**) e **ML** e para a articulação tíbio-társica-metatársica (**B e D**) incidências dorsoplantar (**DPI**) e **ML**. (Araçatuba – SP, 2009)

Para tanto foram utilizados filmes para raios-x diagnósticos¹ de tamanho 24 x 30 centímetros (cm), depositados em chassis metálicos com écran intensificador² de tamanho semelhante aos filmes supracitados. As películas foram identificadas com a espécie, a raça, a idade, o registro e a data do exame radiográfico. Uma letra de chumbo indicando o membro quanto à sua contra-lateralidade (direito – D ou esquerdo - E) foi fixada ao chassis. A revelação e a fixação dos filmes radiográficos foram efetuadas através de processamento automático³ (Figura 3).

¹ T-MAT G/RA – Kodak® – São Paulo, São Paulo

² X-OMAT Regular Screens – Kodak Lanex® – São Paulo, São Paulo

³ MX2 – Macrotec® – Cotia, São Paulo



Figura 3. Câmara escura (sala revelação): chassi metálico 24x30 cm (seta azul) e identificador radiográfico eletrônico (seta verde) (A). Processadora automática para filmes radiográficos (B). (Araçatuba – SP, 2009)

A técnica radiográfica utilizada foi a que relaciona mAs e kVp, de acordo com a espessura da região a ser radiografada, preconizada por De Martin e Iwasaki (1976).

Para a avaliação das articulações úmero-rádio-ulnar e fêmuro-tíbio-fibular foram realizadas as incidências craniocaudal (CrCa) e mediolateral (ML), para a articulação rádio-cárpica-metacárpica fizeram-se às projeções dorsopalmar (DPa) e ML e para a articulação tíbio-társica-metatársica utilizaram-se às incidências dorsoplantar (DPI) e ML. Todas as articulações foram radiografadas bilateralmente, obedecendo-se às normas de proteção radiológica, realizando pelo menos duas incidências em ângulo reto uma em relação à outra, sendo efetuadas em posições padronizadas, segundo as técnicas descritas por Kealy & McAllister (2005). Posteriormente os exames radiográficos foram avaliados ao negatoscópio.

III.VII. Exame do líquido sinovial

As amostras de líquido sinovial foram obtidas por meio de artrocentese e processadas dentro de um período máximo de 50 minutos, evitando-se a

degeneração celular. Após a tricotomia e a palpação da região articular (Figura 4) os animais eram posicionados em decúbito lateral, realizando-se a assepsia do local com álcool iodado e, a seguir, procedendo-se a colheita da amostra por inserção de uma agulha calibre 25x7 mm, acoplada a uma seringa de cinco mL, com o intuito de se obter o volume máximo colhido de amostra (Figura 5).

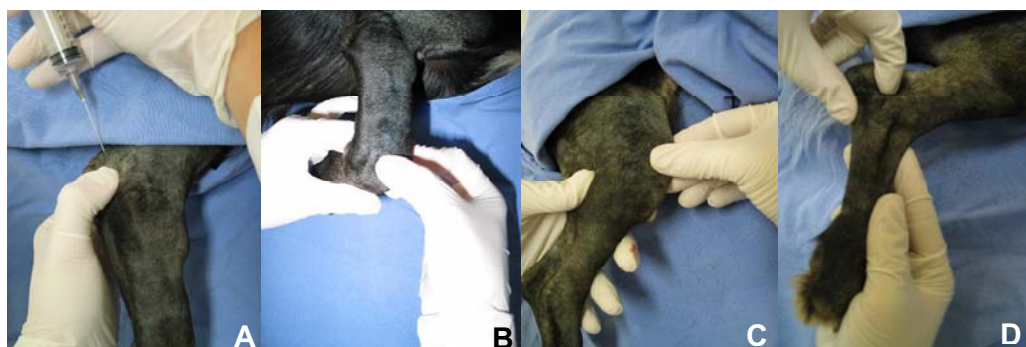


Figura 4. Palpação das articulações para realização da artrocentese: úmero-rádio-ulnar (A), rádio-cárpica-metacárpica (B), fêmuro-tíbio-fibular (C) e tíbio-társica-metatársica (D). (Araçatuba – SP, 2009)

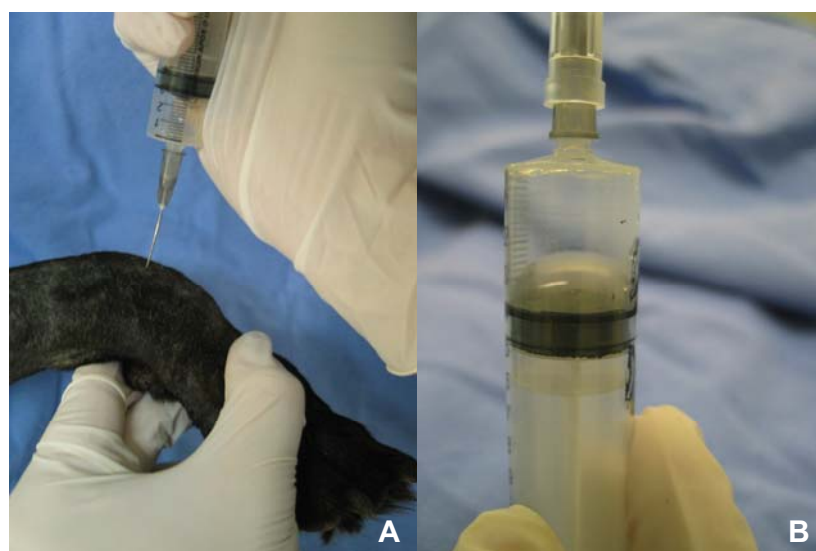


Figura 5. Demonstração da realização da punção articular rádio-cárpica-metacárpica (A) e amostra colhida de líquido sinovial (B). (Araçatuba – SP, 2009)

A confecção das lâminas foi realizada imediatamente após o término da colheita do líquido sinovial, utilizando-se citocentrifugação¹, sob aproximadamente 380 G, durante um período de cinco minutos. As lâminas foram coradas com corante hematológico² para posterior avaliação à microscopia de luz no aumento de 40x e 100x, com imersão, objetivando avaliar a celularidade a partir da contagem de 100 células e pesquisar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

III.VIII. Teste de imunoenensaio enzimático para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi*

Todos os cães com leishmaniose visceral foram avaliados pelo teste de imunoenensaio enzimático para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi* utilizando o kit comercial SNAP[®] 3DX^{™3} (Figura 6), com o intuito de identificar possíveis co-infecções. Para tanto o soro sangüíneo e reagente foram estabilizados à temperatura ambiente. Após o acréscimo de quatro gotas de conjugado anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi* a três gotas de soro, realizou-se a homogeneização e em seguida adicionou o conteúdo no poço de reação do teste. Ao aparecer cor no círculo de ativação, pressionou-se a outra extremidade do teste para ativação do mesmo. Após oito minutos realizou-se a leitura, levando-se em consideração a localização e intensidade da cor da reação, conforme recomendações do fabricante (Figura 7).

¹ Citocentrífuga 2400 – Fanem – São Paulo, São Paulo

² Panótico Rápido - Laborclin – Curitiba, Paraná

³ SNAP[®] 3DX[™] – IDEXX Laboratories – Sacramento, Califórnia



Figura 6. Kit sorológico SNAP® 3DX™ para a detecção de anticorpos contra a *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi*. (Araçatuba – SP, 2009)



Figura 7. Resultados obtidos pelo kit sorológico SNAP® 3DX™ para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Borrelia burgdorferi*. Resultados negativo (A) e positivo para erliquiose canina (B) (Araçatuba – SP, 2009)

III.IX. Análise estatística

Para realização da análise estatística descritiva os resultados foram tabulados em planilha eletrônica¹ para a obtenção da frequência da distribuição das variáveis clínicas, radiográficas e laboratoriais.

¹ Microsoft Office Excel 2007 – Microsoft Corporation – São Paulo, São Paulo

IV. RESULTADOS

Dos 154 cães avaliados, 100 foram considerados positivos para infecção por *Leishmania* sp., sendo 74% por meio de exame sorológico (apêndice A), 88% por exame parasitológico de tecido linfóide (apêndice B) e 62% por ambos os métodos (apêndice C).

A percentagem de ocorrência de co-infecção entre *Leishmania chagasi* e *Ehrlichia canis* foi de 45%, e não se observou co-infecção com *Borrelia burgdorferi* em nenhuma amostra (apêndice D).

Os cães positivos para *Leishmania* sp. tinham em média 36 meses de idade, sendo a positividade maior na faixa de 12 a 48 meses (Figura 8).

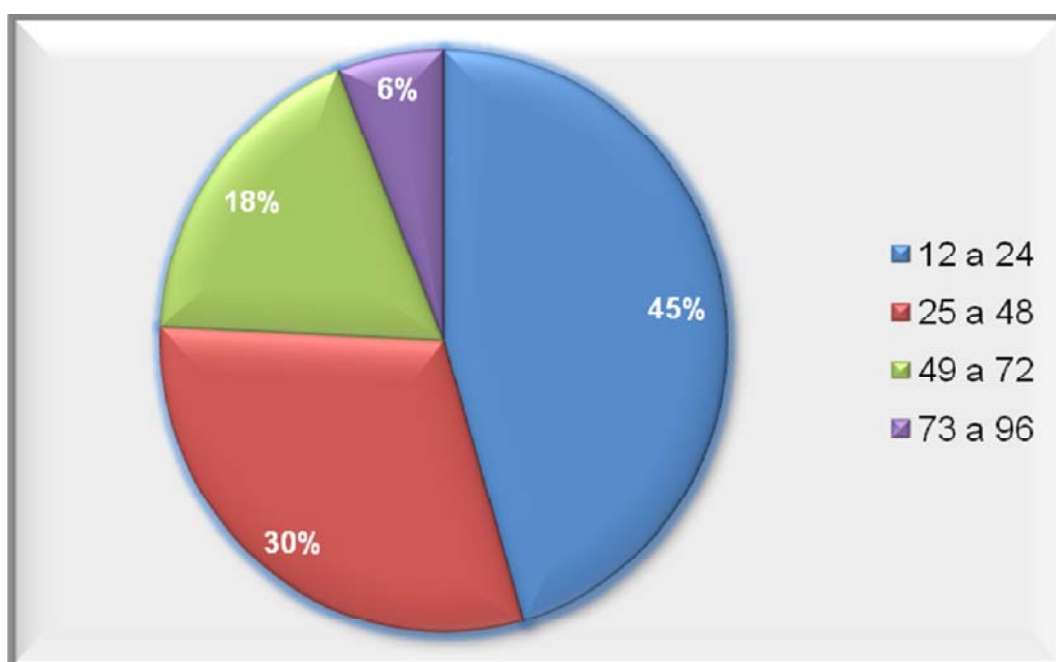


Figura 8. Distribuição (%), segundo a faixa etária em meses, de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. (Araçatuba – SP, 2009)

Dos 100 animais avaliados, 54% eram machos e 46% fêmeas. Não se observou predisposição racial, com 66% dos cães sem precisa definição racial e 34% com raça definida (Figura 9).

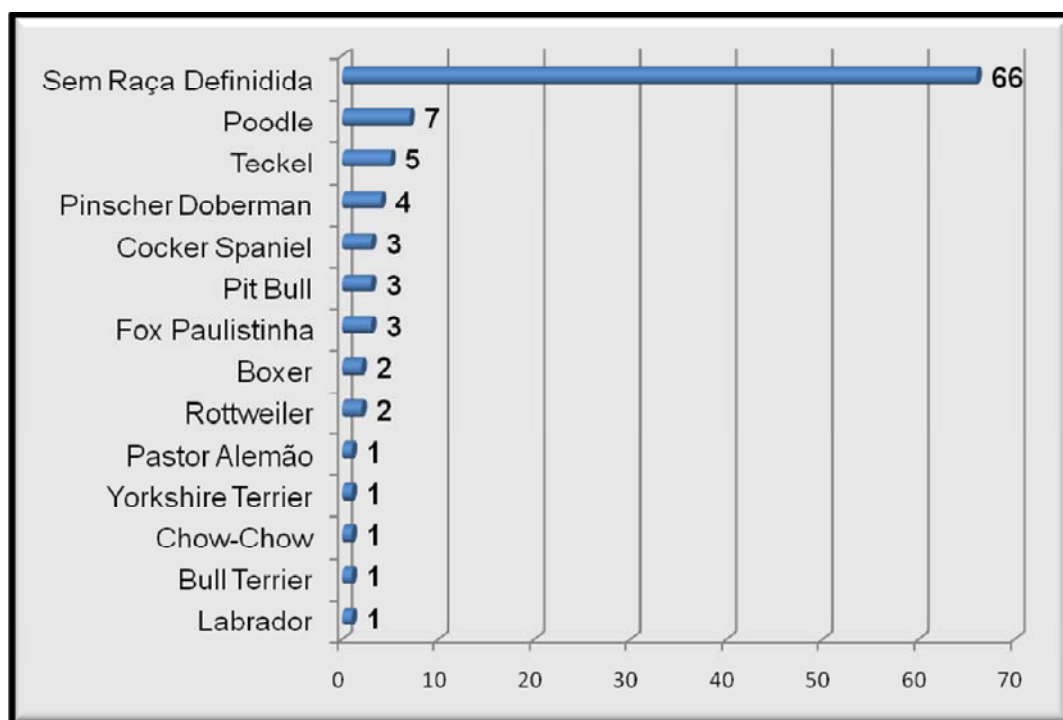


Figura 9. Distribuição em número, segundo a raça, de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. (Araçatuba – SP, 2009)

Em 83% dos cães detectou-se radiograficamente pelo menos uma lesão articular. As articulações mais afetadas foram as társicas e cámpicas, havendo uma tendência para o envolvimento bilateral (Figura 10). Embora esses animais (83/100) representem um total de 664 articulações estudadas, dessas apenas 49,2% demonstraram algum sinal radiográfico digno de nota.

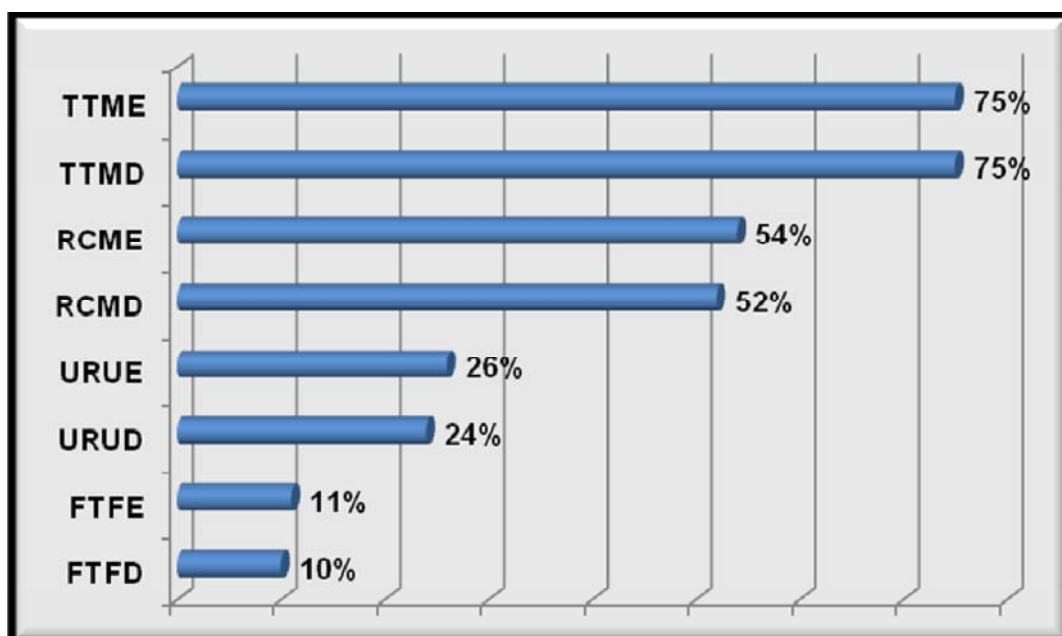


Figura 10. Frequência (%) do envolvimento articular observada nos exames radiológicos de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Onde URUD representa a articulação úmero-rádio-ulnar direita, RCMD a articulação rádio-cárpica-metacárpica direita, FTFD a articulação fêmuro-tíbio-fibular direita, TTMD a articulação tíbio-társica-metatársica direita, URUE a articulação úmero-rádio-ulnar esquerda, RCME a articulação rádio-cárpica-metacárpica esquerda, FTFE a articulação fêmuro-tíbio-fibular esquerda e TTME a articulação tíbio-társica-metatársica esquerda. (Araçatuba – SP, 2009)

As lesões foram caracterizadas por irregularidade do trabeculado ósseo, esclerose subcondral, áreas de osteólise, edema de partes moles adjacentes à articulação, diminuição do espaço interarticular, osteólise associada à proliferação óssea, somente áreas de proliferação óssea, aumento de opacidade medular e fratura patológica (Figuras 11 e 12).

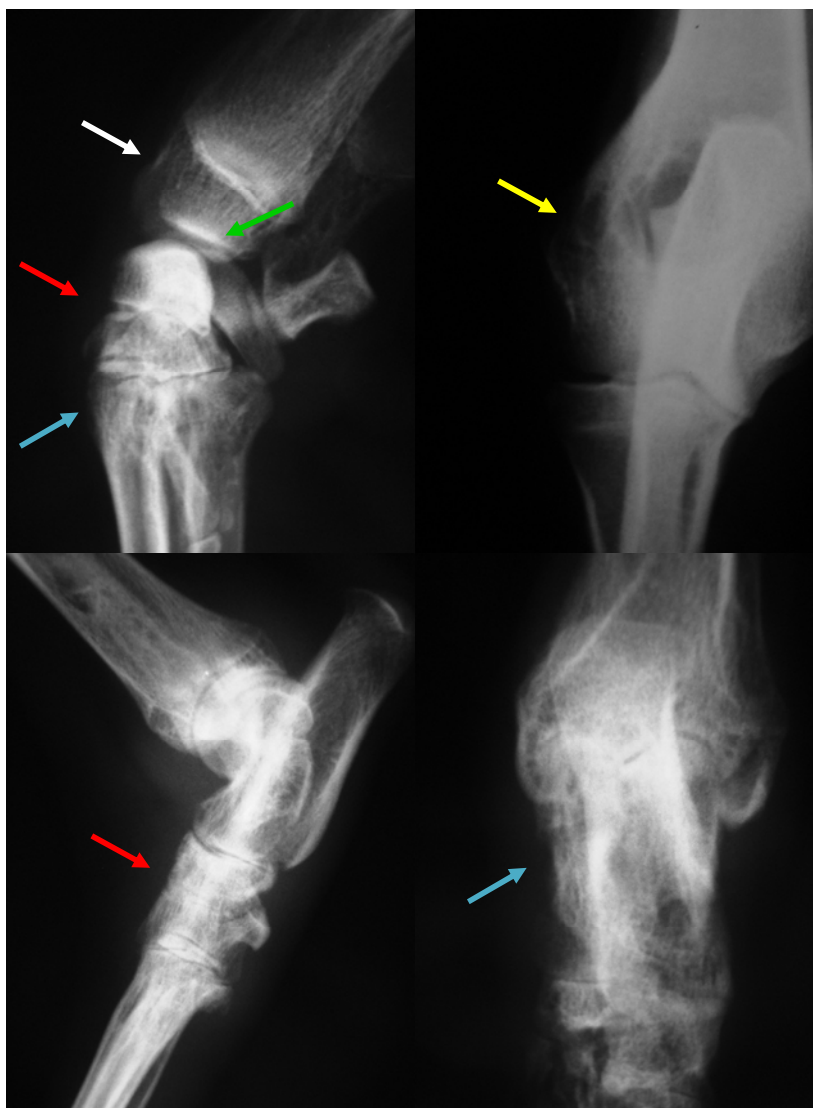


Figura 11. Radiografias das articulações locomotoras distais de cão acometido por leishmaniose visceral, com sinais radiográficos compatíveis com artrite. Visualização do trabeculado ósseo grosseiro (seta branca), esclerose subcondral (seta verde), colapso articular (seta vermelha), osteólise (seta amarela) e osteólise associada à proliferação óssea (seta azul). (Araçatuba – SP, 2009)

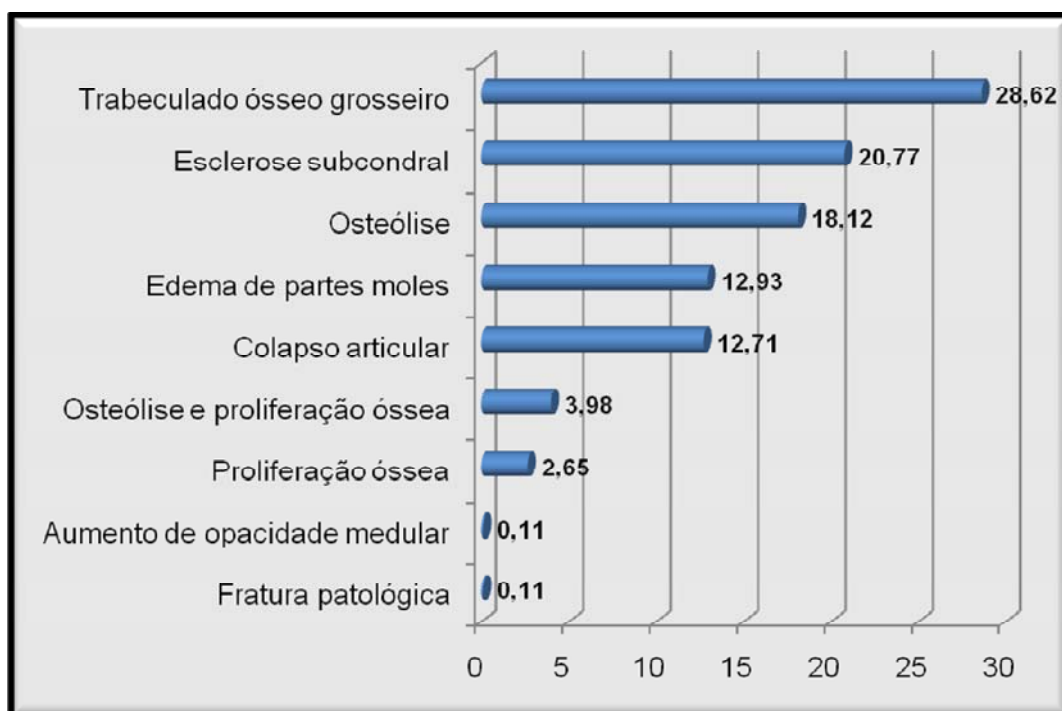


Figura 12. Frequência (%) dos achados radiográficos observados em articulações de 100 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. (Araçatuba – SP, 2009)

Devido à dificuldade de obtenção, ao pequeno volume ou à contaminação da sinóvia, a avaliação citológica deixou de ser realizada em 196 das 800 articulações estudadas.

Dos 55 cães positivos para leishmaniose visceral e negativos para erliquiose, 23% (101/440) das amostras de líquido sinovial apresentavam formas amastigotas de *Leishmania* sp. em macrófagos (Figura 13). As articulações tarsais (33/101) e carpais (26/101) foram as mais comumente infectadas, seguidas das articulações dos cotovelos (24/101) e dos joelhos (19/101).

A maioria das articulações dos cães com leishmaniose visceral com sorologia negativa para *Ehrlichia* sp. (75/101) apresentou alteração na contagem diferencial das células, sendo que 30% das amostras analisadas apresentou aumento do número de neutrófilos, estando esses hipersegmentados, a maioria dos quais apresentando sinais de degeneração.

Em 70% das amostras ocorreu aumento do número de células mononucleares ativadas, enquanto 25,75% (26/101) possuíam contagem de células diferenciais dentro do intervalo de referência descrito por Fernandes (2009).

Embora formas amastigotas de *Leishmania* sp. não tenham sido encontradas em 45% (197/440) das articulações dos cães negativos para erliquiose canina (Figura 13), a contagem diferencial das células apresentou-se elevada em 57% (113/197) das articulações. De modo similar às articulações com presença de formas amastigotas, as não infectadas também apresentaram o mesmo padrão de alteração na contagem diferencial (aumento do número de células mononucleares ativadas e neutrófilos).

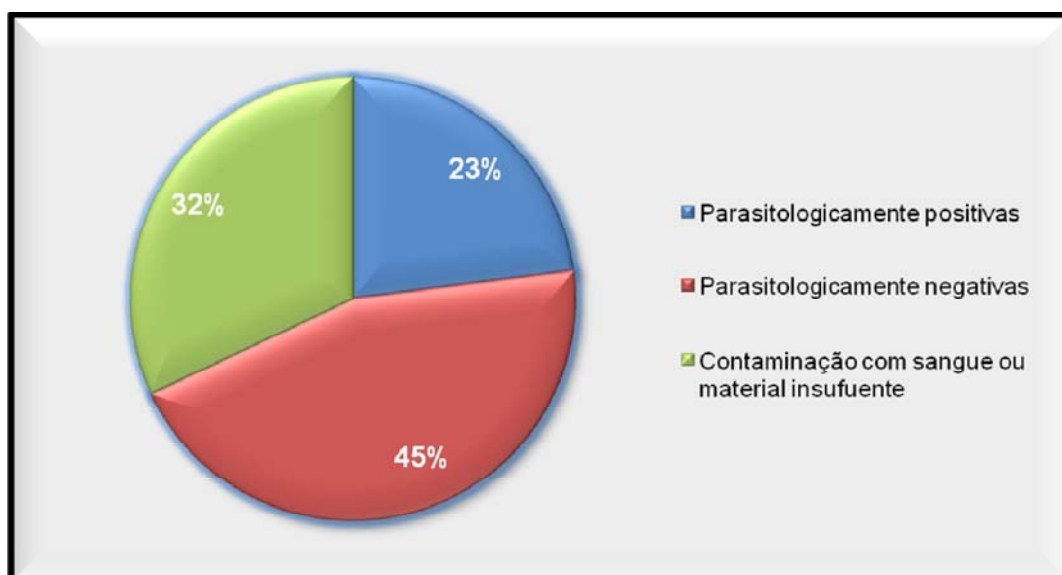


Figura 13. Frequência (%) dos envoltimentos articulares observados nos exames citológicos do líquido sinovial, de 55 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e negativos para erliquiose canina. (Araçatuba – SP, 2009)

Entretanto, nos animais restantes (45/100), estes positivos para leishmaniose visceral canina e erliquiose canina concomitantemente, 27,2% (98/360) das articulações apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* sp. no líquido sinovial (Figura 14), sendo as articulações carpais (27/98) e tarsais (25/98) as mais comumente acometidas, seguidas das articulações dos joelhos (23/98) e dos cotovelos (23/98).

Em 69,4% (68/98) das amostras de líquido sinovial com a presença do parasito ocorreu aumento da celularidade, sendo 63,23% (43/68) por neutrófilos, e esses hipersegmentados, 51,47% (35/68) com predomínio de células mononucleares, enquanto 30,6% (30/98) das articulações encontravam-se dentro dos padrões de normalidades quanto à celularidade (FERNANDES, 2009).

De um total de 207 articulações de cães sorologicamente positivos para *Ehrlichia* sp e sem a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp., 41% (85/207) apresentaram aumento de celularidade, sendo que 62,35% (53/85) tinham predomínio de células mononucleares e 37,65% (35/85) de neutrófilos, e esses hipersegmentados. As alterações citológicas da sinóvia das articulações carpais representaram 18/85 (21,2%), as tarsais 22/85 (25,9%), joelhos 24/85 (28,3%) e os cotovelos por 21/85 (24,7%).

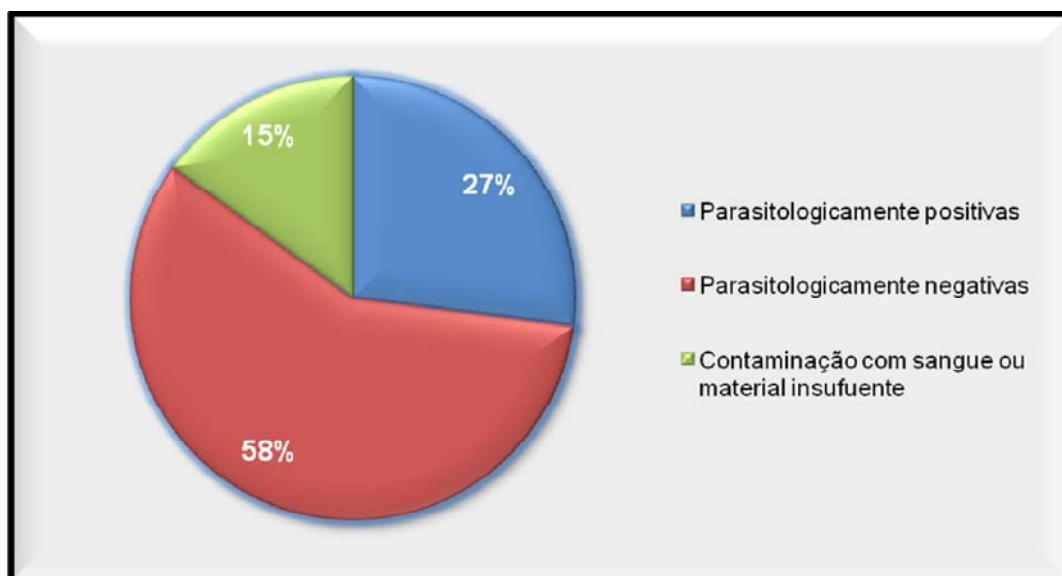


Figura 14. Frequências (%) dos envolvimento articulares observadas nos exames citológicos do líquido sinovial, de 45 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e positivos para erliquiose canina. (Araçatuba – SP, 2009)

Quando somados os achados da avaliação sinovial dos distintos grupos, percebeu-se que 24,87% (199/800) das articulações estavam parasitadas por formas amastigotas de *Leishmania* sp. (Figura 15), enquanto 50,63% (405/800) das articulações tinham ausência do parasito e 24,5% (196/800) apresentavam contaminação sanguínea ou material insuficiente para análise. Das 199 amostras de líquido sinovial em que se identificaram formas amastigotas de *Leishmania* sp., 56 (28,14%) possuíam citologia normal e 143 (71,85%) alterada. Da mesma forma em situações em que o líquido sinovial não estava parasitado 51% (206/404) estavam dentro dos limites de normalidade e 49% (198/404) apresentavam-se anormais.

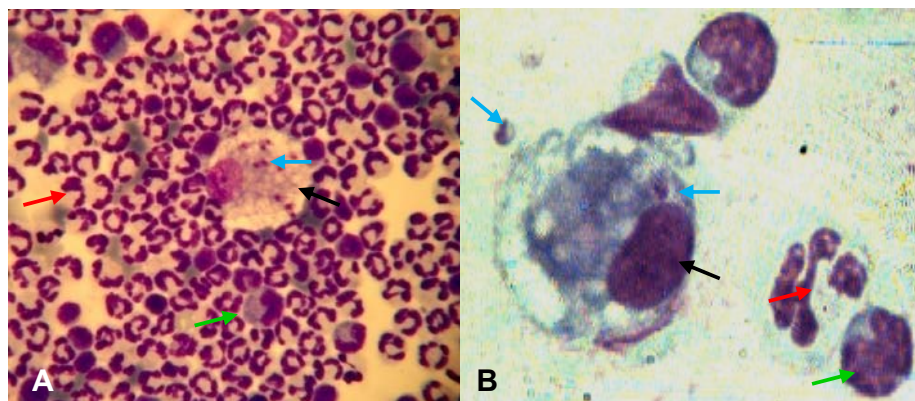


Figura 15. Avaliação citológica de líquido sinovial de cão acometido por leishmaniose visceral. Imagens com intensa neutrofilia (seta vermelha), linfócitos (seta verde), macrófago (seta preta) fagocitando forma amastigota de *Leishmania* sp. (seta azul), coloração panótica, aumento de 400X (A) e 1000X (B). (Araçatuba – SP, 2009)

V. DISCUSSÃO

Neste estudo, 88% (88/100) dos animais foram positivos por meio da citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodos, valor este superior aos 57,30% (51/89) de positividade em cães naturalmente infectados provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral relatados por Moreira et al. (2007). Slappendel & Ferrer (1990) descrevem que a prevalência da LV em cães de áreas endêmicas pode atingir entre 20 e 40% da população, diferindo de Ferrer (2002) que relata uma prevalência de cães infectados superior a 50%. Segundo Albuquerque et al. (2005), no Brasil, a prevalência em áreas endêmicas pode chegar a 46,6%, valores esses bem inferiores à taxa de positividade (74%) encontrada no presente estudo por meio da técnica de ELISA. A avaliação citológica de linfonodo, para a investigação direta de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* também tem sido empregada como outra técnica de diagnóstico para a enfermidade. Por se tratar de um estudo clínico e não epidemiológico, como os supracitados, é provável que esta maior positividade deva-se ao fato da amostragem ter sido intencional, selecionando-se cães do CCZ e, portanto, com maior probabilidade de serem portadores de LV. Esta deve ser também a razão pela qual um maior número de positividade foi obtido pela CAAF do que pelo método de ELISA.

Com relação à predisposição etária, a maior parte dos animais apresentava idade entre 12 e 24 meses (45%) e 25 e 48 meses (30%), confirmando os achados descritos por Sonoda (2007) e Miranda (2008), que referem maior casuística em cães adultos jovens. Esses achados conflitam com Ferrer (1992), Noli (1999) e Feitosa et al. (2000) que não evidenciaram predisposição quanto à faixa etária.

No que tange à predisposição sexual, no presente estudo não houve predisposição sexual para LV, corroborando com os relatos de Ferrer (1992), Noli (1999), Feitosa et al. (2000), Sonoda (2007) e Miranda et al. (2008).

Quanto à predisposição racial, o presente ensaio constatou que 66% (66/100) dos cães com leishmaniose visceral não apresentavam precisa definição racial e 34% (34/100) tinham raça definida, divergindo dos relatos de Sonoda (2007) que descreve uma casuística de 66,7% da doença em animais de raça pura, tais como Poodle (20,8%), Labrador (20,8%), Boxer (12,5%), Chow-Chow (8,3%) e Teckel (8,3%). Esses dados tornam-se conflitantes, pois a autora avaliou apenas 36 cães domiciliados e provenientes de um hospital escola. No presente estudo os animais eram, em sua maioria, errantes e provenientes do Centro de Controle de Zoonoses.

No presente estudo, 38% dos animais apresentavam quadros clínicos compatíveis com artrite ou poliartrite, concordando com os achados de Agut et al. (2003), que ao avaliarem 58 cães de área endêmica para *Leishmania* sp., descreveram que 44,8% apresentavam distúrbios osteoarticulares. Alterações ortopédicas têm sido descritas como incomuns em cães com leishmaniose visceral, segundo Kontos & Koutinas (1993), fato também demonstrado por Feitosa et al. (2000), que relataram o envolvimento locomotor em apenas nove animais de 215, o que difere de Turrel & Pool (1982) e Slappendel (1988), onde observaram alterações em 30% dos casos.

No presente estudo, dos 100 cães com leishmaniose visceral, 83 (83%) apresentaram alterações osteoarticulares à avaliação radiográfica, o que difere dos resultados encontrados por Agut et al. (2003), que relataram a presença de osteoartrite em 57,7% dos animais portadores de leishmaniose visceral. Acredita-se que a presente discordância pode ter sido observada, uma vez que os autores utilizaram uma amostragem inferior e apenas examinaram animais sintomáticos. No Brasil, alterações locomotoras em cães infectados por *Leishmania chagasi* foram descritas por Bevilacqua et al. (2002), Souza et al. (2005), Santos et al. (2006), Silva et al. (2007a), Silva et al. (2007b), Silva et al. (2007c) e Paraboni et al. (2008). Entretanto, não foi possível confrontar tais relatos com os nossos resultados, no que diz respeito à frequência de ocorrência, uma vez que os mesmos relataram caso clínico de um único animal.

Por meio da avaliação radiográfica verificou-se um envolvimento das articulações de forma bilateral e com maior frequência nas junções distais: tíbio-társica-metatársicas (társicas) com 75% (75/100) e rádio-cárpica-metacárpicas (cárpicas) esquerda e direita com 54% (54/100) e 52% (52/100) respectivamente, corroborando os achados de Turrel & Pool (1982), Buracco et al. (1997), Agut et al. (2003), Santos et al. (2006), Silva et al. (2007a), Silva et al. (2007b) e Silva et al. (2007c). Com menor frequência observou-se o acometimento das articulações úmero-rádio-ulnar (cotovelo) esquerda e direita, com 26% (26/100) e 24% (24/100) respectivamente, e finalmente as fêmuro-tíbio-fibular (joelho) esquerda com 11% (11/100) e a direita com 10% (10/100), com comportamento semelhante às articulações distais, quando do envolvimento bilateral. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Turrel & Pool (1982), Spreng, 1993, Wolschrijn et al. (1996), Agut et al. (2003), Souza et al. (2005). Provavelmente esse achado deve-se à conformação articular, pois essas articulações são maiores e menos complexas quando comparadas com as distais supracitadas. Há de se considerar que as diferenças hemodinâmicas possam também colaborar para maior comprometimento das articulações distais, a semelhança do que ocorre com os hemoparasitos que são mais facilmente encontrados em amostra de sangue periférico.

Alterações radiográficas como osteólise periosteal foram observadas em 18,12% das articulações, semelhante ao descrito por Wolschrijn et al. (1996), Koutinas et al. (1999), Blavier et al. (2001), McConkey et al. (2002) e Agut et al. (2003), sugerindo que esses animais encontravam-se em uma fase avançada da doença. Entretanto, também foram observadas áreas de lise óssea associadas a processos proliferativos ósseos em 3,98% das articulações e proliferação óssea periosteal em 2,65%, resultados também reportados por Buracco et al. (1997), que sugerem ser incomum esses achados e podem ser interpretados como resultado de uma infecção crônica. Diferentemente, Agut et al. (2003), observaram maior frequência de sinais radiográficos de proliferação

óssea e periosteal por terem selecionado em seu estudo um maior número de cães com quadro agudo ou subaguda da doença.

Alterações radiográficas como trabeculado ósseo grosseiro e esclerose subcondral também foram observadas em 28,62% e 20,77% das articulações, respectivamente, podendo ser interpretadas como uma evidência de infecção inicial, segundo Turrel & Pool (1982). O aumento de opacidade do canal medular foi observado em um dos casos estudados, fato observado também por Turrel & Pool (1982) e Agut et al. (2003), que associaram esta alteração com a infecção por via hematogena. Ocorrências como edema de partes moles (12,93%) e colapso articular (12,71%), também foram encontradas no presente ensaio, conforme observado em estudos pretéritos relatados por Turrel & Pool (1982), Yamaguchi et al. (1983), Cucinotta et al. (1991), Spreng (1993), Wolschrin et al. (1996), Buracco et al. (1997) e Silva et al. (2007a), fato associado a uma possível infecção sinovial.

Neste estudo, as amostras de líquido sinovial apresentaram baixo volume e a com contagem diferencial de células nucleadas fora o teste usualmente realizado, bem como a pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania* sp., limitação também descrita por Agut et al. (2003) e associada à dificuldade de colheita.

A visualização do parasito em macrófagos no líquido sinovial já havia sido relatada por Yamaguchi et al. (1983), Spreng (1993) e Buracco et al. (1997), o que corrobora com os resultados do presente estudo, onde 24,87% (199/800) das articulações foram positivas para a presença de *Leishmania* sp. O aumento anormal do número de neutrófilos no líquido sinovial de cães com leishmaniose visceral também foi observado por Cucinotta et al. (1991), Spreng (1993), Buracco et al. (1997) e Agut et al. (2003), em conformidade com os resultados aqui demonstrados, onde 71,85% (143/199) das amostras apresentaram neutrofilia e presença do protozoário. Alteração de celularidade indicando inflamação também ocorreu em 49% (198/404) das amostras de líquido sinovial sem a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. Contudo, deve-se levar em consideração que a não visualização de formas

amastigotas de *Leishmania* sp. no líquido sinovial não exclui a infecção, sendo importante a realização de outras técnicas de diagnóstico mais sensíveis, a exemplo da reação em cadeia de polimerase e a imunohistoquímica. Corroborando propostas para a patogênese da poliartrite associada à leishmaniose visceral canina que segundo Agut et al. (2003) a poliartrite ocorre como consequência de uma inflamação granulomatosa da sinóvia causada pela presença da leishmania ou pela deposição de imunocomplexos na sinóvia, levando a uma sinovite e poliartrite, segundo Cucinotta et al. (1991) e Ferrer (1992).

VI. CONCLUSÃO

1. As alterações radiográficas de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. são difusas, bilaterais, predominantemente distais, porém não patognomônicas.
2. As lesões osteoarticulares de cães com leishmaniose visceral são predominantemente do tipo erosiva, sugerindo cronicidade do processo.
3. A maioria das alterações radiográficas articulares de cães acometidos por leishmaniose visceral não estão associadas à presença do parasito na sinóvia, sugerindo que a etiopatogenia das lesões articulares não é devida exclusivamente à presença do parasito.
4. As alterações citológicas do líquido sinovial não contribuíram para o diagnóstico da poliartrite causada por leishmaniose visceral, enquanto a pesquisa da forma amastigota de *Leishmania* sp. na sinóvia mostrou-se uma boa alternativa para o diagnóstico da doença, especialmente em cães portadores de alterações clínico-radiográficas do carpo e tarso.

7. REFERÊNCIAS

AGUT, A.; CORZO, N.; MURCIANO, J.; LAREDO, F.G.; SOLER, M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs whit leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.153, p.648-652, 2003.

AKERBLOM, S.; SJÖSTRÖM, L. Evaluation of clinical, radiographical and cytological findings compared to arthroscopic findings in shoulder joint lameness in the dog. **Veterinary and Comparative Orthopedics and Traumatology**,v.2, p.136-141,2007

ALBUQUERQUE, A.R.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G.; BRITO, F.L.C.; SÁ, F.B.; PINA, F.; GOMES, Y.M.; ALVES, R. Ocorrência da leishmaniose visceral canina no município de Amaraji, Estado de Pernambuco, Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 1, 2005, Guarapari, Espírito Santo. **Anais...** Guarapi, p.27-30.

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

BARATA,R.A.; SILVA, J.C.F.; MAYRINK, W.; PRATA, A.; LOROSA, E.S.; FIUZA, J.A.; GONÇALVES, C.M.; PAULA, K.M.; DIAS, E.S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica para leishmaniose visceral. Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.5, p.421-425, 2005.

BARBIÉRI, C.I. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, p.329-337, 2006.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A.; Leishmaniose tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BENNETT, D.B.; MAY, C. Joint diseases of dogs and cats. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal medicine**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1995. p.2032-2077.

BEVILACQUA, L.; MAIA, C.A.A.; ZANETTI, M.F. Ocorrência de osteoartrite em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 2007, São Paulo, São Paulo, **Anais...** São Paulo, 2002. p.10.

BLAVIER, A.; KEROAK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÈ, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine Leishmaniosis, **The Veterinary Journal**, v.162, p.108-120, 2001.

BOON, D. Synovial fluid analysis: A guide for small-animal practitioners, **Veterinary Medicine**. v.92, p.443-451, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 122p.

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.

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

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic

Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

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, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4+T cells participate in the nephroathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.12, p.1455-1458, 2000.

CUCINOTTA, G.; IANNELLI, N.; MUSICÒ, M.; LOMBARDO, N. Singolare forma di Leishmaniosi: lesioni osteoarticolari bilaterali del carpo e del tarso in un cane. **Praxis Veterinaria**, v.12, p.12-14, 1991.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênica para o homem. **O Hospital**, v.XI, n.2, p.5-9, 1937.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista Saúde Pública**, v.40, n.3, p.537-541, 2006.

DAY, M.J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.2-8, 2007.

DE BIASE, F; RAHAL, S. C; LOPES, R. S. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arquivo Brasileiro Medicina e Zootecnia** v. 53, n. 5, p. 563-567, 2001.

DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, n.2, p.213-216, 2000.

DE MARTIN, B.W.; IWASAKI, M. **Noções de radiodiagnóstico veterinário**. São Paulo: [s.n.], 1976. 50 p.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medicine Journal**, p.79, 1903.

EUGÊNIO, F.R. Semiologia do sistema locomotor de cães e gatos. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária a Arte do Diagnóstico**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.553-579.

EUGÊNIO, F.R.; SILVA, A.A.L.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F.; BONELLO, F.L. Estudo clínico-laboratorial das articulações na leishmaniose experimental em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.2, ago., p.278-287, 2008.

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**. anoV, n.28, p.36-44, 2000.

FERNANDES, P.J. Análise de líquido sinovial. In: CROWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos**. 3.ed. São Paulo: MedVet, 2009. p.193-209.

FERNANDEZ, F.R.; GRINDEM, C.B.; LIPOWITZ, A.J. Sinovial fluid analysis: Preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. **Journal of the American Hospital Association**, v.19, p.727-734, 1983.

FERRARO, G.C.; MACHADO, G.F.; BUENO DE CAMARGO, M.H.; SIMÕES, C.B.; VIEIRA, C.M.; COSTA, D.C.; GOMES, A.A.D.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Histopathological evaluation of the skeletal muscle of dogs with visceral leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE (ACVIN) FORUM, 2009, Montreal, **Proceedings...** Montreal, 2009.

FERRARO, G.C.F. **Avaliação eletrofisiológica e histopatológica do músculo estriado esquelético em cães naturalmente acometidos pela leishmaniose visceral**. 2008, 90f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

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

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. **Current veterinary therapy: small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p.266-270.

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

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla, Spain. **Proceeding...** Salamanca: Intervet bv, 2002. p. 21.

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.

FISHER, D.J. Sistema musculoesquelético. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Atlas de citologia de cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. cap. 12, p. 265–268.

FONT, A.; ROURA, X.; FONDEVILA, D.; CLOSA, J.M.; MASCORT, J.; FERRER, L. Canine mucosal leishmaniasis. **Journal of the American Hospital Association**, v. 32, p. 131-137, 1996.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.6, p.161-173, 2003.

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

GIUNCHETTI, R. C.; FILHO-MARTINS, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node 84 in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.121, p.23-33, 2008a.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.269-277, 2008b.

GOMES, A.A.D.; FERRARO, G.C.; LAURENTI, M.D.; BUENO DE CAMARGO, M.H.; COSTA, D.C.; SIMÕES, C.B.; VIEIRA, C.M.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Immunohistochemical evaluation of the skeletal muscle in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29 (Supl.), 2009.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

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

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

GREENE, C.E. & BUDSBERG, S.C. Musculoskeletal infections. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3.ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p.837-840.

HOULTON, J.E.F. Ancillary aids to the diagnosis of joint disease. In: COLLINSON, R.W.; HOULTON, J.E.F. **Manual of Small Animal Arthrology**. Cheltenham, UK, British Small Animal Veterinary Association, 1994. p.22-38.

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

JACQUES, D.; CAUZINILLE, L., BOUVY, B.; DUPRE G. A retrospective study of 40 dogs with polyarthritis. **The American College of Veterinary Surgeons**, v.31, p. 428-434, 2002.

JERONIMO, S.M.B.; SOUSA, A.Q.; PEARSON, R.D. Leishmaniose. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Tratado de Medicina Interna**, 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.2434.

KEALY, J. K. ; McALLISTER, H. Bones and joints. In: _____. **Diagnostic radiology & ultrasonography of the dog and cat**. 4. Ed. St. Louis: Elsevier, 2005. Cap. 4, p. 299.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World Canine Leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education Small Animal**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.35, n.5, p.376-383, 1999.

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

LAURENTI, M.D.; MARCONDES, M.; ROSSI, C.N.; IKEDA-GARCIA, F.A.; TOMOKANE, T.Y.; RIZZARD, R.L.; SECUNDINO, N.F.C.; CORBETT, C.E. Canine leishmaniasis: Potential of symptomatic and asymptomatic dogs in the parasite transmissibility to the vector. 2009, **4th World Congress on Leishmaniasis – WordLeish4**, p.271, 2009.

LAVERAN, C.L.A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lou. Et mean) Parasite d'une fièvre d'Inde. **C.R.Hebd.Acad.Sci.**, n.137, p.957-961, 1903.

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

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F. et al. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human, health hazard. **Journal Small Animal Practice**, v.24, n.1, p.29-30, 1983.

LOZIER, S.M.; MENARD, M. Arthrocentesis and synovial fluid analysis. In: BOJRAB, M.J. **Current techniques in small animal surgery**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1998. p.1057-1062.

MARCONDES, M. **Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina**. 2008. 154f. Tese (Livre-docência). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Araçatuba, 2008.

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

MCCONKEY, S. E. LÓPEZ, A.; SHAW, D.; CALDER, J. Leishmanial polyarthritis in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v.43, p.607, 2002.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.162, n.3-4, p.248-256, 2009.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2007, p.67-83.

MIGONE, L.E. Um caso de Calazar em Assuncion (Paraguai). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, p.118-120, 1973. IN: LEASON, R.; SHAW, J.J. **The Leishmaniasis**, p.115.

MIRANDA, S.; ROURA, X.; PICADO, A. FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Veterinary Science**. v.85, p.35-38, 2008.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, p.491-493, 1994.

MOREIRA, M.A.B; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245, 2007.

NICOLE, C. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. **Archives Institute Pasteur de Tunisia**, v.3, p.1-26, 1908.

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

PACIELLO, O.; OLIVA, G.; GRADONI, L.; MANNA, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; WOJCIK, S.; TRAPANI, F.; PAPPARELLA, S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular disorders**, v.19, n.2, p.124-130, 2008.

PARABONI, C.; FRANCO, P.A.; MATTEI, D.R. Poliartrite por leishmaniose visceral canina: relato de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 2008, Gramado, Rio Grande do Sul, **Anais...** Gramado, 2008.

PEDERSEN, N.C. Synovial fluid collection and analysis. **Veterinary Clinics North America**, v.8, p.495-499, 1978.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasilian Medicine**, v.48, p.949-953, 1934.

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, 1999.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.128, n.1-3, p.87-95, 2009.

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

RIBEIRO, C.R. **Aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão do Distrito Federal – DF – Brasil**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

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

ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2, p.1401, 1903.

ROSSI, C.N. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do Município de Araçatuba – São Paulo – Brasil**. 2007, 87f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2007.

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.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; ASSUNÇÃO, M.; MATOS, A.J.F. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.340-344, 2006.

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: www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/LVA24ago03.pdf Acesso em 05 de julho de 2009.

SILVA, A.R.S.; VIEIRA, R.F.C.; GOMES, A.A.D.; AQUINO, M.C.C.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B.; CIARLINI, L.D.R.P.; CIARLINI, P.C. Cytological findings of synovial fluid from positive dogs for *Leishmania chagasi* in an endemic area of Brazil. In: PROCEEDINGS OF THE 60TH ANNUAL MEETING THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY PATHOLOGISTS AND 44TH THE AMERICAN SOCIETY FOR VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY, 2009, Monterey, California, **Proceedings...** Monterey, 2009. In Press.

SILVA, A.R.S.; GOMES, A.A.D.; VIEIRA, R.F.C.; CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L.D.R.P. Artrite em um cão naturalmente infectado por *Leishmania* sp. In: VII SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA E I SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – UNESP – CAMPUS ARAÇATUBA, 2007, Araçatuba, São Paulo, **Anais...** Araçatuba, 2007a.

SILVA, A.R.S.; ROSSI, C.N.; GOMES, A.A.D.; VIEIRA, R.F.C.; IKEDA-GARCIA, F.A.; CIARLINI, P.C.; CIARLINI, L.D.R.P.; FEITOSA, M.M. Osteoartrite por *Leishmania* sp. em cão Pitt Bull – Relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, n.2, p.730-732, 2007b.

SILVA, A.R.S.; VIEIRA, R.F.C.; GOMES, A.A.D.; BOMFIM, S.R.M.; CIARLINI, P.C.; GARCIA, A.D.; CIARLINI, L.D.R.P. Alterações osteoarticulares em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. In: II CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 2007, Fortaleza, Ceará, **Anais...** Fortaleza, 2007c.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v.96, n.3, p.285-291, 2001.

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.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1990. p.450-8.

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

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2007. 115p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SOUZA, A.I.; JULIANO, R.S.; GOMES, T.S.; DINIZ, S.A.; BORGES, A.M.; TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L. **Veterinary Parasitology**. v.129, p.51-54, 2005.

SPRENG, D., Leishmanial polyarthriti in two dogs. **Journal Small Animal Practice**. V.34, p.559 –563, 1993.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V.; SANTOS,D.R.; SANTOS, A.R.; SANTOS, E.S.; OLIVEIRA, O.; KUHL, J.B.; ALBERTON, D. Influência da reorganização, da limpeza do peridomicílio e a da desinsetização de edificações na densidade populacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. **Caderno e Saúde Pública**,v.19, n.6, p.1801-1813, 2003.

TODHUNTER, R.J.; JOHNSTON, S.A.; Osteoarthritis. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003. p.2208-2246.

TURREL, J.M.; POOL, R.R. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Radiology**, v.23, n.6, p.243-249, 1982.

VAN PELT, P.W.; Interpretation of synovial fluid in the horse. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.165, p.91-95, 1974.

VIDES, J.P.; GOMES, A.A.D.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba – São Paulo State (Brazil). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29 (Supl.), 2009.

VIEIRA, R.F.C.; VIOL, M.A.; SILVA, A.R.S.; GOMES, A.A.D.; GARCIA, A.D.; CIARLINI, P.C.; BOMFIM, S.R.M. Diagnóstico de leishmaniose canina através de método parasitológico direto. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 2; 2007, Fortaleza, Ceará, **Anais...** Fortaleza, 2007, p.204.

WILKINS, R.J. Joint Fluid analysis. In: BOJRAB, M.J. **Disease mechanisms in small animal surgery**. 2.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.705-710.

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

World Health Organization (WHO). **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. 2000. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>. Acesso em 05 de julho de 2009.

World Health Organization (WHO). Executive Board 118th Session. **Control of leishmaniasis**. 2006.

YAMAGUSCHI, R.A.; FRENCH, T.W.; SIMPSON, G.F.; HARVEY, J.W.
Leishmania donovani in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis.
Journal of American Animal Hospital Association, v.19, p.723-726, 1982.

APÊNDICES

Apêndice A – Densidades ópticas médias (DO), obtidas por meio da técnica de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, no soro de 154 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba - SP. (Araçatuba - SP, 2009)

Animal	DO	Resultado	Animal	DO	Resultado
1	0,316	Reagente	36	0,208	Não Reagente
2	0,175	Não Reagente	37	0,249	Não Reagente
3	0,180	Não Reagente	38	0,079	Não Reagente
4	0,132	Não Reagente	39	0,515	Reagente
5	0,104	Não Reagente	40	0,057	Não Reagente
6	0,084	Não Reagente	41	0,314	Reagente
7	0,169	Não Reagente	42	0,057	Não Reagente
8	0,031	Não Reagente	43	0,140	Não Reagente
9	0,051	Não Reagente	44	0,030	Não Reagente
10	0,117	Não Reagente	45	0,480	Reagente
11	0,046	Não Reagente	46	0,083	Não Reagente
12	0,084	Não Reagente	47	0,587	Reagente
13	0,315	Reagente	48	0,245	Não Reagente
14	0,261	Não Reagente	49	0,040	Não Reagente
15	0,182	Não Reagente	50	0,062	Não Reagente
16	0,072	Não Reagente	51	0,655	Reagente
17	0,286	Reagente	52	0,610	Reagente
18	0,030	Não Reagente	53	0,023	Não Reagente
19	0,222	Não Reagente	54	0,020	Não Reagente
20	0,159	Não Reagente	55	0,037	Não Reagente
21	0,036	Não Reagente	56	0,616	Reagente
22	0,063	Não Reagente	57	0,554	Reagente
23	0,276	Reagente	58	0,406	Reagente
24	0,227	Não Reagente	59	0,326	Reagente
25	0,137	Não Reagente	60	0,025	Não Reagente
26	0,107	Não Reagente	61	0,289	Reagente
27	0,130	Não Reagente	62	0,489	Reagente
28	0,110	Não Reagente	63	0,491	Reagente
29	0,161	Não Reagente	64	0,201	Não Reagente
30	0,069	Não Reagente	65	0,037	Não Reagente
31	0,192	Não Reagente	66	0,447	Reagente
32	0,145	Não Reagente	67	0,085	Não Reagente
33	0,121	Não Reagente	68	0,124	Não Reagente
34	0,261	Não Reagente	69	0,034	Não Reagente
35	0,167	Não Reagente	70	0,404	Reagente

continua...

continuação...

71	0,367	Reagente	113	0,158	Não Reagente
72	0,388	Reagente	114	0,059	Não Reagente
73	0,559	Reagente	115	0,154	Não Reagente
74	0,187	Não Reagente	116	0,305	Reagente
75	0,375	Reagente	117	0,411	Reagente
76	0,069	Não Reagente	118	0,196	Não Reagente
77	0,088	Não Reagente	119	0,082	Não Reagente
78	0,079	Não Reagente	120	0,601	Reagente
79	0,598	Reagente	121	0,101	Não Reagente
80	0,488	Reagente	122	0,495	Reagente
81	0,323	Reagente	123	0,361	Reagente
82	0,433	Reagente	124	0,760	Reagente
83	0,084	Não Reagente	125	0,219	Não Reagente
84	0,202	Não Reagente	126	0,417	Reagente
85	0,375	Reagente	127	0,767	Reagente
86	0,237	Não Reagente	128	0,150	Não Reagente
87	0,484	Reagente	129	1,073	Reagente
88	0,289	Reagente	130	0,241	Não Reagente
89	0,437	Reagente	131	0,860	Reagente
90	0,361	Reagente	132	0,920	Reagente
91	0,617	Reagente	133	0,097	Não Reagente
92	0,374	Reagente	134	0,410	Reagente
93	0,480	Reagente	135	1,124	Reagente
94	0,484	Reagente	136	1,064	Reagente
95	0,607	Reagente	137	1,049	Reagente
96	0,551	Reagente	138	0,870	Reagente
97	0,488	Reagente	139	0,347	Reagente
98	0,389	Reagente	140	1,040	Reagente
99	0,065	Não Reagente	141	1,097	Reagente
100	0,152	Não Reagente	142	1,073	Reagente
101	0,352	Reagente	143	0,972	Reagente
102	0,087	Não Reagente	144	0,845	Reagente
103	0,075	Não Reagente	145	0,715	Reagente
104	0,511	Reagente	146	0,785	Reagente
105	0,177	Não Reagente	147	0,254	Não Reagente
106	0,201	Não Reagente	148	0,817	Reagente
107	0,425	Reagente	149	0,045	Não Reagente
108	0,148	Não Reagente	150	0,216	Não Reagente
109	0,169	Não Reagente	151	0,746	Reagente
110	0,257	Não Reagente	152	0,376	Reagente
111	0,171	Não Reagente	153	0,422	Reagente
112	0,298	Reagente	154	1,129	Reagente

Apêndice B – Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em preparados citológicos obtidos por citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo de 154 cães provenientes do município de Araçatuba - SP. (Araçatuba - SP, 2009)

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

continua...

continuação...

71	+	Positivo	113	-	Negativo
72	+	Positivo	114	-	Negativo
73	+	Positivo	115	-	Negativo
74	-	Negativo	116	-	Negativo
75	+	Positivo	117	+	Positivo
76	+	Positivo	118	-	Negativo
77	-	Negativo	119	-	Negativo
78	-	Negativo	120	+	Positivo
79	-	Negativo	121	+	Positivo
80	+	Positivo	122	+	Positivo
81	+	Positivo	123	-	Negativo
82	+	Positivo	124	+	Positivo
83	-	Negativo	125	+	Positivo
84	+	Positivo	126	+	Positivo
85	+	Positivo	127	-	Negativo
86	+	Positivo	128	-	Negativo
87	+	Positivo	129	-	Negativo
88	-	Negativo	130	+	Positivo
89	+	Positivo	131	+	Positivo
90	+	Positivo	132	+	Positivo
91	+	Positivo	133	-	Negativo
92	+	Positivo	134	-	Negativo
93	+	Positivo	135	+	Positivo
94	+	Positivo	136	+	Positivo
95	-	Negativo	137	+	Positivo
96	+	Positivo	138	+	Positivo
97	+	Positivo	139	+	Positivo
98	+	Positivo	140	+	Positivo
99	+	Positivo	141	-	Negativo
100	+	Positivo	142	+	Positivo
101	+	Positivo	143	+	Positivo
102	-	Negativo	144	+	Positivo
103	-	Negativo	145	+	Positivo
104	+	Positivo	146	+	Positivo
105	-	Negativo	147	+	Positivo
106	-	Negativo	148	+	Positivo
107	+	Positivo	149	-	Negativo
108	-	Negativo	150	-	Negativo
109	-	Negativo	151	+	Positivo
110	-	Negativo	152	+	Positivo
111	-	Negativo	153	+	Positivo
112	-	Negativo	154	+	Positivo

Apêndice C – Resultados individuais para a pesquisa de leishmaniose visceral em preparados citológicos obtidos por meio de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) de linfonodo e sorologia por meio da técnica de ELISA em 154 cães provenientes do município de Araçatuba – SP. (Araçatuba – SP, 2009)

Animal	CAAF	ELISA	Resultado
1	Positivo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Negativo	Positivo
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	Positivo	Negativo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo
13	Positivo	Positivo	Positivo
14	Positivo	Negativo	Positivo
15	Positivo	Negativo	Positivo
16	Negativo	Negativo	Negativo
17	Positivo	Positivo	Positivo
18	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Positivo	Positivo
24	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo
27	Positivo	Negativo	Positivo
28	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo
31	Positivo	Negativo	Positivo
32	Positivo	Negativo	Positivo
33	Positivo	Negativo	Positivo
34	Positivo	Negativo	Positivo
35	Positivo	Negativo	Positivo

continua...

continuação...

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

continua...

continuação...

71	Positivo	Positivo	Positivo
72	Positivo	Positivo	Positivo
73	Positivo	Positivo	Positivo
74	Negativo	Negativo	Negativo
75	Positivo	Positivo	Positivo
76	Positivo	Negativo	Positivo
77	Negativo	Negativo	Negativo
78	Negativo	Negativo	Negativo
79	Negativo	Positivo	Positivo
80	Positivo	Positivo	Positivo
81	Positivo	Positivo	Positivo
82	Positivo	Positivo	Positivo
83	Negativo	Negativo	Negativo
84	Positivo	Negativo	Positivo
85	Positivo	Positivo	Positivo
86	Positivo	Negativo	Positivo
87	Positivo	Positivo	Positivo
88	Negativo	Positivo	Positivo
89	Positivo	Positivo	Positivo
90	Positivo	Positivo	Positivo
91	Positivo	Positivo	Positivo
92	Positivo	Positivo	Positivo
93	Positivo	Positivo	Positivo
94	Positivo	Positivo	Positivo
95	Negativo	Positivo	Positivo
96	Positivo	Positivo	Positivo
97	Positivo	Positivo	Positivo
98	Positivo	Positivo	Positivo
99	Positivo	Negativo	Positivo
100	Positivo	Negativo	Positivo
101	Positivo	Positivo	Positivo
102	Negativo	Negativo	Negativo
103	Negativo	Negativo	Negativo
104	Positivo	Positivo	Positivo
105	Negativo	Negativo	Negativo

continua...

continuação...

106	Negativo	Negativo	Negativo
107	Positivo	Positivo	Positivo
108	Negativo	Negativo	Negativo
109	Negativo	Negativo	Negativo
110	Negativo	Positivo	Positivo
111	Negativo	Negativo	Negativo
112	Positivo	Positivo	Positivo
113	Negativo	Negativo	Negativo
114	Negativo	Negativo	Negativo
115	Negativo	Negativo	Negativo
116	Negativo	Positivo	Positivo
117	Positivo	Positivo	Positivo
118	Negativo	Negativo	Negativo
119	Negativo	Negativo	Negativo
120	Positivo	Positivo	Positivo
121	Positivo	Negativo	Positivo
122	Positivo	Positivo	Positivo
123	Negativo	Positivo	Positivo
124	Positivo	Positivo	Positivo
125	Positivo	Negativo	Positivo
126	Positivo	Positivo	Positivo
127	Negativo	Positivo	Positivo
128	Negativo	Negativo	Negativo
129	Negativo	Positivo	Positivo
130	Positivo	Negativo	Positivo
131	Positivo	Positivo	Positivo
132	Positivo	Positivo	Positivo
133	Negativo	Negativo	Negativo
134	Negativo	Positivo	Positivo
135	Positivo	Positivo	Positivo
136	Positivo	Positivo	Positivo
137	Positivo	Positivo	Positivo
138	Positivo	Positivo	Positivo
139	Positivo	Positivo	Positivo
140	Positivo	Positivo	Positivo

continua...

continuação...

141	Negativo	Positivo	Positivo
142	Positivo	Positivo	Positivo
143	Positivo	Positivo	Positivo
144	Positivo	Positivo	Positivo
145	Positivo	Positivo	Positivo
146	Positivo	Positivo	Positivo
147	Positivo	Negativo	Positivo
148	Positivo	Positivo	Positivo
149	Negativo	Negativo	Negativo
150	Negativo	Negativo	Negativo
151	Positivo	Positivo	Positivo
152	Positivo	Positivo	Positivo
153	Positivo	Positivo	Positivo
154	Positivo	Positivo	Positivo

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.