



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

**AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA *Leishmania* spp. E
Trypanosoma cruzi EM GATOS DOMÉSTICOS PROCEDENTES
DA ASSOCIAÇÃO PROTETORA DOS ANIMAIS DO
MUNICÍPIO DE ILHA SOLTEIRA, SP, BRASIL**

MARIA FERNANDA ALVES MARTIN

Botucatu-SP
2013

MARIA FERNANDA ALVES MARTIN

**AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA PARA *Leishmania* spp. E
Trypanosoma cruzi EM GATOS DOMÉSTICOS PROCEDENTES
DA ASSOCIAÇÃO PROTETORA DOS ANIMAIS DO
MUNICÍPIO DE ILHA SOLTEIRA, SP, BRASIL**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade de
Medicina de Botucatu/UNESP para
obtenção de título de mestre.**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Simone Baldini Lucheis

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti

Botucatu-SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Alves-Martin, Maria Fernanda.

Avaliação diagnóstica para *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* em gatos domésticos procedentes da associação protetora dos animais do município de Ilha Solteira, SP, Brasil / Maria Fernanda Alves Martin. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Wilma Aparecida Starke Buzetti

Capes: 21301026

1. Leishmaniose. 2. Gato – Doenças. 3. Tripanossomose – Diagnóstico.
4. *Trypanosoma cruzi*. 5. Solteira, Ilha (SP)

Palavras-chave: Diagnóstico; Gato; Leishmaniose; Tripanossomíase.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Pedro e DÍva,

*Pela educação, amor, incentivo, confiança e orações que me
permitiram chegar até aqui.*

*A força e o exemplo de vida de vocês foram de grande importância
para que eu pudesse concluir mais esta etapa em minha vida.*

Amo vocês!

Aos meus irmãos, Arnaldo e Maria Luana (Naldo e Ninha),

*Pela atenção, carinho, apoio, alegrias e estímulo demonstrados;
Somos unidos não somente pelos laços sanguíneos, mas também pela
verdadeira amizade que existe entre nós;
É uma honra e orgulho ser irmã de vocês;
Muito obrigada pela presença de vocês em minha vida!*

Com Amor!

Ao meu Marido e o Amor da minha vida, Roger,

*Pelo amor, confiança, amizade, admiração e carinho que me fizeram
suportar a distância;*

*Pela paciência, palavras de incentivo, consolo, pelo seu sorriso e por
suas orações que me fortaleceram dia após dia;
Muito obrigada por estar sempre ao meu lado.*

Te amo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Aos cães e gatos da APAISA,
Que apenas amam, sem orgulho e preconceito.*

*“Poís existe apenas uma coisa em nós que os animais não têm: O
raciocínio, e ainda assim eles tentam nos ensinar o amor.”*

(Ket Antonio)

*“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação,
seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu
semelhante.”*

(Albert Schweitzer)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por fortalecer minha fé e esperança, por guiar-me em todos os momentos de minha vida e por permitir a realização dos desejos do meu coração.

Aos meus pais, Pedro e Diva, pela confiança, carinho e incentivo.

Ao meu marido, Roger, pelo amor verdadeiro.

Aos meus irmãos, Naldo e Ninha, pelo companheirismo e apoio.

Aos meus “novos pais”, Abimael e Marilaine, pelo carinho, atenção, apoio e orações.

Aos meus “novos irmãos”, Kátia, Abner e Wainer, pela amizade e carinho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Simone Baldini Luccheis, por me aceitar como orientada, pela oportunidade e confiança.

À Minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Wilma, por me orientar desde a iniciação científica e por acompanhar cada etapa deste trabalho, pelo incentivo, valiosos ensinamentos, e pelas demonstrações de carinho e amizade em todos os momentos. Aprendi muito com o seu exemplo de ser e agir.

Ao Marcelo Cilim, por autorizar a colheita de amostras dos gatos da APAISA, e pela receptividade e confiança durante todo o período do trabalho.

À Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado.

Ao Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, por permitir a realização de grande parte experimental do projeto em sua estrutura física.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira -FEIS-UNESP, pelo auxílio durante a realização dos exames de RIFI e ELISA.

Ao Laboratório da Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios -APTA/SAA, pela permissão da realização da técnica de hemocultura.

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

Ao Profº Drº Hélio Langoni docente Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, por disponibilizar o uso irrestrito do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses durante o aprendizado das técnicas sorológicas e moleculares.

Ao Profº Drº João Pessoa, docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências-UNESP, que permitiu o uso do Laboratório de Virologia durante o aprendizado e realização de técnicas moleculares.

À Profª Drª Angela Maria docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Faculdade de Medicina de Botucatu, e a Drª Virginia Bodelão Richini Pereira, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz, pelas sugestões no exame de Qualificação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

Ao Profº Drº Willian M. Dourado Coelho, docente da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina -FEA, por ceder amostras de controle positivo para a execução das técnicas sorológicas.

Ao Médico Veterinário Cláudio Nazaretian Rossi, pela contribuição e acessibilidade durante a realização do exame ELISA.

À Profª Drª Assistente Sueli Aparecida Calvi, pela atenção e contribuição prestadas durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos Médicos Veterinários Drº Rodrigo Costa da Silva e Diego Generoso pela dedicação, paciência e apoio técnico.

Ao biólogo Drº Rodrigo Mattos dos Santos, pela enorme paciência e eficiência durante a fase final e da pesquisa.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca pela paciência, atenção e serviços prestados.

Às funcionárias da limpeza, que sempre proporcionou um ambiente limpo e agradável para o trabalho.

Aos funcionários dos Laboratórios Experimentais, Carlinhos, Talísia, Du e Paulinho, pelos momentos de risadas entre um experimento e outro.

À Médica Veterinária Sueli “Su”, pelo grande auxílio e atenção durante a realização de trabalhos em paralelo.

À amiga Doutoranda Michely Tenório “Tia Michely”, pela amizade e a imensa contribuição e ajuda prestadas para a realização da pesquisa.

Às amigas do Laboratório de Doenças Tropicais, Francilene “Fran”, Mariana “Gattinho”, Mariana “Mizi”, Laura, Thatyane “Thaty”, Adriele “Drica”, Karen “Karezinha”, Eliana “Pananã”, Camila, Daniela “Dani”, Vanessa, Priscila, Gabriela, Gustavo “Gu” e Andréia, pelas trocas de informações, experiências e também pelos prazerosos momentos de risadas, “dancinhas” com Xbox e almoços diários na copa.

Aos amigos de Iniciação Científica, Diogo “Firmezza”, pela contribuição e eficiência no auxílio da colheita, processamento de materiais, na realização das técnicas sorológicas, bem como pelos diversos momentos que passamos juntos, desde o intenso trabalho em laboratório a viagens para congressos, juntamente com as meninas, Maria Luana “Xilêla”, Andrea “Lesma”, Marina “Poia”, Aline “Pomba”.

Às amigas eternas Luanda “Lu”, Tatiane “Tati”, Michele “Mi”, Mariana, Mayna, Michely, “MiNinaNana” Kênia, Fabiana “Fá”, Priscila “Pri”, Carol, Keila, Cinthia, Cristiane “Cris”, Sirlene “Sir”, Camila “Milla” e Kelly, que mesmo distantes, sempre me incentivaram, com mensagens, postais, ligações e encontros marcados e remarcados para se “jogar conversa fora”, comer bolo de chocolate e tortas de frango (rsrsrs).

Aos meus “filhos de coração” Guilherme e Sofia, pela inocência e pureza compartilhadas... amo vocês!

Às amigas de república Josiane “Josinha”, Priscila e Dona Maria, pelo ambiente tranquilo e familiar nesse tempo de agradável convivência.

À dona Marisa e o Srº José Paixão, pelo apoio prestado durante o início do mestrado, e pela cocada maravilhosa; e ao Jessé “Dentinho”, pelo grandioso auxílio na formatação do trabalho.

Às amigas-irmãs, que são presentes de Deus em minha vida: Mirian e Tamiris “Tyrollezza”; pelas demonstrações de sincera amizade, pelo carinho e paciência, pela dedicação e por todos os favores prestados, pelas noites e fins de semana que passamos no laboratório, por todas as “catacreses” (rsrsrsr), pelas conversas até tarde da noite no “cativeiro da Turquia” (rsrsrs), por todas as pizzas e lanches divididos, pela ajuda na escolha do vestido de noiva, pelas caronas cheias de bagagens até a rodoviária, pelos desabafos sem fim, por todas as vezes que foi dito: “você não sabe o que aconteceu”, por todas as refeições e sobremesas, pelo silêncio respeitado, pelas gargalhadas merecidas, pelos “quilinhos” a mais, pela cumplicidade e confiança. Obrigada por me fazerem tão bem.

Aos parentes, amigos, vizinhos, residentes, mestrandos, doutorandos e docentes que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

*"Confia no Senhor de todo o teu coração, e não se estríbes
em teu próprio entendimento."*

Provérbios 3:5

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses que acometem o homem e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos. É uma doença causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. O agente causador da leishmaniose visceral no Novo Mundo é *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), sendo *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor responsável pela sua transmissão. O gato doméstico também desenvolve a infecção, geralmente de forma assintomática, podendo atuar também como reservatório destes protozoários. Tendo em vista a inespecificidade dos achados clínicos da leishmaniose felina (LF), a ausência de sinais e a semelhança dos aspectos clínicos dessa enfermidade com outras enfermidades em gatos, como a micoplasmose, leucemia felina (FIV) e síndrome da imunodeficiência felina (FeLV), esta zoonose deve ser sistematicamente incluída nas suspeitas clínicas de gatos em áreas endêmicas para leishmanioses canina e humana. Foram utilizadas amostras de sangue de 55 gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais (APAISA) de Ilha Solteira, co-habitantes com cães portadores de leishmaniose visceral. À técnica de hemocultura, 16,4% (9/55) dos gatos apresentaram protozoários flagelados. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) foi testada em 51 gatos, revelando 62,7% (32/51) de animais reagentes. Testando-se a técnica de RIFI para *Trypanosoma cruzi*, 54,9% (28/55) dos animais foram reagentes. Pela busca de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma*, pela técnica de ELISA indireto com antígeno bruto, encontrou-se 72,5% (37/51) e 39,2% (20/55) de animais reagentes, respectivamente. Com o teste de ELISA indireto com rK39 para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), obteve-se a positividade em 21,6% (11/51) dos felinos testados. Pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), das 55 amostras de sangue total testadas, cinco (9,1%) foram positivas para *Leishmania* spp. Confrontando-se todos os resultados obtidos com as técnicas diagnósticas empregadas, possibilitou-se determinar a importância dos gatos deste estudo como reservatórios de *Leishmania* spp., pela confirmação diagnóstica com a prova da PCR.

Palavras-chave: Leishmaniose, tripanossomíase, diagnóstico, gato doméstico

ABSTRACT

The leishmaniasis are zoonoses that affect humans and other species of wild and domestic mammals. It is a disease caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*. *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) is the causative agent of visceral leishmaniasis in the New World, *Lutzomyia longipalpis* is the main vector responsible for transmission. The cat, besides living closely with humans, also develops infection, usually asymptomatic and may also act as a reservoir of these protozoa. Given the specificity of clinical feline leishmaniasis (LF), the absence of pathognomonic signs and symptoms, and the similarity of the clinical aspects of this disease with other very common in cats, as mycoplasmosis, feline leukemia virus (FIV) and immunodeficiency syndrome FeLV (Feline), this zoonosis should be systematically considered in the clinical suspicions of cats in of the areas endemic for canine and human leishmaniasis. Samples of blood from 55 cats coming from the Association for the Protection of Animals (APAISA) of Ilha Solteira, co-inhabitants with dogs with visceral leishmaniasis, were collected. The blood culture technique showed 16,4% (9/55) flagellate protozoa. The technique of indirect fluorescent antibody (IFA) for *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) was tested on 51 cats, showing 62,7% (32/51) of animals reagents. Testing the technique of IFA for *Trypanosoma cruzi*, 54,9% (28/55) of animals were reactive. The search for anti-*Leishmania* antibodies and anti-*Trypanosoma*, the technique of ELISA with crude antigen, we found 72,5% (37/51) and 39,2% (20/55) of animals reagents, respectively. By ELISA with indirect rK39 for *Leishmania infantum* (syn. *L.chagasi*) gave a positive result in 21,6% (11/51) of tested cats. For the PCR, the 55 whole blood samples tested, five (9.1%) were positive for *Leishmania* spp. Confronting all the results obtained with the diagnostic techniques, is possible to determine the importance of the cats in this study as reservoir of *Leishmania* spp., and the PCR as an important tool for diagnostic confirmation.

Key words: leishmaniasis, trypanosomiasis, diagnosis, domestic cat

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2-OBJETIVOS	30
3-MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 – LOCAIS DE REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.....	32
3.2- COLHEITA DE SANGUE	32
3.2.1- Identificação.....	33
3.3- HEMOCULTURA	33
3.3.1- Leitura das hemoculturas	34
3.4- PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE EM MEIO LIT PARA EXTRAÇÃO DO DNA DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> (SYN. <i>L. CHAGASI</i>) E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34
3.5- EXTRAÇÃO DO DNA PARA PESQUISA DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34
3.6- REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	35
3.6.1- Eletroforese em gel de agarose	36
3.7- REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA <i>LEISHMANIA</i> SPP.	36
3.7.1- Eletroforese em gel de agarose	37
3.8 - REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA <i>LEISHMANIA</i> <i>INFANTUM</i> (SYN. <i>L. CHAGASI</i>) E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	37
3.8.1- Preparação dos antígenos (manutenção das formas promastigotas de leishmanias e epimastigotas de tripanossomas)	37
3.8.2- Obtenção das promastigotas e epimastigotas para a preparação de lâminas	38
3.8.3 – Confeção de lâminas para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>) e para <i>Trypanosoma cruzi</i> . 39	
3.9- MÉTODO ELISA INDIRETO PARA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> (SYN. <i>L. CHAGASI</i>) E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	39
3.9.1- Antígenos brutos	39
3.9.2 – Preparação dos antígenos brutos de <i>Leishmania infantum</i> (syn. <i>L.</i> <i>chagasi</i>) e <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
3.9.3- ELISA indireto com antígeno bruto de <i>Leishmania infantum</i> (syn. <i>L.</i> <i>chagasi</i>).	40

3.9.4- ELISA indireto com antígeno recombinante rK39 de <i>Leishmania infantum</i> (<i>syn. L. chagasi</i>).	41
3.9.5- ELISA indireto para <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5- RESULTADOS	45
5.1- Alterações clínicas	45
5.3 – EXAMES PARASITOLÓGICOS.....	47
5.3.1- Hemocultura.....	47
5.4 – EXAMES SOROLÓGICOS.....	48
5.4.1 – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania infantum</i> (<i>syn. L. chagasi</i>)	48
5.4.2 – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
5.4.3 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para <i>Leishmania infantum</i> (<i>syn. L. chagasi</i>).	53
5.4.4- Ensaio Imunoenzimático (ELISA) com rk39 para <i>Leishmania infantum</i> (<i>syn. L. chagasi</i>)	55
5.4.5 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
5.5- EXAMES MOLECULARES	59
5.5.1- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp.	59
5.5.1.1- Região do cinetoplasto (kDNA) de 720 pares de bases (pb)	59
5.5.2- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
5.5.2.1- Região de nDNA de 188 pares de bases (pb).....	61
5.6- APRESENTAÇÃO GERAL DOS RESULTADOS DOS EXAMES DE HEMOCULTURA, REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI), ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM AG. BRUTO E AG. RECOMBINANTE (RK 39) E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA <i>LEISHMANIA</i> SPP. E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	61
5.7- ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	63
5.7.1- Reação em Cadeia pela Polimerase para <i>Leishmania</i> spp.	63
5.7.2 – Hemocultura e técnicas diagnósticas para <i>Leishmania</i> spp.....	64
5.7.3 – Hemocultura e técnicas diagnósticas para <i>Trypanosoma cruzi</i>	65

5.7.4 – Comparação dos resultados dos animais com alterações clínicas, com os testes de hemocultura, sorológicos RIFI e ELISA (bruto e rK39) e da Reação em Cadeia pela Polimerase para <i>Leishmania</i> spp.	66
5.7.5- Comparação entre os testes de ELISA com antígeno bruto e ELISA com antígeno recombinante para <i>L.infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>).....	67
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA- RESULTADOS.....	68
6- DISCUSSÃO	71
7-CONCLUSÕES.....	84
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXOS.....	106
APÊNDICES	117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses que acometem o homem e outras espécies de mamíferos silvestres e domésticos, de forma crônica com diversas manifestações clínicas. É uma doença causada por protozoários parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* (1, 2, 3). Ela é endêmica em 98 países ao redor do mundo, cuja estimativa é de 50000 mortes por ano, classificando-a em nono lugar das doenças infecciosas (4). *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) é o agente causador da Leishmaniose Visceral (LV) no Novo Mundo, com regiões endêmicas que se estendem desde o sul dos estados Unidos para o norte da Argentina, incluindo o Brasil (5).

Diferentes espécies de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* são transmissoras das leishmanioses nas Américas e, assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania* (6). Os cães, domésticos e selvagens, são os principais hospedeiros reservatórios desta zoonose, mas outras espécies de animais podem ser infectadas. No entanto, muitas espécies animais podem agir como reservatórios para o organismo (7). Canídeos tanto domésticos como selvagens são os hospedeiros mais importantes, mas outras espécies de animais podem ser infectadas, incluindo pequenos roedores e felinos, como os gatos (8, 9, 10, 11), caprinos (12) e equinos (13, 14, 15, 16)

Esses animais reservatórios praticamente não apresentam sinais clínicos, mesmo estando infectados com agentes etiológicos, constituindo-se importantes fontes de infecção para os animais domésticos, homens ou vice-versa (17,18). A LV

é uma doença frequente em cães (sintomáticos ou assintomáticos) e menos comum em gatos e seres humanos (19, 20).

Com a disseminação da doença e o número progressivo de casos, a LV tornou-se, para a Organização Mundial de Saúde, uma das prioridades dentre as doenças tropicais (21). Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e dados de 2006, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (22). Em 2010, a região Nordeste representou 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%).

Atualmente, está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras (23). As manifestações clínicas da LV canina e humana são muito semelhantes e caracterizam-se por febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia no estágio final da enfermidade (24). A LV causada no Brasil pela *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*), é considerada emergente, sendo uma das enfermidades mais importantes, principalmente em crianças desnutridas, e indivíduos portadores de vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) não tratados, ocasionando óbito em 90% dos casos (22). Nos cães, a doença apresenta uma evolução crônica com sinais viscero-cutâneos, tais como linfadenomegalia, onicogrifose, lesões oculares, emese, diarreia, melena, pneumonia, epistaxe, disfunções urinárias, hepáticas e neurológicas, apatia, intolerância aos exercícios, poliúria, polidipsia, poliartrite, polimiosite e lesões

osteolíticas, que podem afetar cerca de 50% dos animais infectados (25). Comumente, enfermidades imunossupressoras como babesiose, ehrlichiose e dirofilariose estão associadas à presença de *Leishmania* spp. (26).

No entanto, devido à urbanização acentuada da leishmaniose (27) o envolvimento de outras espécies domésticas na epidemiologia da LV torna possível novos focos endêmicos. No Brasil, a migração do meio rural para o urbano foi um fator que acelerou a expansão da LV (28), especialmente no Nordeste e Sudeste do país (29), com a introdução de animais silvestres e gambás (30). Na região Sudeste, o primeiro registro de suspeita de autoctonia de caso humano de leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo, ocorreu em 1978 na grande São Paulo (31). No ano de 1998, foram registrados os primeiros casos caninos na região de Araçatuba (32) e em 1999 casos humanos da doença na mesma região (33). A partir destes primeiros casos, encontrou-se o vetor *Lu. longipalpis* em 125 municípios das regiões administrativas de Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente e São João da Boa Vista, sendo que no Estado de São Paulo, mais de 1,7 mil casos humanos foram confirmados desde 1999, com letalidade média de 8% (as letalidades registradas em 1999 e em 2010, respectivamente, foram 29,4% e 9,3%) (34).

No município de Ilha Solteira, localizado na região noroeste do Estado de São Paulo (Latitude 20° 25' 58" S e Longitude 51° 20' 33" W), entre julho de 2006 a janeiro de 2007 apresentou 355 cães positivos para Leishmaniose Visceral Canina (LVC), dentre 3798 cães examinados, com uma positividade de 9,3%, confirmando sua expansão na área urbana (35). De acordo com o Centro de Controle de Zoonoses local, entre 2007 e 2008, foram registrados 469 casos de cães positivos (36). Em outros trabalhos conduzidos por Queiroz et al (37) e Assis et al (38), verificaram um

número comprovadamente considerável de cães positivos para LV canina no município de Ilha Solteira. De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica (39) de São Paulo, nos períodos de 2010 a 2012 foram registrados 107 casos de LV humana na região de Araçatuba, resultando em 11 óbitos, sendo um caso registrado no município de Ilha Solteira. Em todo o Estado de São Paulo foram registrados 450 casos da doença em humanos, sendo que 35 casos resultaram em óbito.

Até recentemente, os gatos eram considerados hospedeiros acidentais de leishmanias, porém fortes evidências têm estabelecido que os gatos também desempenhem importante papel epidemiológico na leishmaniose acerca do potencial reservatório de gatos naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*), quando testados por xenodiagnóstico (40, 41, 42). Infecção por *Leishmania* spp. em gatos já foi documentada, como casos esporádicos, em outros países do Mediterrâneo, Ásia e América, embora os parasitas possam causar tanto a leishmaniose tegumentar quanto a visceral (43). Algumas características comportamentais dos felinos, como caça predatória noturna e trânsito de até 1,5 Km de distância de suas residências, co-habitando áreas silvestres e domésticas, favoreceriam a infecção e disseminação do parasito por essa espécie (44, 45).

Desde 1912, quando Sergent et al. (46) encontraram o primeiro gato infectado, outros casos têm sido relatados de espécies diferentes, como *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum* e *Leishmania major* (47, 48). Ocasionalmente, casos de leishmaniose felina devido à *L. infantum* (*syn. L. chagasi*) foram descritos na França, Itália, Espanha, Suíça e Brasil (43, 49, 50, 51).

A Leishmaniose Felina (LF), desde os anos 90 tem sido extensivamente investigada e, quando os primeiros casos foram relatados, alguns pesquisadores hipotetizaram a participação do gato doméstico (*Felis catus*) na epidemiologia dessa enfermidade (52, 53). Mais de 40 casos de LF foram relatados na literatura científica mundial (54). Segundo Ozon et al. (11) o caso documentado de leishmaniose felina relatado no Sul da França ocorreu em uma área endêmica enzoótica em que ambos os cães e os seres humanos encontravam-se infectados com *L. infantum* (*syn. L. chagasi*). Entre os casos detectados no Novo Mundo, dez foram diagnosticados na América do Sul, onde segundo Schubach et al. (55) dois casos clínicos foram notificados no Brasil.

É possível que, dentro de uma área endêmica para leishmaniose ocorra um percentual elevado de indivíduos saudáveis, mas sem apresentarem sinais clínicos. A baixa prevalência da leishmaniose felina em áreas endêmicas poderia ser devido à resistência felina natural à infecção (56). No entanto, em áreas endêmicas há uma grande possibilidade de infecção e neste caso, o gato poderia constituir um reservatório do parasita. O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo ou não ser sintomático (29). Atualmente o Brasil é o detentor do maior número de casos de LF do mundo, mas sua distribuição no país permanece incerta, sendo relatada em diversos estados brasileiros. Passos et al. (42) relataram um caso de LT por *L. braziliensis* em gato diagnosticado em Belo Horizonte, que apresentava lesões na região interdigital. No município do Rio de Janeiro, foram descritos os primeiros dois casos de LT em felinos pelo mesmo agente referido acima, em que os animais apresentavam somente manifestações cutâneas com lesões em mucosa nasal (55). Em Cotia, município do estado de São Paulo, foi

diagnosticado um gato com LF, que apresentava lesão nodular nasal e linfadenomegalia, título 80 para *Leishmania* spp. na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), título 400 para peritonite infecciosa felina (PIF) e negativo para FeLV e FIV. Pelo método parasitológico direto de Giemsa, foram encontradas formas amastigotas e, após a eutanásia do animal, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) identificou a presença de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) a partir de fragmentos do baço (57).

De Souza et al. (48) no Mato Grosso do Sul, descreveram um caso de LF decorrente de *L. amazonensis*, em que o gato apresentava lesões nodulares nasais, auriculares e interdigitais que, pelo método de Giemsa, detectou a presença de formas amastigotas do agente. Em estudo no município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, área considerada não endêmica, 43 gatos foram examinados e, embora nenhum tenha apresentado lesões cutâneas, todos foram não reagentes à RIFI; entretanto ao ELISA, 2,4% apresentaram reatividade e 4,8% mostraram resultados indeterminados (58). Da Silva et al. (45), referiram um caso de LV em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) em uma área endêmica do Rio de Janeiro, com soroprevalência relativamente elevada (25%), sugerindo a possibilidade do gato atuar como hospedeiro doméstico alternativo da LV e considerando as investigações sorológicas realizadas em áreas endêmicas de fundamental importância. Em uma região endêmica de Portugal (Lisboa), pesquisando-se 23 gatos assintomáticos, detectou-se o DNA de *Leishmania* no sangue periférico em sete felinos (30,4%) (59).

Em alguns relatos, a leishmaniose felina foi relacionada com a Imunodeficiência Natural Adquirida; no entanto, a susceptibilidade real dos gatos à infecção por *Leishmania* spp. e os resultados da leishmaniose nestes animais são mal

compreendidos (49). Assim, a falta de diagnóstico precoce da LF em áreas endêmicas, pode implicar com que o animal continue a representar um risco potencial de transmissão de leishmanias aos vetores. Além disso, é importante enfatizar que estudos anteriores mostraram que os gatos são atrativos ao repasto de flebotomíneos (60, 61, 62).

As lesões cutâneas em gatos naturalmente infectados com *Leishmania* spp. ocorrem principalmente no nariz, seguido pelas orelhas, ou em ambos (63, 64, 65, 66). Conforme consta na literatura, os gatos infectados geralmente apresentam envolvimento dos linfonodos e do sangue, indicando a disseminação de *Leishmania* nos hospedeiros felinos.

As manifestações oculares são comuns nas leishmanioses caninas (67), mas dois casos foram relatados em gatos (68, 69). Em áreas endêmicas, a LF deve ser incluída como diagnóstico diferencial de uveíte e úlceras corneanas (70). Os sinais clínicos da LF são inespecíficos e similares aos observados em outras enfermidades infecciosas comuns em gatos causadas por vírus (Vírus da Leucemia Felina - FeLV e Vírus da Imunodeficiência Felina - FIV), bactérias, protozoários e fungos (histoplasmose, micoplasmose, esporotricose e criptococose) (48). Um estudo no qual relata o segundo caso de LF em Mato Grosso do Sul, na qual *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* foi encontrada em um gato doméstico de Ribas do Rio Pardo, os sinais clínicos foram semelhantes aos observados em outras doenças comumente diagnosticadas em gatos, como a criptococose e esporotricose (71). Dessa forma, a LF deve ser incluída no diagnóstico diferencial em gatos que apresentem lesões cutâneas compatíveis, realizando-se pesquisas sorológicas e histopatológicas apropriadas especialmente em áreas endêmicas de leishmaniose

canina, uma vez que não há sinais patognomônicos dessa enfermidade (45, 51, 72), Um melhor entendimento da relação hospedeiro/parasita/vetor e a maior preocupação com a sanidade dos animais de companhia, os diagnósticos de LF aumentaram, mas provavelmente muitos casos ainda não são diagnosticados (48).

Outra zoonose de extrema importância e que é motivo de estudos em humanos, animais domésticos e silvestres pelo seu caráter epidemiológico é a doença de Chagas. Também denominada de tripanossomíase americana, é uma zoonose latino-americana importante, essencialmente crônica, dispersando-se, praticamente, do México à Patagônia, infectando entre 16 e 18 milhões de indivíduos, com padrões diferentes de morbi-mortalidade, em diferentes países ou regiões. Seu agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Neste grupo encontram-se flagelados com uma organela conhecida por cinetoplasto, a qual corresponde a uma condensação do DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário (73).

Primitivamente, esta doença era considerada uma enzootia, pois afetava exclusivamente mamíferos silvestres e era transmitida por triatomíneos (vetores) de hábitos silvestres. Como ocorre na leishmaniose, devido ao desequilíbrio ecológico, os vetores naturais do *T. cruzi* passaram a invadir os abrigos dos animais domésticos e as habitações humanas, adaptando-se progressivamente a estes ecótopos artificiais. Assim, o *T. cruzi* passou a infectar o homem e os animais domésticos susceptíveis, como o cão e o gato, tornando a doença de Chagas uma típica zoonose (74).

Há mais de cem espécies vetoras responsáveis pela transmissão natural do *T. cruzi*, interferindo diretamente na sua veiculação no ambiente domiciliar ou participando na manutenção da enzootia chagásica (75). Dentre as principais espécies

vetoras em potencial para o *T. cruzi*, seis têm importância epidemiológica na América do Sul: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*.

Nos vertebrados, o *T. cruzi* circula no sangue e multiplica-se nos tecidos, sob a forma de amastigotas. Nos triatomíneos, as formas infectantes multiplicam-se no tubo digestivo, sendo eliminadas com as fezes e urina, sob a forma de tripomastigotas metacíclicos. A transmissão ocorre, principalmente, quando há a deposição de fezes do vetor com as formas infectantes sobre os tecidos cutâneos e mucosas (76).

A doença está diretamente relacionada a cães e gatos infectados, que são os reservatórios mais importantes para tripanossomatídeos dentre os animais domésticos, devido a sua maior proximidade com o homem e sua susceptibilidade à infecção chagásica. Assim, a presença destes parasitas em cães e gatos representa um sinal de alerta para ações efetivas de controle de vetores, no caso os triatomíneos, vulgarmente conhecidos por “barbeiros” (77).

No homem e nos animais domésticos e silvestres, o *T. cruzi* vive no sangue periférico e nas fibras musculares, especialmente as cardíacas e digestivas. No inseto transmissor, vive no tubo digestivo. O homem infectado pode apresentar na fase aguda uma série de sinais e sintomas, como febre, mal estar, falta de apetite, edemas localizados nas pálpebras (sinal de Romana) ou em outras partes do corpo (chagoma de inoculação), enfartamento de gânglios, aumento do baço e do fígado e distúrbios cardíacos. Em crianças, o quadro pode se agravar e levar à morte. Os pacientes, em fase crônica, podem passar um longo período, ou mesmo toda a sua vida, sem apresentar nenhuma manifestação da doença, embora sejam portadores do *T. cruzi*,

sendo esta fase denominada crônica indeterminada. Em outros casos, a doença prossegue ativamente, passada a fase inicial, podendo comprometer muitos órgãos do organismo, salientando-se o coração (cardiomegalia) e o sistema digestório (megacólon, megaesôfago ou forma mista).

Visando a obtenção de melhores resultados e métodos diagnósticos que facilitem a realização de inquéritos epidemiológicos, assim como o conhecimento da distribuição geográfica das zoonoses, tem-se desenvolvido técnicas diagnósticas de maior sensibilidade e especificidade. No caso das leishmanioses e da doença de Chagas, as técnicas de hemocultura e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) são importantes ferramentas diagnósticas para ambas enfermidades. A hemocultura é um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasito na corrente sanguínea, o qual é visualizado à microscopia óptica. Esta é uma diferença importante em relação à prova molecular, a PCR, a qual tem capacidade de detectar fragmentos do parasita, não necessitando estar presente inteiro na circulação (78). Estudos confirmam que a hemocultura é sensível para o diagnóstico da doença de Chagas, sendo que, resultados persistentemente negativos, denotam fortemente que houve cura parasitológica, mesmo que a sorologia convencional mostre sempre resultado positivo (79). É um método diagnóstico direto que também pode ser utilizado para detecção de *Leishmania* spp. Sua sensibilidade aumenta quando o volume e o número de amostras é maior, o tempo entre a coleta e o processamento é menor e quando se utiliza o meio LIT (Liver Infusion Tryptose) para cultivo (80).

Alguns autores têm usado ensaios moleculares a fim de detectar tripanossomatídeos em hospedeiros vertebrados e invertebrados, utilizando diferentes métodos de extração de DNA (81, 82). A técnica da PCR é altamente sensível e

específica, possui habilidade de detectar e identificar o DNA parasitário envolvido, podendo ser aplicada em amostras clínicas, produzindo um resultado seguro em poucas horas (83). Essa técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do agente, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Muitos centros de pesquisa têm avaliado o uso da PCR para diagnóstico de LV utilizando sangue periférico, considerando que a biopsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente domiciliar (21). A amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* pela PCR tem sido realizada a partir de diferentes tecidos bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico utilizando os iniciadores que detectam *Leishmania* spp. (83, 84), resultando em maior rapidez de execução. Com esta técnica, é possível também a amplificação de fragmento da região conservada do minicírculo de kinetoplastos (k-DNA), considerada a região mais rica em DNA por conter cerca de 25% de todo o DNA do flagelado, e está contida em uma mitocôndria presente em todos os flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida. A estrutura do kDNA é formada por uma rede de moléculas interligadas, de conformação circular de dois tamanhos distintos, conhecidos de maxicírculos e minicírculos (85).

Os métodos diagnósticos sorológicos da LVC antes recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) eram o ELISA como método de triagem e a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) como confirmatório (86). Apesar das conhecidas vantagens apresentadas pela RIFI, como facilidade na execução, rapidez na emissão de resultados e baixo custo (87, 88), este teste apresenta algumas desvantagens, pois poderia identificar grande número de animais falso-positivos e, sendo assim, não seria o mais específico para o diagnóstico da LV, tendo em vista a possibilidade de apresentar reação cruzada com

outras enfermidades, como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), com a doença de Chagas, ou ainda, com outros agentes infecciosos, tais como *Erlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* e *Dirofilaria immitis* (89, 90, 91, 92). Com o intuito de aperfeiçoar a técnica de diagnóstico da LVC, o Ministério da Saúde estabeleceu a substituição do protocolo utilizado atualmente (triagem com ELISA e confirmação com RIFI), com a implantação do teste rápido imunocromatográfico com antígenos recombinantes (k26 e k39) como triagem e o ELISA como confirmatório, considerando vantagens e facilidades no teste rápido imunocromatográfico e ao fornecimento de resultados automatizados sem subjetividade no ELISA (93).

Vários antígenos têm sido utilizados para o diagnóstico da LV (94). Geralmente, a purificação destes antígenos requer equipamentos e muito tempo para preparação. A metodologia preparada do antígeno a partir do parasita inteiro é simples e possibilita preparação em larga escala (87). O teste de ELISA utilizando antígeno total bruto é limitado quando se trata de especificidade, por apresentar reações cruzadas não somente com tripanossomatídeos, mas também com organismos filogeneticamente distantes (95).

Com o advento da utilização de antígenos recombinantes, houve uma melhora no diagnóstico quanto à sensibilidade e a especificidade da técnica (96). Alguns grupos de pesquisa vêm utilizando antígenos recombinantes para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, porém há poucos estudos que relatam o uso deste antígenos no diagnóstico de felinos. Em um trabalho realizado por Burns Jr. et al. (97), foi identificado um gene presente no DNA do cinetoplasto da *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), contendo 117 pb com 39 resíduos de aminoácidos repetitivos na

região C-terminal, e a proteína decodificada a partir desse gene é conhecida como rK39.

Portanto, pelos aspectos apresentados, estudamos a ocorrência de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Trypanosoma cruzi* em gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) co-habitantes com cães sabidamente positivos para leishmaniose visceral, procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), região endêmica para leishmaniose, assim como contribuir para o diagnóstico seguro desta enfermidade nestes animais, associando-se as técnicas de hemocultura em meio de Liver Infusion Tryptose (LIT), as técnicas sorológicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA indireto, utilizando antígenos brutos e recombinante e a técnica molecular de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, a partir de amostras de sangue dessa espécie, possibilitando a identificação dos animais realmente infectados e a atuação destes como reservatórios no ciclo doméstico da leishmaniose e da doença de Chagas.

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

- Comparar os testes diagnósticos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA indireto com antígeno bruto e ELISA indireto com antígeno recombinante rK39, bem como as técnicas de hemocultura em meio de Liver Infusion Tryptose (LIT) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*;
- Determinar a importância de gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), co-habitantes com cães portadores de leishmaniose visceral, como reservatórios de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Locais de realização das técnicas diagnósticas

Os procedimentos laboratoriais de hemocultura foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Pólo Centro-Oeste – Bauru; as técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA indireto foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia, pertencente ao Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-UNESP) e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada no Laboratório de Doenças Tropicais, pertencente ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP).

Esta pesquisa foi realizada com a autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo CEEA 862-2011) da Faculdade de Medicina de Botucatu (Anexo 1).

3.2- Colheita de Sangue

Foram colhidas amostras de sangue de 55 gatos domésticos adultos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), que está localizada na área rural da região noroeste da cidade de Ilha Solteira, aproximadamente a dois quilômetros do perímetro urbano, e alberga cerca de 50 cães e 50 gatos adultos (Apêndice 1). Para proceder a colheita do material biológico, os felinos foram previamente anestesiados com Zoletil® (10 mg/kg) por via intramuscular (Apêndice 2). As amostras de sangue foram acondicionadas em caixa

de isopor, sob refrigeração, até a chegada ao laboratório, onde foram processadas no mesmo dia.

Cerca de 5 mL do sangue colhido de cada animal foi fracionado de duas formas diferentes: a primeira parte em tubos Vacutainer contendo EDTA, para que houvesse a separação do plasma, camada leucocitária e sedimento de hemácias, para a realização das técnicas de hemocultura e para a realização da PCR para *Leishmania infantum* (syn. *L.chagasi*) e *Trypanosoma cruzi*. A segunda amostra foi acondicionada em tubos sem EDTA para a separação do soro, o qual foi armazenado em freezer a -20°C até a realização das técnicas de RIFI e ELISA indireto utilizando antígenos brutos e recombinante.

3.2.1- Identificação

Para que não houvesse repetição da amostra, os animais foram marcados com esmalte na região interna do pavilhão auricular, fotografados e identificados utilizando-se de uma ficha individual numerada, onde foram descritas informações necessárias com relação aos seus aspectos clínicos e a observação de presença ou não de ectoparasitas. Logo após este procedimento, os animais permaneceram em observação até que se recuperassem do efeito do anestésico e posteriormente foram devidamente liberados em sua respectiva baia (Apêndice 3).

3.3- Hemocultura

Para a realização da hemocultura, foram separados três tubos contendo, em cada um deles, 5 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril (Anexo 2). A manipulação das amostras de sangue foi realizada em capela de fluxo laminar,

previamente limpa com álcool 70% e mantida sob a ação de luz ultravioleta por 30 minutos. Com uma seringa estéril de 1 mL, retirou-se a porção plasmática e foi transferida para o primeiro tubo. Esse procedimento foi repetido para a porção leucocitária (camada entre o plasma e o sedimento de hemácias), transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para um terceiro tubo. As culturas foram mantidas em estufa a 28-30°C por quatro meses depois da inoculação, quando então foram preparadas para serem submetidas à técnica de PCR para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Trypanosoma cruzi*.

3.3.1- Leitura das hemoculturas

Após quinze dias da inoculação do sangue coletado dos gatos, realizou-se a primeira leitura das hemoculturas em capela de fluxo laminar, retirando-se cinco microlitros de cada tubo de cultura inoculado, colocando-se a gota entre lâmina e lamínula e observando-se em microscopia óptica no aumento de 1000X, com óleo de imersão. As leituras foram realizadas quinzenalmente, durante quatro meses e, após este período, as culturas foram processadas para a extração do DNA.

3.4- Preparação das amostras de sangue em meio LIT para extração do DNA de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

A preparação das amostras de hemocultura para a extração de DNA foi realizada de acordo com Pinto (98) com algumas modificações (Anexo 3).

3.5- Extração do DNA para pesquisa de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*

A partir do sedimento obtido com o preparo das amostras para extração de todas as hemoculturas, bem como a partir dos controles positivos em meio LIT e de amostras de sangue total dos felinos, foi utilizado 300 µL de cada amostra para

extração, utilizando recomendações do Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Spin Kit da GE Healthcare® (Anexo 4).

3.6- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi*

As condições de amplificação em termociclador foram as seguintes: cada tubo de reação de 0,2mL recebeu tampão de PCR (50mmol KCl, 10mmol de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 2U de *Taq*-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 5µL da amostra testada e 17,5µL de água ultra pura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo conteve 23µL do MIX-PCR e 5µL do produto de extração do DNA.

No termociclador (GeneAmp PCR System 9600) as condições de amplificação foram de acordo com Ávila et al. (99), sendo um ciclo para desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos; desnaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 30 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C, respectivamente; e um ciclo de 72°C por dez minutos. Para amplificação dos fragmentos da região de nDNA, foram utilizados os iniciadores TCZ1 e TCZ2, segundo VIRREIRA et al.(100).

TCZ1: 5' – CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT - 3'

TCZ2: 5' - CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'

Nesta reação, os produtos resultantes apresentaram 188 pares de base (pb) de comprimento, correspondendo à amplificação do fragmento contendo uma região específica da região do nDNA de *T.cruzi* (100). Como controle positivo da reação foi utilizada a cepa “Y” de trypanossoma cruzi, procedente do instituto de Medicina Tropical em São Paulo-SP. Como controle negativo utilizou-se água Milli-Q estéril.

3.6.1- Eletroforese em gel de agarose

Aliquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5µL de solução de azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X. O gel para eletroforese foi preparado com 1,0g de agarose pura em 50mL de tampão Tris-EDTA-Borato (TBE) 0,5X. A agarose foi dissolvida em TBE previamente aquecido, para que se dissolvesse totalmente. O material foi distribuído uniformemente na cuba de eletroforese. A corrida foi realizada em 100 volts por 90 minutos. Ao final, o gel foi corado em solução contendo 5µL de Syber Safe® durante uma hora e as bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300 nm. Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *T. cruzi*, e como negativos, água mili-Q estéril. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder, 100pb (Invitrogen®). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com a cepa padrão utilizada como controle positivo.

3.7- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp.

Foram utilizados 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl), 1,5U de *Taq*-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mM de MgCl₂, 10 mM de DNTPs, 2 µL da amostra testada e 17,5 µL de água ultra pura (MIX-PCR), em cada tubo de reação de 0,2 mL. As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System

9600) foram seguidas conforme descritas por Ikonomopoulos et al. (78), com modificações, sendo a desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 33 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto e uma extensão final de 72°C durante 7 minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA de *Leishmania* spp. foram utilizados os iniciadores LINR4 e LIN19 (83, 101).

LINR4 5'-GGGGTTGGTGTA AAAATAGGG-3'

LIN19 5'-CAGAACGCCCCTACCCG-3'

Nessa reação, os produtos resultantes apresentaram 720 pares de base (pb) de comprimento, que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp..

3.7.1- Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados foram feitas em eletroforese em gel de agarose a 1,5% da mesma forma descrita no item 3.6.1.

3.8 - Reação de Imunoflorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum*

(syn. L. chagasi) e *Trypanosoma cruzi*

3.8.1- Preparação dos antígenos (manutenção das formas promastigotas de leishmanias e epimastigotas de tripanossomas)

Os antígenos nas formas promastigotas de *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) e epimastigotas de *T.cruzi*, foram mantidos em tubos rosqueados contendo

10 mL de meio LIT (líquido) e 5 mL de meio (Novy, McNeal, Nicolle) NNN (sólido) (Anexo 5).

O repique para manutenção do antígeno foi realizado quinzenalmente, dentro da capela de fluxo laminar, retirando-se uma alíquota de cada um dos dois tubos de manutenção mais recente (repique anterior) e colocando-se entre lâmina e lamínula para observação sob microscopia óptica (aumento de 40X), para avaliação do crescimento das promastigotas e epimastigotas. Do tubo que apresentasse parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, repicou-se uma alíquota de 1mL para dois novos tubos contendo NNN e LIT, procedendo-se assim uma nova passagem. As culturas foram mantidas em estufa a 28-30°C, temperatura ideal para o desenvolvimento das leishmanias e tripanossomas.

3.8.2- Obtenção das promastigotas e epimastigotas para a preparação de lâminas

Para a obtenção de uma quantidade viável de promastigotas e epimastigotas por lâmina, foi necessário repicar 0,5 mL de cultura em LIT e NNN para um tubo de rosca contendo somente 10 mL de LIT. Procedeu-se dois repiques em LIT, com intervalo de sete dias para obtenção de maior concentração do agente (para maiores quantidades de lâminas).

Após a verificação do crescimento das promastigotas e epimastigotas em microscópio óptico, centrifugou-se 10 mL de LIT a 3000 rpm por 10 minutos; em seguida, desprezou-se o sobrenadante e foi acrescentado de 2 a 3 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST), e centrifugou-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes, quantificou-se os parasitas em microscópio óptico e, caso a

quantidade de promastigotas e epimastigotas fosse inferior a 20 a 30 parasitas por campo, proceder-se-ia novamente à centrifugação, até que então pudesse se obter a concentração desejada. Caso a quantidade de parasitas estivesse concentrada, a mesma seria diluída em SST.

3.8.3 – Confecção de lâminas para Reação de Imunofluorescência Indireta

(RIFI) para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e para *Trypanosoma cruzi*

As lâminas para RIFI são compostas de duas fileiras de seis orifícios (perfurações). Fixou-se o antígeno, pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas (quando do preparo de lâminas com leishmanias) e 10 µL da suspensão de epimastigotas (quando do preparo de lâminas com tripanossomas). Logo em seguida a suspensão foi retirada, por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas permaneceram em temperatura ambiente para secagem, quando então foram guardadas em laminário à – 20°C até o momento de uso. A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (102) (Anexo 6).

3.9- Método ELISA indireto para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e

Trypanosoma cruzi

3.9.1- Antígenos brutos

Foram utilizados os antígenos brutos específicos dos parasitas *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Trypanosoma cruzi*.

3.9.2 – Preparação dos antígenos brutos de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Trypanosoma cruzi*

Para a sensibilização da placa de ELISA para a realização do Ensaio Imunoenzimático, necessitou-se a produção dos antígenos brutos de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* (Anexo 7).

3.9.3- ELISA indireto com antígeno bruto de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*)

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Lima et al.(104) para *Leishmania* spp. O antígeno utilizado foi o solúvel bruto obtido a partir de promastigotas de *Leishmania infantum* desenvolvidas em cultivo celular de cepas (IOC – 579) FIOCRUZ (Anexo 8).

Os valores de D.O dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *Leishmania infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (105).

Os níveis de anticorpos de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra teste em relação ao controle positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos de acordo com a equação preconizada por Machado et. al. (106) demonstrada a seguir.

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}{\text{Absorbância média da amostra do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média da amostra do soro de referência negativo}}$$

Após a realização do exame ELISA calculou-se o ponto de corte, os Níveis ELISA (NE) e os valores da amostra em relação ao positivo (A/P).

3.9.4- ELISA indireto com antígeno recombinante rK39 de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*).

O teste ELISA indireto com antígeno recombinante foi padronizado de acordo a técnica descrita por Lima et al.(104) com modificações (Anexo 9). Utilizou-se o antígeno recombinante rK39 de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*), o qual foi cedido gentilmente pelo Infections Diseases Research Institute (IDRI), procedente de Seattle, Washington, EUA.

Os valores de D.O dos soros e os níveis de anticorpos foram determinados de acordo com as preconizações de Voller et al. (105) e Machado et al. (106) respectivamente descritas no item (3.9.3).

3.9.5- ELISA indireto para *Trypanosoma cruzi*

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Lima et al.(104) com modificações. O antígeno utilizado foi o solúvel bruto obtido a partir de epimastigotas desenvolvidas em cultivo celular de cepas (cepa “Y” de *Trypanosoma cruzi*, mantida no Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP (Anexo 10).

Os valores de D.O dos soros e os níveis de anticorpos foram determinados de acordo com as preconizações de Voller et al. (105) e Machado et al. (106), respectivamente, descritas no item (3.9.3).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram construídas tabelas de contigência e calculados o coeficiente Kappa para verificar a concordância entre os testes realizados. Com os dados obtidos, foram também calculados valores de sensibilidade e especificidade relativa, comparando-se as técnicas de PCR com os métodos RIFI, ELISA e Hemocultura, para a pesquisa de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*. Para estas avaliações, foi utilizado o programa SAS for Windows, versão 9.2.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1- Alterações clínicas

Durante o exame clínico dos animais, foram observados ectoparasitas (pulgas) em 7,3% (4/55), porém, a grande maioria não apresentou alterações clínicas evidentes, verificando-se sinais de alopecia em 27,3% (15/55), emagrecimento em 21,8% (12/55), lesões gerais no corpo em 23,6% (13/55), lesões em pavilhão auricular em 18,2% (10/55) e 3,6% (2/55) com lesões na região nasal, (Figuras 1 e 2). Apenas um animal (1,8%) apresentava lesões compatíveis com sarna. Os principais sinais clínicos observados nos animais estão descritos no apêndice 4.

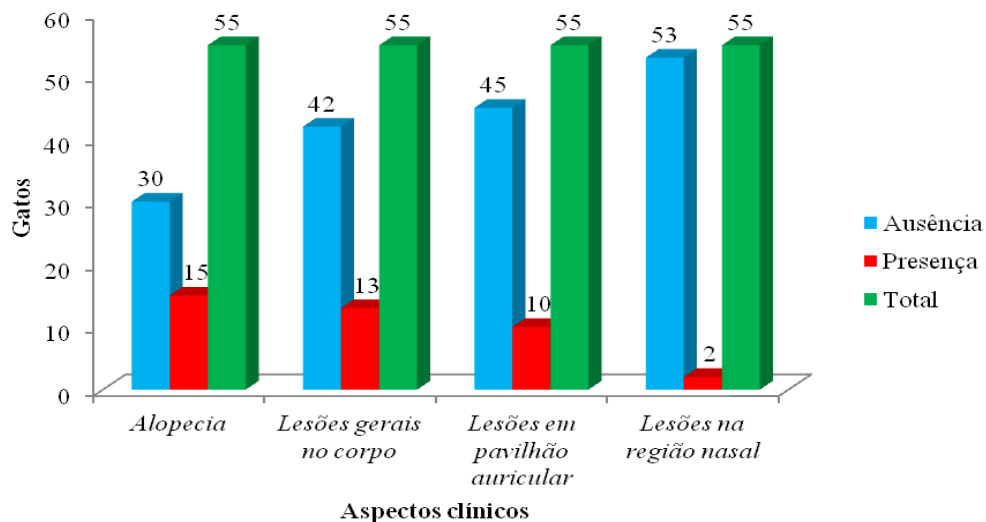


Figura 1: Aspectos clínicos gerais dos gatos da Associação protetora dos Animais de Ilha Solteira. Botucatu, SP, 2013.



Figura 2: Alterações clínicas observadas nos animais: alopecia (A), emagrecimento (B), lesões descamativas e eritematosas em pavilhão auricular (C) e em região nasal (D). Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

5.2 – Exames parasitológicos

5.2.1- Hemocultura

Dos 55 animais coletados, observou-se pela hemocultura, a presença de protozoários flagelados em amostras de culturas de nove gatos (16,4%) (Figuras 3 e 4). Para os demais animais, as culturas foram consideradas negativas durante os quatro meses de leitura.

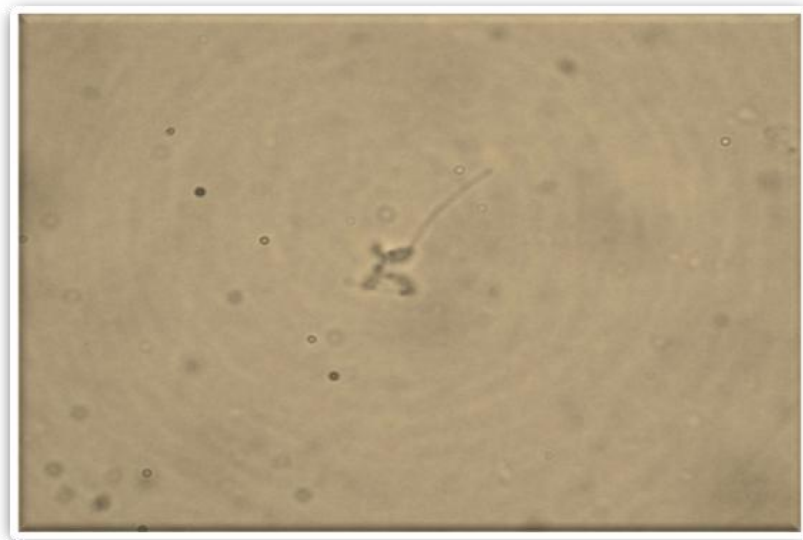


Figura 3: Hemocultura positiva de gato doméstico procedente da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), apresentando flagelado livre (seta) em meio LIT (Liver Infusion Tryptose). 1000X. Botucatu, SP, 2013.

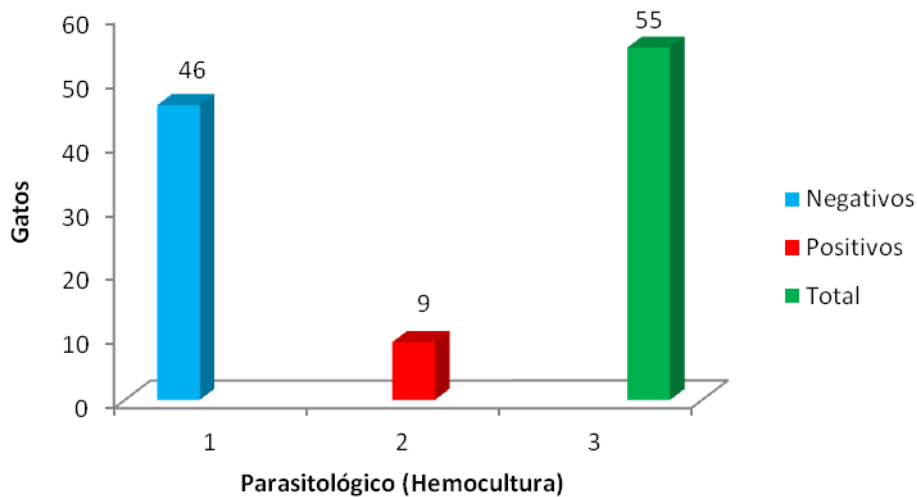


Figura 4: Exame parasitológico direto (hemocultura) dos gatos da Associação protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

5.3 – Exames sorológicos

5.3.1 – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*)

A técnica de RIFI para *Leishmania infantum* foi realizada em 51 animais, devido a quantidade insuficiente de material biológico coletado de quatro animais. Pôde-se verificar que, dentre os 51 animais testados, 32 soros foram reagentes (62,7%), sendo que cinco animais apresentaram título 40 (9,8%); 18 animais título 80 (35,3%); oito animais título 160 (15,7%) e um animal apenas apresentou título 320 (2%) (Apêndice 5). A técnica de RIFI foi realizado segundo Camargo (102), sendo considerado reagentes soros que apresentassem títulos iguais ou maiores que 40 (Figuras 5, 6 e 7).

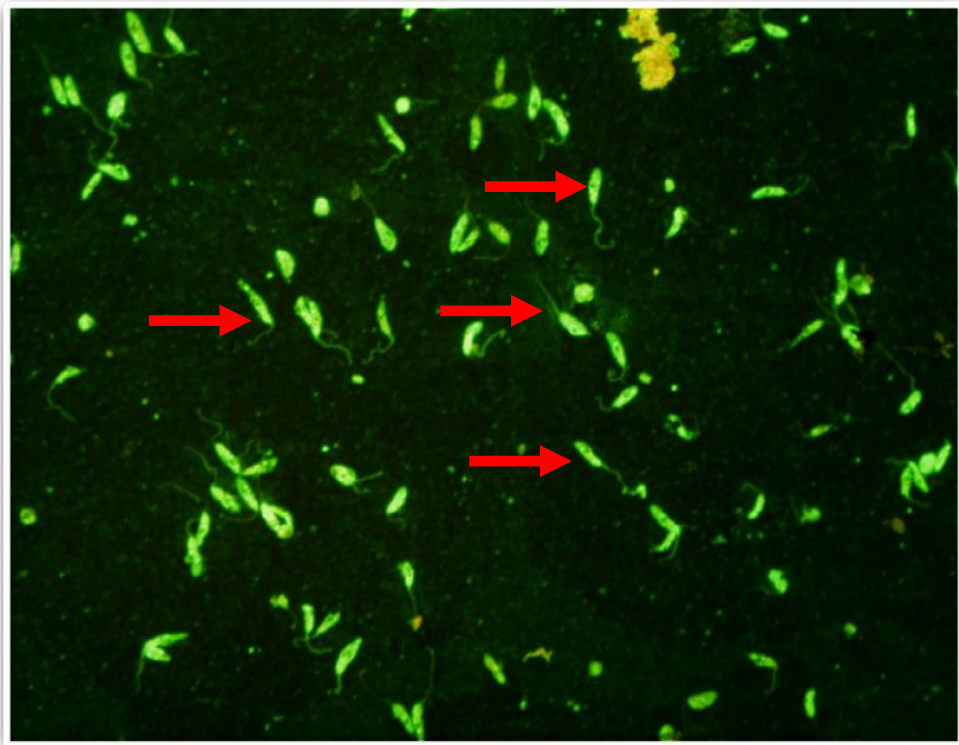


Figura 5: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva em gato doméstico procedente da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Formas promastigotas de *Leishmania infantum* (setas). Aumento de 40X. Botucatu, SP, 2013.

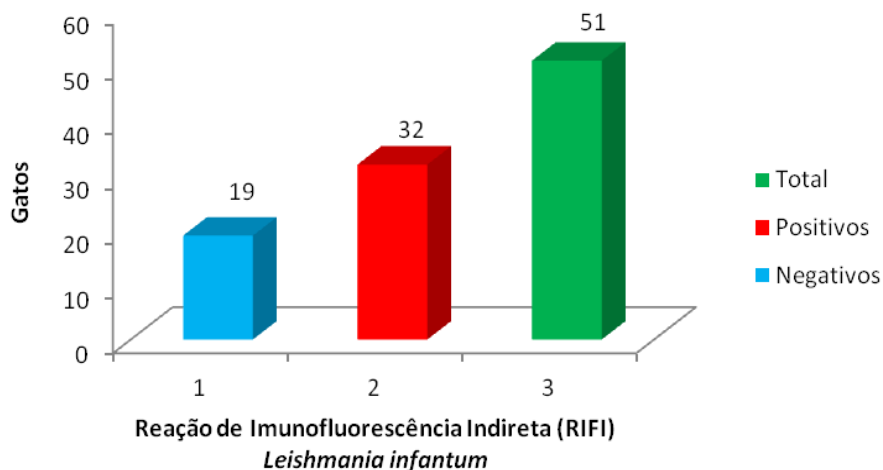


Figura 6: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* realizada em soros dos gatos da Associação protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

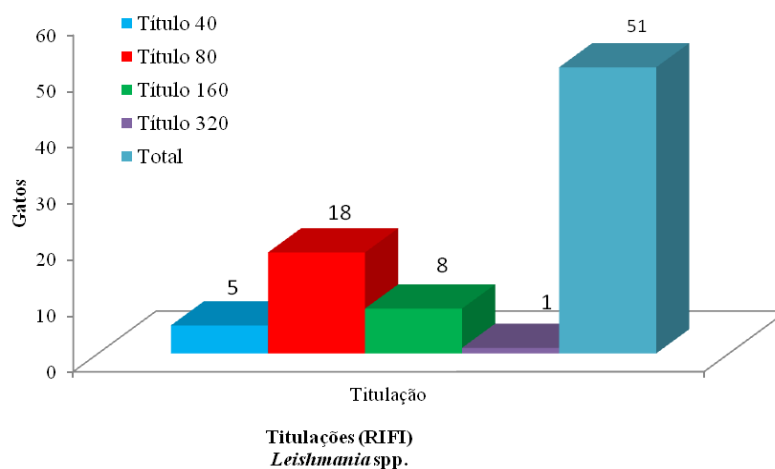


Figura 7: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* realizada nos gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), e suas respectivas titulações. Botucatu, SP, 2013.

5.3.2 – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Trypanosoma cruzi*

Devido a quantidade insuficiente de material biológico coletado de quatro animais, a técnica de RIFI para *T.cruzi* foi realizada em 51 animais. Pôde-se verificar que, dentre os 51 animais testados, 28 soros foram reagentes (54,9%), sendo que 14 animais apresentaram título 20 (27,5%) e 14 animais título 40 (27,5%) (Figuras 8, 9 e 10). A técnica de RIFI foi realizado segundo Camargo (102), sendo considerado reagente soros que apresentassem títulos iguais ou maiores que 20 (Apêndice 5).

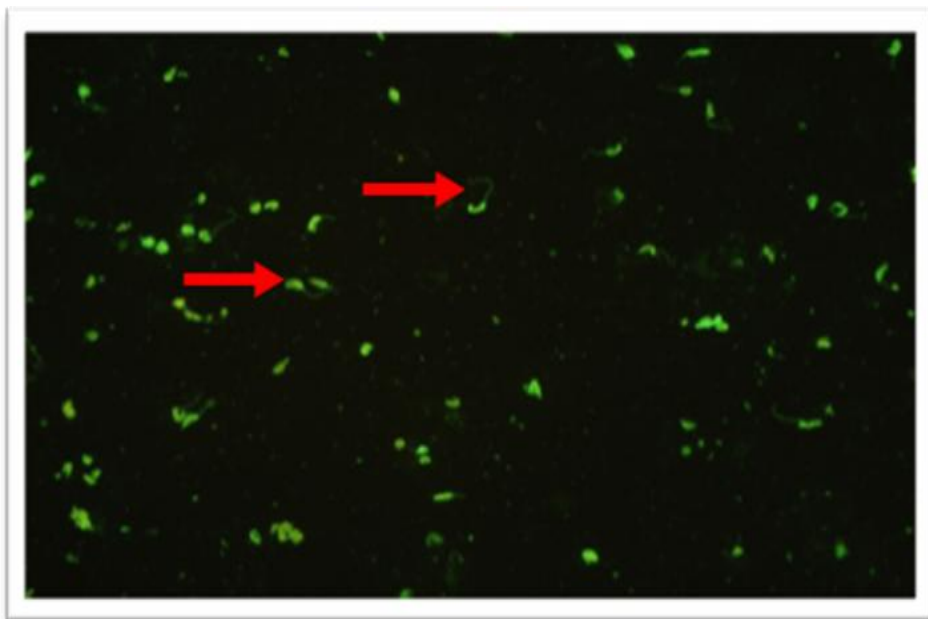


Figura 8: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva para *Trypanosoma cruzi* realizada em soros dos gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Formas epimastigotas de *T.cruzi* (setas). Aumento de 40X. Botucatu, SP, 2013.

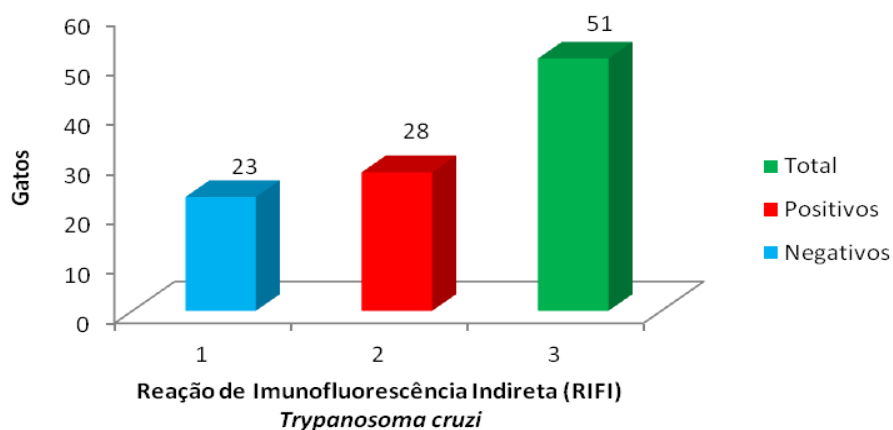


Figura 9: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Trypanosoma cruzi* realizada em soros dos gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

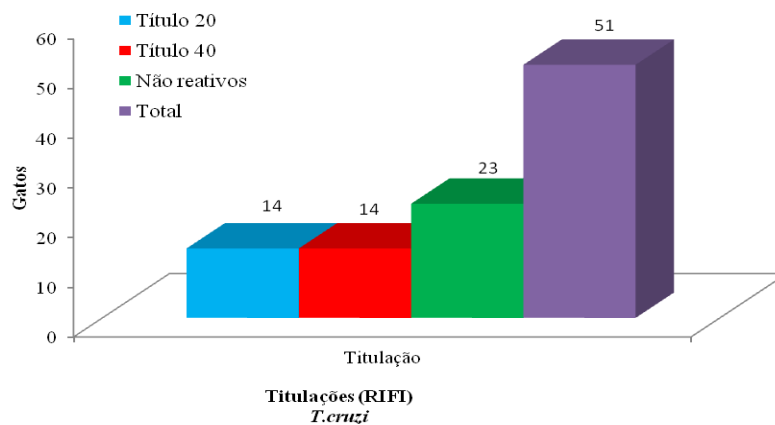


Figura 10: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Trypanosoma cruzi* realizada em soros dos gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA) e suas respectivas titulações. Botucatu, SP, 2013.

5.3.3 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*).

Após a realização do exame ELISA, calculou-se o ponto de corte, os níveis ELISA (NE) e os valores da amostra em relação ao positivo (A/P). Dessa forma, a densidade óptica (D.O) média dos gatos negativos foi de $0,0618333 \pm 0,0016$ resultando em um ponto de corte de $D.O \geq 0,1545$ e nível ELISA 2 ($NE \geq 2$). Já os gatos positivos apresentaram densidade óptica média igual a $0,4075 \pm 0,0157$. Para a média da D.O do controle positivo foram utilizados três gatos de uma área endêmica, sabidamente positivos para leishmaniose. Os gatos negativos foram provenientes de uma área não endêmica. Dessa forma, trabalhou-se com as médias de absorbância para os controles (negativo e positivo) e com valores de A/P para os soros testados. A demonstração da distribuição dos níveis de ELISA podem ser visualizados no Apêndice 6.

Ao analisar os resultados, obteve-se uma reatividade positiva de 72,5% (37 gatos) para leishmaniose distribuída em níveis ELISA superiores ou igual ao ponto de corte ($NE \geq 2$), e 27,5% (14 gatos) foram considerados negativos (Apêndice 7). O maior número de gatos com reatividade positiva foi observado no $NE = 5$ (8/51 - 15,7%) e com reatividade negativa (5/51 - 9,8%) foi no $NE = 2$, ou seja, com baixa reatividade antigênica, mas ainda assim foram considerados positivos pelo ELISA. (Figuras 11 e 12).

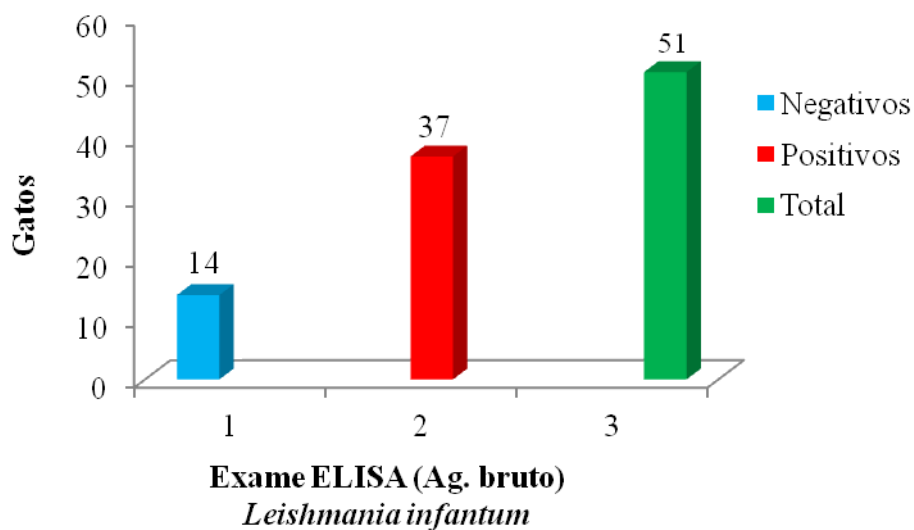


Figura 11: Exame ELISA indireto com antígeno bruto de *Leishmania infantum* realizado em soros de gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

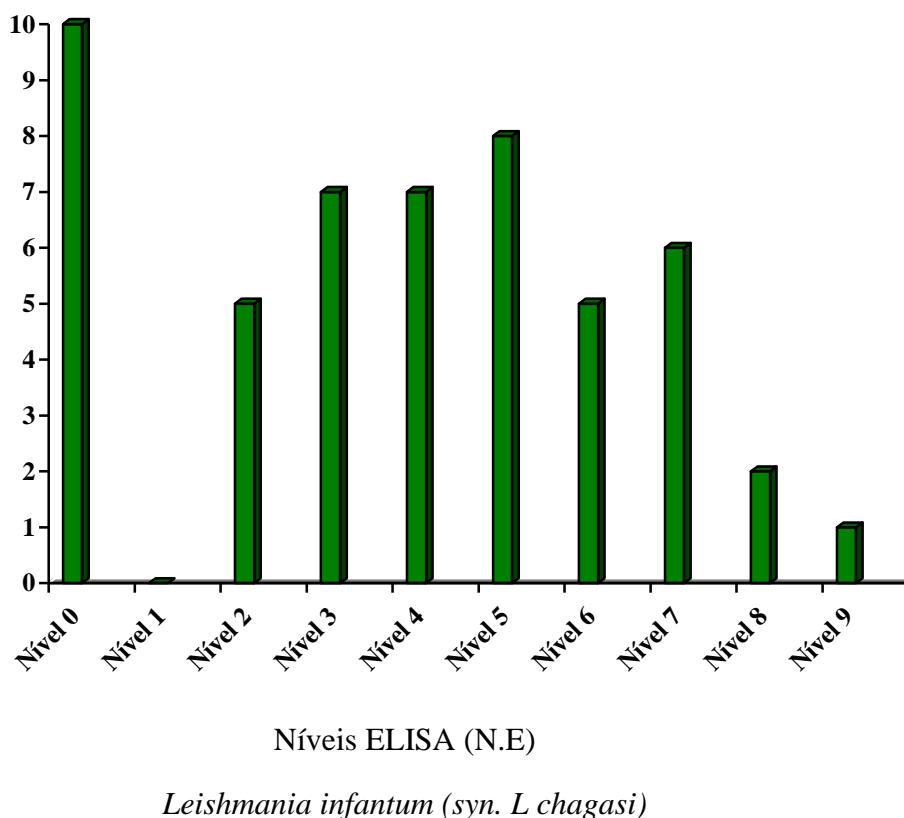


Figura 12: Níveis ELISA (N.E) apresentados em soros de gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

5.3.4- Ensaio Imunoenzimático (ELISA) com rK39

Após a realização do exame ELISA com rK39, calculou-se o ponto de corte, os níveis ELISA (NE) e os valores da amostra em relação ao positivo (A/P). Dessa forma, a densidade óptica (D.O) média dos gatos negativos foi de $0,236 \pm 0,0176$ resultando em um ponto de corte de $D.O \geq 0,590$ e nível ELISA 3 ($NE \geq 3$). Já os gatos positivos apresentaram densidade óptica média igual a $1,137 \pm 0,279$. A demonstração da distribuição dos níveis de ELISA podem ser visualizados no Apêndice 8.

Ao analisar os resultados, obteve-se uma reatividade positiva de 21,6% (11 gatos) para leishmaniose distribuída em níveis ELISA superiores ou igual ao ponto de corte ($NE \geq 3$), e 78,4% (40 gatos) foram considerados negativos (Apêndice 9). O maior número de gatos com reatividade positiva foi observado no $NE=3$ (6/51 – 11,7%) e com reatividade negativa (27/51 – 52,9%) foi no $NE=0$. (Figuras 13 e 14).

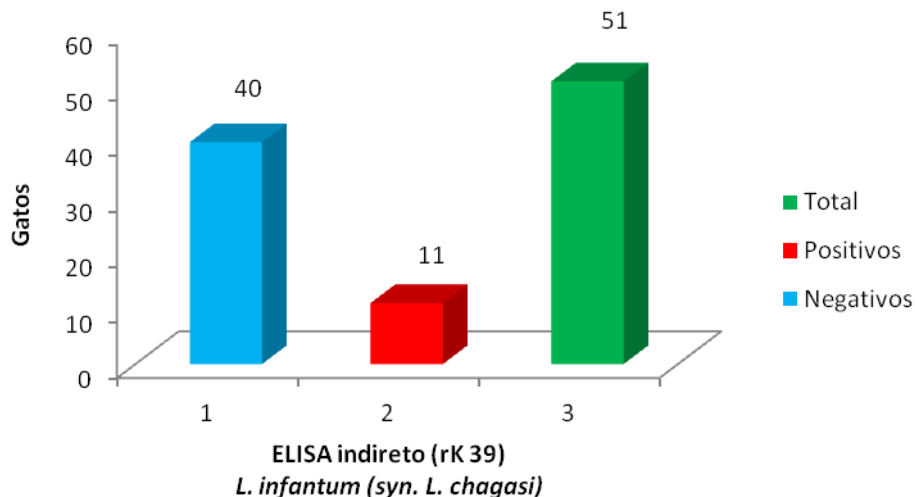
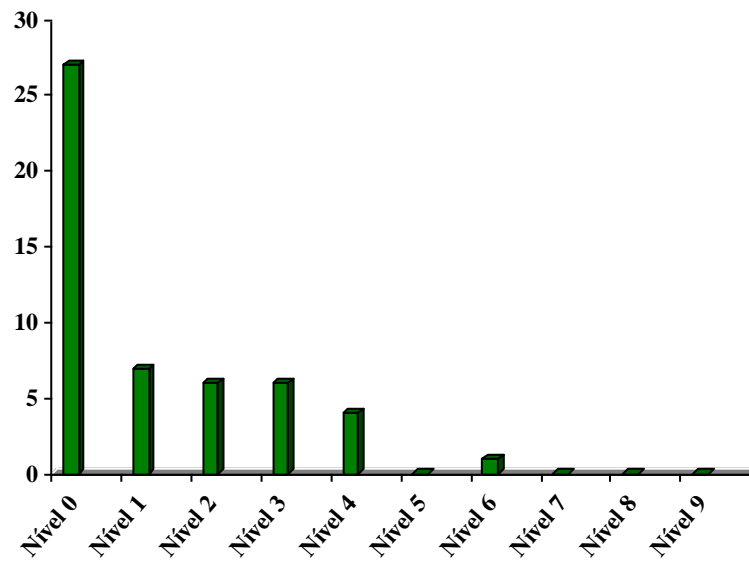


Figura 13: ELISA indireto com antígeno recombinante rK39 de *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) realizado em soros de gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.



Níveis ELISA (N.E)

Leishmania infantum (syn. *L. chagasi*)

Figura 14: Níveis ELISA (N.E) apresentados em soros de gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

5.4.5 – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para *Trypanosoma cruzi*

Para definir a diluição a ser utilizada nos ensaios, foram testadas as diluições de amostras de soro felino nas proporções de 1:100, 1:200 e 1:400.(Figura 15).

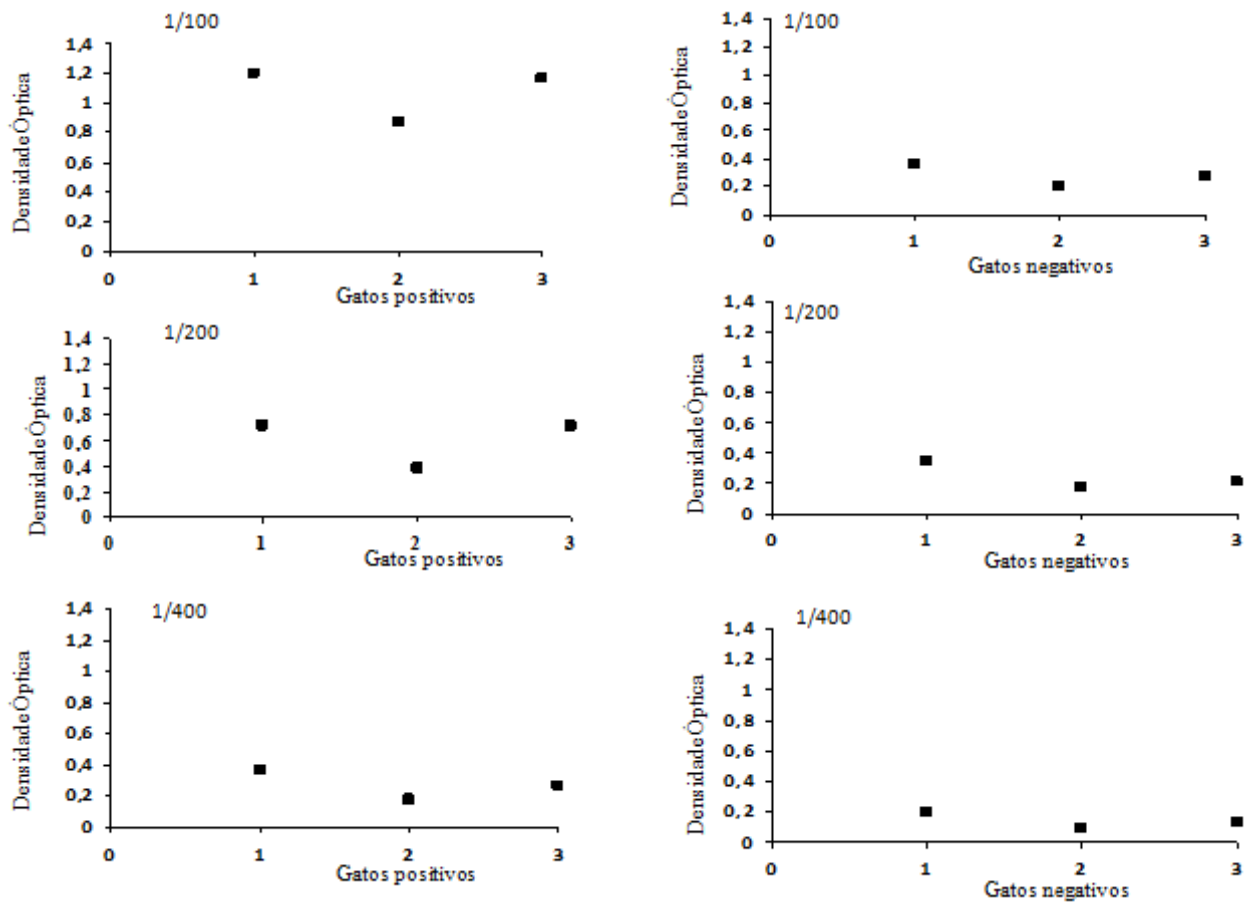


Figura 15: Controles (gatos) positivos e negativos para *Trypanosoma cruzi* pela técnica de ELISA indireto. Diluições utilizadas: 1/100, 1/200 e 1/400. Botucatu, SP, 2013.

Após a realização do exame ELISA, calculou-se o ponto de corte, os níveis ELISA (NE) e os valores da amostra em relação ao positivo (A/P). Dessa forma, a densidade óptica (D.O) média dos gatos negativos foi de $0,2448333 \pm 0,089$ resultando em um ponto de corte de $D.O \geq 0,612$ e nível ELISA 2 ($NE \geq 2$). Já os gatos positivos apresentaram densidade óptica média igual a $1,030333 \pm 0,028$. Para a média da D.O. do controle positivo foram utilizados três gatos sabidamente positivos para *T.cruzi*. Para os controles negativos foram utilizados soros de gatos sabidamente

negativos. Dessa forma, trabalhou-se com as médias de absorbância para os controles (negativo e positivo) e com valores de A/P para os soros testados. A demonstração da distribuição dos níveis de ELISA podem ser visualizados no Apêndice 10.

Ao analisar os resultados, obteve-se uma reatividade positiva de 39,2% (20 gatos) para *Trypanosoma cruzi* distribuída em níveis ELISA superiores ou igual ao ponto de corte ($NE \geq 2$), e 60,8% (31 gatos) foram considerados negativos (Apêndice 11) (Figura 16). O maior número de gatos com reatividade positiva foi observado no $NE = 3$ (11/51 – 21,6%) e com reatividade negativa (8/51 - 15,7%) foi no $NE = 2$, ou seja, com baixa reatividade antigênica, mas ainda assim foram considerados positivos pelo ELISA (Figura 17).

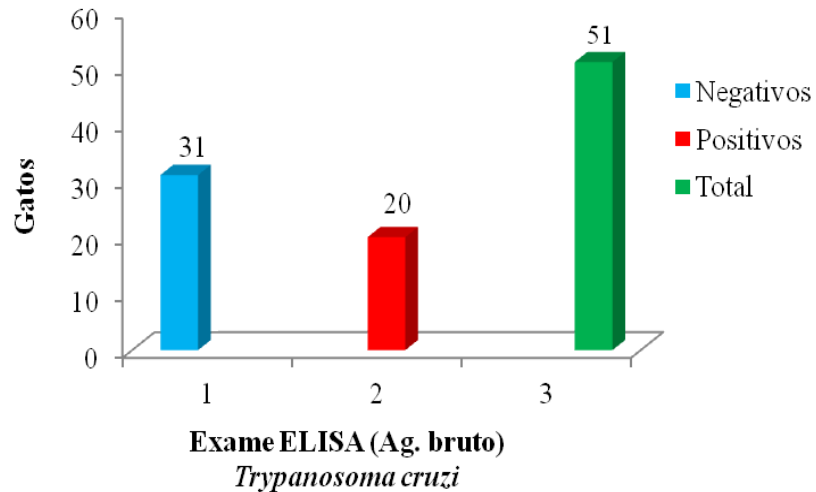


Figura 16: ELISA indireto com antígeno bruto de *T. cruzi* realizado em soros de gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

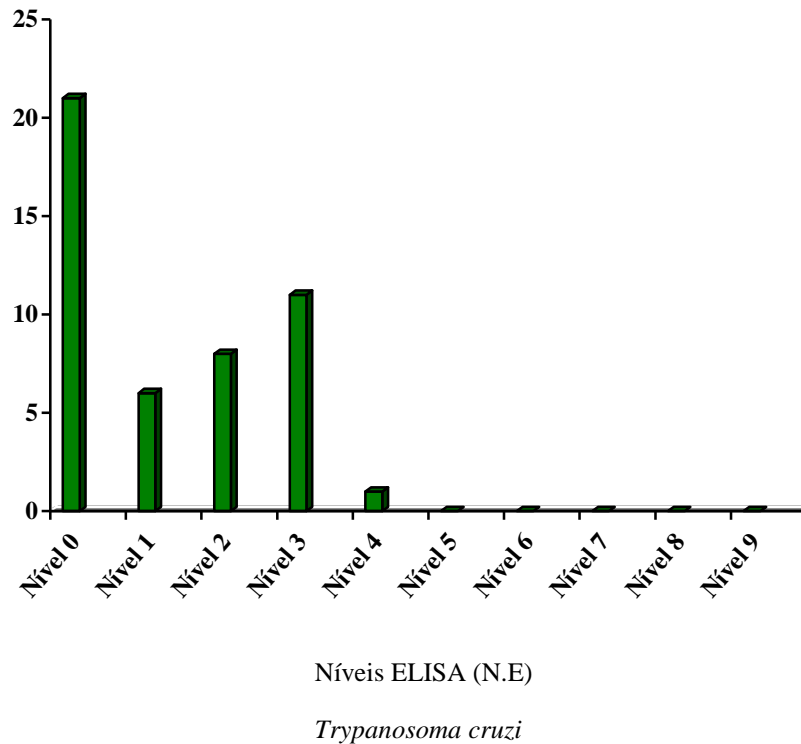


Figura 17: Níveis ELISA (N.E) apresentados em soros de gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

5.5- Exames Moleculares

5.5.1- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp.

5.5.1.1- Região do cinetoplasto (kDNA) de 720 pares de bases (pb)

Do total de 55 gatos, cinco animais apresentaram positividade para *Leishmania* spp. em amostras de sangue total (9,1%), não havendo positividade à PCR procedente das amostras de hemocultura (Figuras 18 e 19). Importante ressaltar que, dos cinco gatos positivos à PCR, dois deles não apresentavam qualquer alteração clínica evidente (assintomáticos).

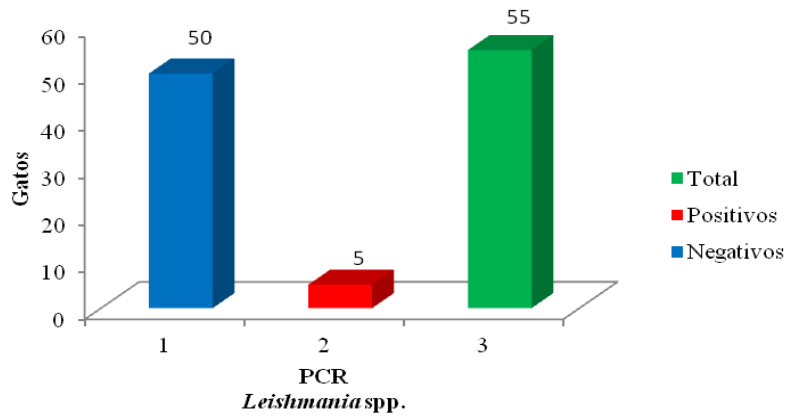


Figura 18: Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. com a utilização dos iniciadores LINR4 e LIN19 em amostras de sangue total de gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

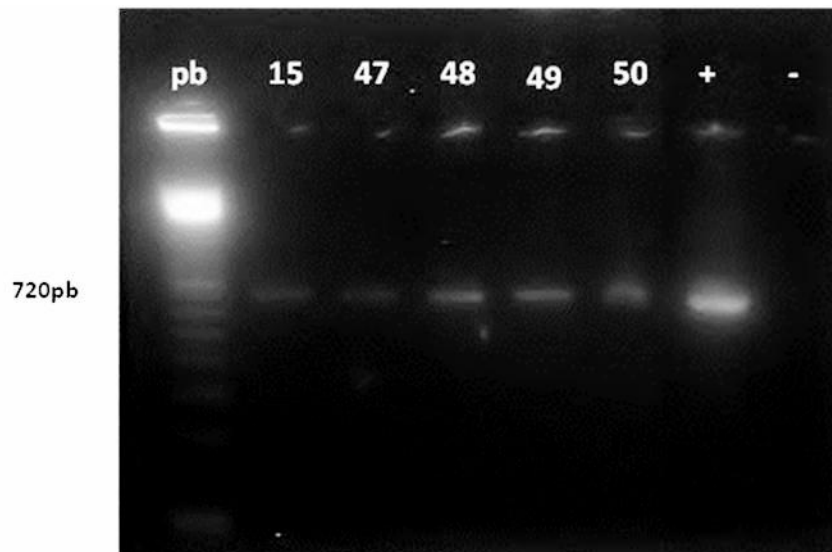


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores da região de minicírculo do kDNA (LINR4 e LIN19) de 720 pares de bases para *Leishmania* spp. em amostras de sangue total de 5 gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). + (controle positivo), - (controle negativo). Botucatu, SP, 2013.

5.5.2- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi*

5.5.2.1- Região de nDNA de 188 pares de bases (pb)

Do total de 55 gatos avaliados pela PCR, todos foram negativos para *Trypanosoma cruzi* nas amostras de sangue total e de hemocultura.

5.6- Apresentação geral dos resultados dos exames de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) com Ag. Bruto e Ag. Recombinante (rK 39) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

Em uma avaliação geral dos resultados dos exames realizados nos gatos para a detecção de infecção por *Leishmania* spp., pode-se observar que houve uma maior positividade em relação aos exames sorológicos ELISA com antígeno bruto e RIFI, resultando num total de 37 (72,5%) e 32 (62,5%) felinos sororreativos, respectivamente. O diagnóstico pelo ELISA com rK39, apresentou positividade em 11 animais (21,6%); ao exame molecular realizado pela PCR, constatou-se positividade em cinco animais (9,1%) e, pelo diagnóstico parasitológico direto, realizado pela hemocultura, observou-se protozoários flagelados em nove culturas de sangue (Figura 20).

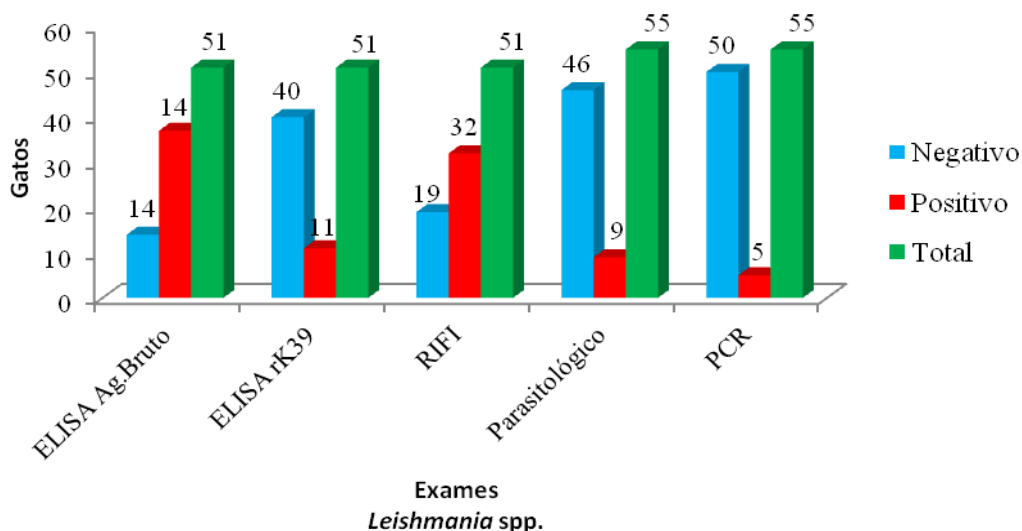


Figura 20: Resultados dos testes diagnósticos realizados em gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). para *Leishmania* spp Botucatu, SP, 2013.

Para a investigação da infecção por *Trypanosoma cruzi*, observamos maior sororreatividade aos exames sorológicos com as técnicas de RIFI e ELISA, identificando-se soros de animais reativos em 28 (54,9%) e 20 (39,2%) gatos, respectivamente. No diagnóstico molecular pela PCR, não ocorreu positividade (Figura 21).

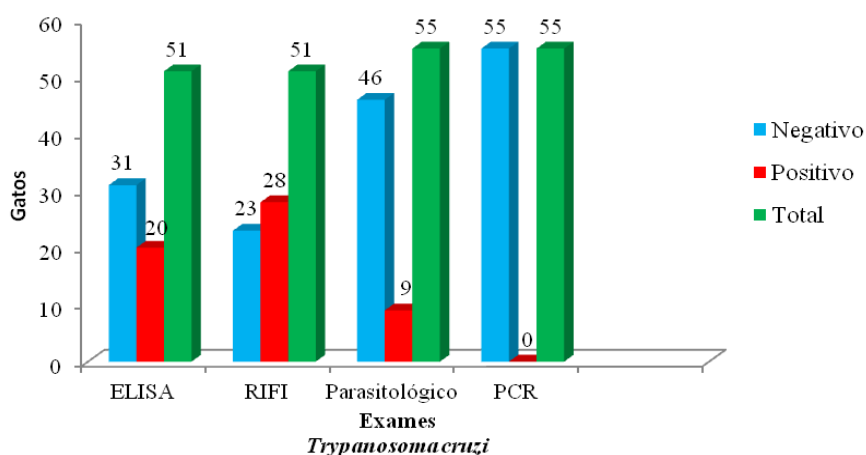


Figura 21: Resultados dos testes diagnósticos realizados em gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). para *Trypanosoma cruzi*. Botucatu, SP, 2013.

5.7- Análise comparativa dos resultados das técnicas diagnósticas

5.7.1- Análise das técnicas diagnósticas a partir do exame de Reação da Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp.

Dos cinco animais positivos ao exame molecular para *Leishmania* spp., dois animais (40%) também foram positivos aos testes de RIFI, três animais (60%) foram sororreativos também ao teste de ELISA com antígeno bruto, quatro animais (80%) foram positivos para os exames de hemocultura e um animal (20%) foi positivo ao ELISA com rK39 (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação dos resultados do exame de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. comparados com os teste sorológicos da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA e hemocultura a partir de amostras de gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

Resultados dos Exames Diagnósticos					
<i>Leishmania</i> spp.					
Gato	Molecular	Sorológicos			Parasitológico
	PCR	RIFI Titulação	ELISA (bruto) (N.E)	ELISA rK39 (N.E)	Hemocultura
15	P	N	2	0	N
47	P	80	7	1	P
48	P	N	0	2	P
49	P	N	3	0	P
50	P	80	0	3	P

P: Positivo; N: Negativo; NE: Nível de ELISA.

Ponto de corte para RIFI de *L. infantum* = 40 (Camargo, 1996).

Ponto de corte para ELISA bruto = N.E \geq (2) (Voller, 1980) /Ponto de corte para ELISA rK39 = N.E \geq (3) (Voller, 1980)

5.7.2 –Análise das técnicas diagnósticas para *Leishmania* spp. a partir da técnica de hemocultura

Dentre o nove animais com culturas positivas, pôde-se confirmar a presença de protozoários do gênero *Leishmania* em quatro amostras de sangue total (44,4%), a sororreatividade em sete animais testados (77,7%), pelas técnicas de RIFI e ELISA com antígeno bruto para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) e positividade em um animal (11,1%) pela técnica de ELISA com rK39 (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação dos resultados do exame de hemocultura. com os testes sorológicos de RIFI e ELISA e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. a partir de amostras dos gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

Resultados dos Exames Diagnósticos para <i>Leishmania</i> spp.					
Gato	Parasitológico	Sorológicos			Molecular
	Hemocultura	RIFI	ELISA(bruto)	ELISA rK39	PCR
		Titulação	(N.E)	(N.E)	
7	P	80	4	2	N
47	P	80	7	1	P
48	P	N	0	2	P
49	P	N	3	0	P
50	P	80	0	3	P
51	P	80	3	1	N
52	P	80	4	0	N
53	P	80	3	2	N
54	P	80	2	0	N

P: Positivo; N: Negativo; NE: Nível de ELISA.

Ponto de corte para RIFI de *L. infantum* = 40 (Camargo, 1966)

Ponto de corte para ELISA (bruto) = N.E \geq (2) (Voller, 1980)/ Ponto de corte para ELISA rK39= N.E \geq (3) (Voller, 1980)

5.7.3 – Análise das técnicas diagnósticas para *Trypanosoma cruzi* a partir da técnica de hemocultura

Dentre os nove animais positivos à hemocultura, nenhum apresentou positividade ao exame da Reação em Cadeia pela Polimerase para *Trypanosoma cruzi*, estando então descartada a hipótese de que as formas encontradas em culturas fossem epimastigotas. Nos teste sorológicos de RIFI, quatro animais foram reagentes (44,4%) e, ao exame de ELISA, apenas um animal (11,1%) apresentou sororreatividade ao *T.cruzi*.(Tabela 3).

Tabela 3: Comparação dos resultados do exame de hemocultura comparados com os testes sorológicos de RIFI e ELISA e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* em amostras de gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

Resultados dos Exames diagnósticos para <i>Trypanosoma cruzi</i>				
	Parasitológico	Sorológicos		Moleculares
Gato	Hemocultura	RIFI	ELISA	PCR
		Titulação	(N.E)	
7	P	20	3	N
47	P	40	0	N
48	P	N	0	N
49	P	N	0	N
50	P	N	0	N
51	P	40	0	N
52	P	N	0	N
53	P	40	0	N
54	P	N	0	N

P: Positivo; N: Negativo; NE: Nível de ELISA.

Ponto de corte para RIFI de *T.cruzi* = 20 (Camargo, 1966)

Ponto de corte para ELISA = $N.E \geq (2)$ (Voller, 1980)

5.7.4 – Comparação dos resultados dos animais com alterações clínicas, com os testes de hemocultura, sorológicos RIFI e ELISA (antígenos brutos e rK39) e da Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp.

Foram observados sinais clínicos em 30 animais (54,5%), sendo que 26 (42,3%) destes apresentaram alterações clínicas e diagnóstico positivo para *Leishmania* spp. em pelo menos um teste realizado (Apêndice 12) Observamos que dois animais (3,6%) concordaram a clínica com a RIFI, oito animais (14,5%) concordaram os aspectos clínicos com a hemocultura, houve concordância de três animais (60%) entre os sinais clínicos e quanto à PCR, nove (16,4%) animais apresentaram concordância clínica com a RIFI. Dezoito animais (32,8%) concordaram aspectos clínicos com ambas técnicas sorológicas aplicadas (RIFI e ELISA com antígeno bruto) e três animais (10%) concordaram a alteração clínica com a positividade ao teste de ELISA com rK39.

5.7.5- Comparação entre os testes de ELISA com antígeno bruto e ELISA com antígeno recombinante para *L.infantum* (syn. *L. chagasi*)

Verifica-se pelo teste de ELISA com a utilização de antígeno bruto de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), maior encontro de anticorpos anti-*Leishmania*, um total de 72,5% dos felinos, quando comparados com o teste de ELISA com antígeno recombinante rK39, com o total de 21,6% dos animais testados (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação entre os testes ELISA com os antígenos brutos de promastigotas de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) e proteína recombinante (rK39), no diagnóstico de leishmaniose em gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Iha Solteira, SP. Botucatu, 2013.

Resultados dos testes ELISA			
(Antígenos brutos e rK39)			
ELISA	Positivo	Negativo	Total
Antígeno bruto	37	14	51
rK39	11	40	51

5.8 Análise Estatística-Resultados

Foram calculados os valores referentes aos resultados dos testes diagnósticos da PCR, a partir do DNA extraído em amostras de sangue dos felinos domésticos, hemocultura, RIFI e ELISA (antígeno bruto e rK39), os quais podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Percentual dos casos positivos de Leishmaniose e doença de Chagas em gatos domésticos da Associação protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2012.

	np / Total	%
Leishmaniose		
Hemocultura	9/55	16,4
Sorológico RIFI	32/51	58,2
Sorológico ELISA (Ag. bruto)	37/51	67,3
Sorológico ELISA rK39	11/51	21,6
PCR sangue	5/55	9,1
Doença de Chagas		
Hemocultura	9/55	16,4
Sorológico RIFI	28/51	50,9
Sorológico ELISA	20/51	36,4
PCR sangue	0/55	0,0

Np: número de positivos

Observou-se que houve discordância moderada (coeficiente Kappa= 0,51) comparando-se os resultados obtidos pela PCR de sangue total em relação à hemocultura. Quanto às demais variáveis, não houve concordância significativa entre os testes. A partir da análise da concordância entre PCR de sangue total em relação à hemocultura, RIFI, ELISA (Ag. Bruto) e ELISA com rK39, foram calculados a sensibilidade e especificidade relativa destes métodos empregados. Foi verificada

uma alta sensibilidade entre os teste de PCR de sangue total com o diagnóstico de hemocultura, observando-se 80% de sensibilidade e 90% de especificidade entre as técnicas A segunda técnica que apresentou maior especificidade e sensibilidade, (78,3% e 72%) respectivamente, em relação à PCR de sangue, foi o ELISA com rK39. Estes resultados podem ser verificados na tabela 6.

Tabela 6 – Comparação entre testes diagnósticos para *Leishmania* spp. utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de sangue total como teste padrão ouro. Botucatu, SP, 2013.

Método (n)(ng)(nt)	Ac.%	Sens.%	Esp.%	VPP%	VPN%	Kappa	P
Hemocultura (55)(5)(9)	89	80	90	44,4	97,8	0,51	0,001
Sorológico RIFI (51)(5)(32)	39	60	37	9,4	89,5	-0,009	0,894
Sorológico ELISA (Ag. Bruto) (51)(5)(37)	25	40	23,9	5,4	78,6	-0,094	0,086
Sorológico ELISA rK39 (51)(5)(11)	72	20	78,3	9,1	90,0	-0,011	0,928
PCR (Hemocultura) (55)(5)(0)	90	0,0	100	0,0	90,9	--	--

n: Número de gatos considerados na análise;

ng: Número de gatos com Leishmaniose pelo PCR no sangue

nt: Número de gatos com Leishmaniose pelo teste sob avaliação.

DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

O município de Ilha Solteira é considerado uma área endêmica para Leishmaniose Visceral (LV), por conter casos registrados da doença em humanos, animais domésticos e silvestres (37, 38, 107). Um fator relevante é o fato da sede da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA) estar localizada na zona rural da cidade, conter em seu entorno famílias com criadouros de porcos e galinhas, e grande acúmulo de matéria orgânica, fatores que facilitam o crescimento e desenvolvimento dos flebotomíneos e também a manutenção de triatomíneos. O acúmulo de matéria orgânica proporciona um ambiente favorável para o ciclo das leishmanioses (108). Camargo-Neves et al. (109), afirmaram que a presença de matéria orgânica, troncos de árvores, raízes e vegetações no solo representam possíveis criadouros e abrigos para vetores. Além disso, Silva et al. (110), verificaram que a Associação mantém cães sabidamente positivos para leishmaniose visceral, fato que propicia a manutenção do ciclo biológico dos flebotomíneos e a disseminação da zoonose para os felinos, os quais são mantidos muito próximos aos cães.

O gato doméstico pode ser infectado por diversas espécies de *Leishmania*, podendo ou não ser sintomático (29). Dessa maneira, dentro de uma área endêmica para leishmaniose pode ocorrer um percentual elevado de indivíduos saudáveis, mas sem apresentarem sinais clínicos, devido à resistência felina natural à infecção (56), ou manifestar sinais clínicos referentes a outras patologias, pois de acordo com Sobrinho et al. (111), gatos que vivem em regiões endêmicas para leishmaniose visceral, são mais propensos a manter co-infecções com FIV, podendo apresentar sinais clínicos semelhantes aos da LV. Portanto, necessita-se de um diagnóstico

eficaz, com o mínimo de reações cruzadas, a fim de determinar-se a presença de *Leishmania* spp., especialmente em regiões endêmicas.

Neste trabalho, alguns dos animais possuíam aspectos clínicos alterados, tais como presença de alopecia, lesões na orelha e focinho e emagrecimento, dados similares àsquelas descritas nos achados de leishmaniose felina no Brasil (55, 49, 112). De acordo com Bonfante-Garrido et al. (66), as regiões mais afetadas nos felinos são a cabeça (75%), o nariz (48%), a orelha (26%) e região ocular (18,6%).

É importante ressaltar que as lesões podem proporcionar porta de entrada para insetos hematófagos como, por exemplo, flebotomíneos e triatomíneos, que possuem maior capacidade em picar áreas com menor quantidade de pelos (66). Eventualmente, no caso da leishmaniose, a mesma pode assumir uma forma aguda atípica e o animal vir a óbito em poucas semanas (11). Podem ocorrer anorexia, depressão, emese, diarreia, desidratação, perda de peso e estomatite (43, 69, 70, 51).

Lesões de pele foram encontradas em 13 animais (13/55), e de acordo com Costa et al. (104) não é possível afirmar que tais alterações sejam decorrentes de uma infecção por *Leishmania* spp., uma vez que não foram excluídas outras enfermidade infecciosas nos animais avaliados. Além disso, é importante ressaltar que os gatos do estudo não eram castrados e viviam todos juntos em uma única baia; portanto, não podemos descartar a possibilidade da origem das lesões nas regiões faciais e corporal serem provenientes de brigas entre os gatos. Desta forma, torna-se importante o diagnóstico clínico do animal, pois é sabido que gatos convivem facilmente com patologias de caráter crônico, sendo a mesma condição não vista em cães.

A hemocultura é uma técnica muito útil para o isolamento e identificação do parasita, sendo muito utilizada para o diagnóstico da doença de Chagas e também na

pesquisa de hemoparasitas no sangue. Em estudos conduzidos por Chiari et al.(114), em uma análise comparativa entre métodos diagnósticos sorológicos, molecular e parasitológico direto, afirmou-se a viabilidade da detecção de protozoários flagelados em amostras de culturas, porém, não sendo possível a identificação da espécie do parasita levando em consideração somente a forma flagelar. Com a aplicação dos cultivos sanguíneos neste trabalho, foi possível encontrar animais com cultura positiva (9/55), e os mesmos apresentaram ao exame clínico sinais de emagrecimento, alopecia e alguns com lesões em pavilhão auricular. Embora a técnica de hemocultura tenha representado uma ferramenta diagnóstica importante para que se avaliasse a presença de protozoários flagelados nas culturas de sangue dos gatos examinados, tornou-se necessário, posteriormente, a confirmação molecular, onde foi possível a diferenciação entre os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, os quais são semelhantes morfológicamente em cultivo. Observou-se que não houve positividade à técnica de PCR para *Trypanosoma cruzi* descartando-se a possibilidade das formas flagelares observadas serem epimastigotas deste parasita.

Segundo Laurenti (115), a falta de adequação na esterilidade durante o processo da coleta de material e semeadura nos meios pode levar ao crescimento de bactérias e fungos que inibem ou impedem o crescimento de leishmanias, diminuindo, assim, a sensibilidade do teste. Um trabalho realizado por Marodin (116), com felinos domésticos, no diagnóstico pela técnica de isolamento, não houve crescimento nos aspirados de medula óssea e linfonodos. No entanto, em nossa pesquisa, todos os procedimentos para a realização da técnica de hemocultura foram realizados de forma adequada, asséptica e com a menor manipulação possível do

sangue coletado, possibilitando o isolamento de protozoários flagelados em alguns felinos domésticos, como é recomendado por Luz (117).

A técnica sorológica de RIFI era consolidada juntamente com a técnica de ELISA em inquéritos sorológicos caninos para leishmaniose visceral, apresentando boa sensibilidade relativa. É importante ressaltar que, possíveis reações cruzadas em animais sabidamente positivos para leishmaniose, apresentam reações cruzadas com *T.cruzi*, o que direciona para a importância do diagnóstico epidemiológico, que deve ser considerado juntamente com o resultado laboratorial (92).

Os protozoários causadores da leishmaniose e da doença de Chagas pertencem à família *Trypanosomatidae* e compartilham vários antígenos que propiciam a causa de reações cruzadas em diagnósticos sorológicos (118, 119, 92). Observando os resultados finais da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), realizada nos animais deste estudo, pôde-se verificar a positividade sorológica tanto para *Leishmania infantum*, quanto para *T.cruzi*, revelando uma incidência de reações cruzadas nesses animais (Apêndice 5). Das 51 amostras testadas para *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*, 16 (31,4%) demonstraram título para *L.infantum* maior que para *T.cruzi*, três soros (5,8%) revelaram títulos para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*). iguais à *T.cruzi*, e 23 (45,1%) apresentaram títulos para *T.cruzi* negativos.

Pôde-se observar também que, em quatro soros (7,8%), houve uma maior diferença na titulação para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) e para *T.cruzi*, fato que sugere reação cruzada (título 160 e 20 respectivamente) e em cinco soros (9,8%), os títulos para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) eram muito próximos aos títulos para *T.cruzi*, fato que sugere a aplicação de outros métodos diagnósticos para

se chegar ao resultado definitivo. Em dez soros (19,6%), os títulos para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) e *T.cruzi* apresentaram uma diluição de diferença, ou iguais, enfatizando a comprovação do diagnóstico por técnicas moleculares. Nove soros (17,6%) foram reagentes apenas para *T. cruzi* e 13 soros (25,5%) foram reagentes somente para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*), fato que sugere a real infecção dos gatos por estes protozoários.

Os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, por não serem 100% sensíveis e específicos e falharem na não detecção de animais infectados no período pré-patente da doença. Dependendo do antígeno utilizado e das condições da RIFI, sua sensibilidade pode variar entre 90% e 100% e a especificidade, entre 80% a 100% (89,53). Em trabalho realizado por Zanette (95) com 50 cães parasitologicamente positivos, a sensibilidade foi de 98% e especificidade de 91% para a RIFI, utilizando como antígeno formas promastigotas de *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*). Em relação à observação de reações cruzadas, foi demonstrado que 42,9% das amostras de soros de cães chagásicos foram reagentes para RIFI com antígenos de promastigotas de *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*).

Em pesquisa realizada na cidade de Bauru – SP, área endêmica para leishmaniose visceral, observou-se que das 150 amostras de cães testadas, em quatro soros (2,7%), ocorreu uma grande diferença na titulação para *Leishmania* spp. e para *T.cruzi*, sugerindo intensa reação cruzada. Em 16 soros (10,7%) houve resultados de titulação sugestivos de reação cruzada de *Leishmania* spp. com *T.cruzi*, já que os títulos para *Leishmania* spp. eram maiores que os títulos para *T.cruzi* e, em 42 soros (28%), os títulos para *Leishmania* spp. eram muito próximos aos títulos de *T.cruzi* e, portanto, outros métodos diagnósticos deveriam ser utilizados para se chegar ao

diagnóstico definitivo (92). Segundo Troncarelli et al. (120), em outra pesquisa realizada em cães para diagnóstico elucidativo da leishmaniose e da tripanossomíase canina em Bauru, do total de 200 soros testados, 33 (16,5%) apresentaram resultado positivo à sorologia para ambos parasitos e, em 30 amostras de fígado e/ou de baço dos 33 cães que apresentavam anticorpos contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi*, tanto o exame parasitológico direto como a PCR para *Leishmania* spp. resultaram positivos, indicando a verdadeira infecção por este parasito e a ocorrência de reações cruzadas.

A sorologia é um método indireto capaz de medir a infecção, não medindo o grau de parasitismo, a presença da doença ou ainda o potencial de transmissão que o animal possa ter para o vetor (115). Dessa forma é correto afirmar a incidência da reatividade cruzada nos diagnósticos e conseqüentemente os resultados de falsos positivos e negativos, o que torna necessária a confirmação do diagnóstico por técnicas moleculares.

Na comparação entre a técnica sorológica de RIFI e a parasitológica de hemocultura, cujos resultados podem ser verificados no Apêndice 13, observou-se discordância de positividade em apenas dois gatos, nos quais o parasita foi encontrado em meio de cultura, entretanto não apresentaram reatividade sorológica à RIFI, para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*), e para *Trypanosoma cruzi*, dados que concordam com o trabalho de Bresciani et al (121), realizado em felinos procedentes de Araçatuba, tendo-se encontrado positividade de 0,7% (2/283) ao exame parasitológico direto de imprint de linfonodo, porém nenhum animal apresentou positividade ao teste sorológico de RIFI. Para tal fato pode-se elucidar que, durante a coleta de sangue, o animal estivesse em período de incubação da doença, apresentando as formas promastigotas de *Leishmania* e/ou epimastigotas de

T.cruzi no sangue, mas sem a produção de anticorpos de defesa para a infecção, ou ainda, que o animal estivesse em imunossupressão por alguma condição debilitante.

No teste de ELISA indireto com a utilização de antígenos brutos, a soropositividade foi de 72,5% para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) (37/51), e 39,2% para *T.cruzi* (20/51), valores semelhantes aos encontrados em estudo realizado por Martín-Sánchez et al (54), no sudeste da Espanha, com 183 gatos encaminhados a clínicas veterinárias, encontrando-se valores próximos a 60% de soropositividade para *Leishmania* spp, e superiores aos achados de Costa et al.(113), onde encontrou-se positividade em 11,5% em seus gatos estudados da região de Araçatuba; resultados discordantes também aos achados de Diakou et al. (122), demonstrando-se a soropositividade em 3,87% dos gatos estudados na Grécia. Valores superiores aos relatados em uma trabalho realizado por Nasereddin et al (123), em Jerusalém, revelou-se a prevalência de 6,7% de gatos positivos pela técnica de ELISA. A soropositividade para *T.cruzi* foi inferior aos dados obtidos por Wisnivesky et al. (124), obtendo-se prevalência de 79% dos gatos, em estudo realizado na Argentina.

Comparando-se técnicas sorológicas de RIFI e ELISA indireto com antígeno bruto para *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) empregadas neste trabalho, pudemos observar que ocorreu discordância de resultados em 29,4% das amostras (15/51), onde 9,8% (5/51) apresentaram soropositividade à RIFI e foram negativas ao ELISA e 19,6% (10/51) foram sororreativos ao ELISA e negativos pela RIFI (Apêndice 14). Esse resultados corroboram com o trabalho realizado por Figueiredo et al. (58), onde nenhum felino foi positivo à Reação de Imunoflorescência e apenas um animal apresentou reação positiva ao ensaio imunoenzimático. De acordo com Jesus et al. (125), esse fato pode ser explicado

devido a ocorrência de reações cruzadas entre tripanossomatídeos e outros organismos filogeneticamente distantes, em técnicas que utilizam antígenos totais, tais como o ELISA, tornando-se assim limitadas em termos de especificidade. Para as técnicas de RIFI e ELISA para *T. cruzi*, a discordância encontrada foi de 43,1%, sendo que em 29,4% dos animais (15/51) ocorreu sororreatividade para RIFI e não houve reação para o ELISA e, em 13,7% (7/51) apresentaram reatividade para o ELISA e não foram reativos pela técnica de RIFI (Apêndice 15). Pode-se perceber que o índice de discordância pela RIFI foi maior, fato que comprova a ocorrência de reações cruzadas com antígenos de *Leishmania* spp. pela técnica sorológica. Devido a escassez de dados na literatura para a técnica de ELISA para *T. cruzi* em felinos, a comparação de resultados foi prejudicada.

No diagnóstico pelo ELISA com rK39, obteve-se a positividade em 11 animais (21,6%), valor significativamente menor do que o encontrado pelo teste de ELISA com a utilização de antígeno bruto, cuja positividade foi encontrada em 37 animais (72,5%). Isso é possível devido a limitação dos antígenos totais brutos quando se trata de especificidade, apresentando reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. Tem sido empregada a utilização de antígenos recombinantes no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, porém, há poucos estudos que relatam a utilização do antígeno recombinante no diagnóstico em felinos. De acordo com o primeiro trabalho com ELISA utilizando rK39 em felinos, realizado por Neto (126), apesar dos antígenos totais tenderem a apresentar maior variedade de epítomos detectáveis por anticorpos de animais infectados, não houve discordância entre os ensaios imunoenzimáticos com antígenos recombinantes e antígeno bruto, onde foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* em 15,0% e 21,2% dos animais,

respectivamente. Um trabalho com cães com LVA aguda realizado por Badaró (127), foi verificado sensibilidade de 99% com o teste ELISA utilizando antígeno bruto e rK39, o que segundo os autores, indicam a eficácia do antígeno rK39 em cães sintomáticos. Em outro estudo comparativo das técnicas de ELISA com antígeno bruto e ELISA com rK39, realizado por Silva et al. (110) com os cães da APAISA, demonstraram que as taxas de positivities do ELISA-solúvel bruto foram mais elevadas e que apresentaram maior concordância entre os resultados do que pelo ELISA com rK39, apresentando concordância de 58,6%. Os resultados obtidos nesse trabalho, demonstra a especificidade de 78,3% do rK39, quando comparado à PCR, diferentemente da especificidade de 23,9% encontrada pelo ELISA com antígeno bruto. Quanto mais simples e puro for o antígeno, maior será a especificidade da técnica, pois haverá menor probabilidade de que ocorram reações cruzadas com outros antígenos e, conseqüentemente, menor ocorrência de resultados falsos positivos (128). Dessa forma, a especificidade do rK39 faz com que a técnica se torne um teste diferencial no diagnóstico de LV, tendo o mesmo sido preconizado, segundo nota técnica pelo Ministério da Saúde, a substituição do protocolo de diagnóstico da LVC, passando a ser utilizado o teste imunocromatográfico com antígenos recombinantes como triagem e o teste de ELISA como confirmatório (93).

A diferença detectada entre os resultados de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares pode ser devida a alguns fatores, como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasita, baixa quantidade de *Leishmania* spp. circulantes no momento da coleta e, conseqüentemente, podendo não ser detectado à prova de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); ainda, algumas reações cruzadas da sorologia que podem dever-se

à existência de determinantes antigênicos e de proteínas comuns a parasitas como *Trypanosoma cruzi* (92, 119).

Em relação aos dois diferentes tipos de amostras utilizadas para a realização da PCR, podemos observar que o sangue total mostrou-se mais sensível para a detecção da *Leishmania* spp., apresentando 9,1% (5/55) de positividade, sendo que nas amostras de hemocultura, a positividade foi nula no diagnóstico pela PCR. Esses resultados concordam com o trabalho de Marodin (116) que obteve 100% de positividade pela PCR de sangue, embora com 90% para medula óssea e 80% para pele de gatos procedentes do Distrito Federal. Outro trabalho realizado em Andradina, região endêmica, Coelho et al. (129), detectaram a infecção por *Leishmania* spp. em 5,76% dos felinos testados, dados que corroboram com os estudos de Rossi (130), em Araçatuba, evidenciando 6,5% de gatos infectados.

Nesta pesquisa, dos cinco animais positivos (9,1%) ao exame molecular para *Leishmania* spp., um animal (20%) também foi positivo aos testes de RIFI e ELISA com antígeno bruto; um animal (20%) foi positivo para os exames de hemocultura, RIFI e ELISA concomitantemente; quatro animais (80%) foram positivos à hemocultura; dois animais (40%) foram positivos aos testes de hemocultura e RIFI; três animais (60%) foram positivos somente ao ELISA com antígeno bruto e somente um animal (20%) foi positivo ao ELISA com rK39. É bastante interessante o fato de que, em nosso trabalho, em nove gatos com exame parasitológico positivo, quatro animais (44,4%) foram positivos ao diagnóstico molecular. Ainda, dos 37 animais sorologicamente positivos, apenas três (8,1%) apresentaram positividade à PCR para *Leishmania* spp.. Este fato concorda com os estudos de Martín-Sánchez et al.(54), os quais verificaram amostras de soros de 183

gatos pela técnica de RIFI e observaram que os animais com títulos mais altos de anticorpos no soro, foram os que apresentaram menor positividade ao exame molecular da PCR. Confrontando os dados, Maia et al. (59), em uma comparação de testes sorológicos e moleculares para a detecção de infecção por *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) em gatos, observaram um número maior de animais positivos a partir do método molecular (18,7%) em relação aos teste sorológicos (7,8%). Esse acontecimento sugere que a resposta imune nos gatos infectados seja do tipo celular, e não humoral como nos cães com LV (131).

É importante relacionar os aspectos clínicos do animal com o diagnóstico, principalmente em animais de região endêmica para a enfermidade, tendo em vista que em nosso trabalho, observamos que dos 30 felinos (54,5%) que apresentaram alterações clínicas compatíveis com os achados na literatura de gatos infectados por *Leishmania* spp. 26 animais (42,3%) apresentaram positividade em pelo menos um tipo de diagnóstico. Quatro animais (7,3%) apresentaram sinais clínicos, mas não foram positivos para *Leishmania* spp. em nenhum dos testes aplicados.

É interessante ressaltar que, dos cinco animais positivos à PCR para *Leishmania* spp., apenas dois não apresentaram alterações clínicas evidentes, caracterizando-se como animais portadores assintomáticos, fato muito comum em cães portadores da LVC, que mantêm a doença de forma crônica e assintomática.

Não podemos descartar a possibilidade da infecção desses gatos por outros agentes, e que talvez os sinais clínicos encontrados possam ser devido a outro tipo de infecção, pois de acordo com Lappin et al. (132), afirmam que geralmente os felinos possuem a capacidade de conviver com patologias crônicas por longos períodos, sem necessariamente exibir sinais ou sintomas da infecção.

Analisando as técnicas utilizadas nos diagnósticos da leishmaniose visceral e doença de Chagas, podemos ressaltar que o cultivo de hemocultura em meio LIT foi a que apresentou resultados que indicam sua utilização em levantamentos epidemiológicos, por apresentar-se como um teste de maior sensibilidade e especificidade quando comparadas ao padrão ouro (PCR). Os testes de RIFI e ELISA com a utilização de antígenos brutos, devido à ocorrência de reações cruzadas, são mais adequados para sua utilização na triagem em inquéritos de animais em regiões endêmicas, com posterior confirmação com exame molecular. O ELISA com rK39, por sua especificidade, pode ser utilizado como diagnóstico sorológico confirmatório, porém ainda há a necessidade de confirmação com o diagnóstico molecular.

Desde a primeira evidência da transmissibilidade de formas promastigotas de *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) de um felino para o vetor da doença pelo xenodiagnóstico, descrito por Marolli et al. (133) na Itália, bem como em outro relato descrito por Silva et al.(134), em Belo Horizonte, sugere-se a necessidade de estudos adicionais, principalmente em áreas endêmicas, para se determinar o real papel do gato doméstico no ciclo da leishmaniose visceral, bem como associar técnicas diagnósticas parasitológicas, sorológicas e moleculares à epidemiologia e clínica dos animais.

CONCLUSÃO

8-CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que:

- Os testes sorológicos de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA indireto com antígenos brutos apresentaram maior positividade em relação às técnicas da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), hemocultura e ELISA com rK39, tendo-se observado a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) e *T. cruzi*;
- A associação dos testes de hemocultura e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de sangue para *Leishmania* spp., foi capaz de identificar a infecção por *Leishmania* spp. nos gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA);
- Tendo em vista as conclusões acima, podemos afirmar que a infecção por *Leishmania* spp. está presente entre os gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), exercendo o papel de reservatórios para esta zoonose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 -Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999; (354) 9185: 1191-9.
- 2- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005; 366:1561-1577.
- 3- Wilson ME, Jerónimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. Microb. Pathog.. 2005; 38. (4):147-160.
- 4- World Health Organization (WHO). Control of the Leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis; Geneva, 22-26 Mar 2010. Report No.: 949
- 5- Kuhls AMZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schonian G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World Plos Negl Trop Dis.2011; 5: 1155-1171. Pubmed; PMID 21666787.
- 6- Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância epidemiológica -situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Brasília. 2001. Ministério da Saúde. 2: 27-29.
- 7- Hervás J, Méndez A, Carrasco L, Gómez-Villamandos Jc. Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). Vet Rec 1996; 139: 293-295.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biochemical journals. Ann Inter Med 1997; 126: 36-47

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

- 8- Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Le Blancq S, Evans DA, Peters W, Bettini S, Gradoni L, Pozio E. Enzymatic typing of 11 strains of *Leishmania* isolated, in mainland Italy from the visceral murine, canine and vulpine forms: demonstration of an enzymatic variant in the fox (*Vulpes vulpes*) and the dog. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1982; 57: 527-531.
- 9-Neafie RC, Connor DH. Visceral leishmaniasis. In: Bindford, C.H., Connor, D.H. (Eds.), *Pathology of Tropical and Extraordinary Disease*. Armed Forces Institute of Pathology 1976. Washington, DC, (1): 265-277.
- 10-Bettini S, Pozio E, Gradoni L. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). Part II, leishmania from wild rodentia and carnivore in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980, 74: 77-83.
- 11-Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Levièvre A, Haas P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet parasitol.* 1998. (75):273-277. Pubmed; PMID 9637231.
- 12-Williams AO, Mutinga J, Rodgers M. Leishmaniasis in a domestic goat in Kenya. 1991. *Mol. Cell Probes*, (5): 319-325.
- 13-Aguilar CM, Rangel EF, Deane LM. 1986. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brasil. 1896. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, (81): 471-472.
- 14-Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schonian G, Zaher H, Burkhardt E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. 2002. *Vet Parasitol*, (109): 9-17.

- 15- Solano-Gallego L, Fernández-Bellon H, Serra P, Gállego M, Ramis A, Fondevila D, Ferrer L. 2003. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. 2003. *Equine Vet J*,(35):320-323.
- 16-Rolào N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. 2005. *Parasite*, (12):183-186.
- 17- Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales. Washington 1986. Organization Panamericana de la Salud, 2:989.
- 18- Fowler ME. Zoo and wild animal medicine. Philadelphia. 1986. W.B. Saunders. 2:1127.
- 19- Slappendel Rj, Ferrer L. Leishmaniasis. *Microbiology and Infectious Diseases of Dogs and Cats*. (ed. Green C) W.B. Saunders. Philadelphia 1998; 450–458.
- 20- Del Giudice P, Marty P. Cat-associated zoonosis: don't forget rabies and leishmaniasis *Arch Intern. Med.* 2003. 145-152.
- 21- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. 2004. *Rev Bras Epidemiol*. (7): 338-349.
- 22- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- 23- Ministério da Saúde (Brasil), Portal da Saúde, Sistema Único de Saúde, São Paulo, Brasil, 2013. [Update 30 jan]. Disponível em: www.portal.saude.gov.br/portal/saude.

- 24- Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo/ Coordenação Vera Lúcia Fonseca de Camargo-Neves – São Paulo: A Secretaria, 2006.
- 25- Lamothe J, Ribat EX. Leishmaniose canine: du diagnose au traitement. *Bul Soc Vet Pratique de France*, 1996.(80): 197-222.
- 26-Feitosa MM. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente Infectados. In: Fórum Sobre Leishmaniose Visceral Canina, I, Jaboticabal, SP. Anais. 2006. P8-13.
- 27- Desjeux, P. Urbanisation of the leishmaniasis Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International of the Canine Leishmaniasis Forum, Spain, Sevilla. 2002. p.49–55.
- 28- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis* 2004.(27):305-318. Pubmed; PMID 15225981.
- 29- Dantas-Torres, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*. 2006. (3): 537-541.
- 30- Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF. Na investigation of *Leishmania* spp. In *Didelphis* spp. From urban and-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet parasitol*. 2007. (150):283-290. Pubmed; PMID 17996372.
- 31- Iversson LB, Camargo ME, Rocha-Silva EO, Chieffi PP, Barros JAC. Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctones da Grande São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*.1979.13 (2):159-167.

- 32- Luvizotto MCR, Biazzono L, Eugênio FR, Andrade AL. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: Congresso Brasileiro De Clínicos Veterinários De Pequenos Animais, 20. Águas de Lindóia. Anais:Águas de Lindóia, 1999.24-25.
- 33- Galimberti MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI, Araujo MFL, Tanicuchi HH, Barbosa JAR, Barbosa JER, Tolezano JE, Pinto PLS. Leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop.1999. 33(32):217.
- 34- Boletim Epidemiológico Paulista (Brasil). São Paulo, 2011; 8(96), 32-36.
- 35- Assis J, Queiroz NMGPQ, Starke-Buzetti WA, Tenório MS, Noronha-Junior ACF. Leishmaniose Visceral Canina: Novos Casos no Município de Ilha Solteira-SP. In: VIII Semana de Divulgação Científica da UNESP de Araçatuba. Anais. Araçatuba: 2008. SEDIC.
- 36- Paulan SC, Silva HR, Lima EACF, Flores EF; Tachibana VM, Kanda CZ, Noronha-Júnior ACF, Dobre PR. Distribuição espacial da leishmaniose visceral canina em Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. Eng Agríc. 2012; 32:4.
- 37- Queiroz NMGP, Assis J, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti, WA. Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com RIFI e ELISA-teste. Rev Bras de Parasitol Vet. 2010; (19):32-38
- 38- Assis J, Queiroz NMGP, Silveira RCV, Nunes CM, Oliveira TMFS, Noronha Jr. ACF. Et Al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose

Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. Rev Bras Parasitol Vet. 2010; (19): 17-25.

39 Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo. Leishmaniose Visceral Americana. Casos Autóctones e Óbitos de LVA, no Estado de São Paulo, 2010 a 2012. São Paulo; 2012 [Update 20 Nov]. Disponível em: www.cve.saude.sp.gov.br

40- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio, T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet. parasitol. 2007.(145):357-360.

41- Simões-Mattos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilaqua CML, Prata-Júnior RC, Holanda CM, Rondon FCM, Bastos KMS, Coêlho ZCB, Barral A, Pompeu MML. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. Vet. Parasitol.2005. (127): 199-208. Pubmed; PMID 15710520.

42- Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. (Rio de Janeiro). 1996. (91):19-20.

43- Hervás J, Chacón-M De Lara F, Sánchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castilho JA, Gómez-Villamandos JC. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. J. Fel. Med Surg. 1999. (1): 101-105.

44- Underhill-Day JC. A Literature Review of Urban Effects on Lowland Healths and Their Wildlife. English Nature 2005. p.8.

- 45- Da Silva AV, De Sousa CCD, De Pita PD, Brazil RP, Carreira JC. The first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2008.105(1):92-94.
- 46- Sergent Ed Et, Lombard J, Quilichini M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bulletin de Société de Pathologie Exotique.* 1912. (5): 93-98.
- 47- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int. J Parasitol.* 2005. (35):1169-1180.
- 48- De Souza AL, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet. Parasitol.*2005; 128:41-45
- 49- Savani ES, De Oliveira Camargo MC, De Carvalho MR, Zampieri RA, Dos Santos MG, D'auria SR, Shaw JJ, Floeterwinter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia Country, São Paulo State, Brazil. *Vet parasitol.* 2004. (120): 229-233.Pubmed; PMID 15041097.
- 50- Rufenacht S, Sager H, Muller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, Roosie PJ. Two cases of leishmaniosis in Switzerland. *Vet. Rec.*2005. (156): 542-545.
- 51- Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F., 2002. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol* 106 (3), 81–191.

- 52- Simões-Matos L, Bevilaqua CML, Mattos MRF, Pompeu MML. Feline leishmaniasis: uncommon or unknown? Rev. port. ciênc. vet..2004. 99 (550):79-87.
- 53- Mancianti, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? Parasitol. 2004. (46):203-206.
- 54- Martín-Sanchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. Vet Parasitol. 2007. (145):267-273.Pubmed; PMID 17157440.
- 55- Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira SA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, Cuzzi T, Marzochi MCA, Schubach AO. American cutaneous Leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Trans. R Soc Trop Med Hyg. 2004. (98):165-167.Pubmed; PMID 15024926.
- 56- Kirkpatrick Ce, Farrell Jp, Goldschmidt Mh. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infection in domestic cats. Exp parasitol. 1984. (58): 125–131.
- 57- San Martin MS et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia Country, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004. (120): 229-23
- 58- Figueiredo FB, Bonna ICF, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TMV, Amendoeira MRR, Madeira MF. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2009. (42):141-145.

- 59- Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of Cats in Zoonotic Leishmaniasis in Portugal. *Vector- Vector borne zoonotic dis.* 2008. (8): 4. Pubmed; PMID 18471058.
- 60- Shaw SE, Birtles RJ, Day, M.J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. *J Feline Med Surg.* 2001.(3):193–209.Pubmed; PMID 11795958.
- 61- Johnson RN, Ngunbi PM, Nwanyumb JP, Roberts CR. Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropical* in Kenya. *Med Vet Entomol.* 1993.(7): 216–218.
- 62- Ogosuku E, Perez JE, Paz L, Nieto E, Monje J, Guerra H. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. In Peru. *Ann. Trop Med Parasit.* 1994.(88):329–335.
- 63- Pennisi MG. Case report of *Leishmania* spp. infection in two cats from Aeolian Archipelago (Italy). In: *Proceedings of the 24th WSAVA Congress. Lyon 1999.* 23rd 26th (on CD-ROM).
- 64- Craig TM, Barton CL, Mercer SH, droleskey BE, Jones LP. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; (35): 1100-1102.
- 65- Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. *Bras Med.* 1940.(54): 180.
- 66- Bonfante-Garrido R, Valdivia O, Torrealba J, García MT, Garófalo MM, Urdaneta I, Urdaneta R, Alvarado J, Copulillo E, Momen H, Grimaldi-Junior G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. *Revista Científica FCV-LUZ.* 1996. (6):187-190.

- 67- Peña MT, Roura X, Davidson MG. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol.* 2000.(3):35-41.
- 68- Laruelle-Magalon C, Toga I. Un cas de leishmaniose feline. *Prat Méd Chir Anim Comp.* 1996; (31): 255-261.
- 69- Hervás J, Chacon M, De Lara, F. Granulomatous (psuedotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. *Vet. Rec.* 2001.(149):624-625.Pubmed; PMID 11761295.
- 70 -Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. Therapy of ocular and visceral leishmaniosis in a cat. *Vet Ophthalmol.* 2005. 8(1):71-75.
- 71- Souza AI, Nunes VLB, Borralho VM, Ishikawa EAY. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: A case report. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2009.15.(2):359-365.
- 72- Grevot A, Jaussaud HP, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Haas P, Breton C, Bourdoiseau G. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite* 2005.12(3):271-275. Pubmed; PMID 16218216.
- 73- Souza, W de. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ed. Rio de Janeiro. 2000. Guanabara/Koogan S.A. p.88-126.
- 74- Barreto MP. Tripanossomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. *Revista Brasileira do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.*1965. (7):305-315.

- 75- Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. Cadernos de Saúde Pública. 2000; 2:7-12.
- 76 Coura JR. Tripanossomose, doença de Chagas. Revista Ciência e Cultura 2003.55 (1):30-33.
- 77- Brenner Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan S.A 2000.21-46.
- 78- Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo JrJP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil . J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2005.11(4):492-509.
- 79- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1994. (27):146-148.
- 80- Portela-Lindoso AAB, Shikanay-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Revista Brasileira de Saúde Pública. 2003. 37.1:107-115.
- 81- Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989, (27):1477-1482.
- 82- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Specie specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 1999; (72): 203-212.

- 83- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in Dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol.* 2003. (113):99-103. Pubmed; PMID 12695035.
- 84- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002. 40.1: 210-215. Pubmed; PMID 11773118.
- 85- Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. *Int Ver Cytol Suppl.* 1986; (99): 119-179.
- 86- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília. 2003. 9-18
- 87- Mohammed AR, Wrigth EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ.; Pondman KW. Serodiagnosis Sudanese visceral an mucosal leishmaniasis: comparasion of Elisa-immunoflorescence and indirect haemagglutination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1985. (80) :271-274.
- 88- Brasil. Ministério Da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde. 1996
- 89- Mancianti F, Pedonese F. Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluoresce assay. *Vet Parasitol.*1996. 65. 1:1-9.

- 90- Alvar J, Canãvete C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 2004. (57): 1-58.
- 91- Gomes APS, Cordeiro RLR. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2004; 23 (1):238.
- 92 Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). *Braz. J Vet Res Anim Sci*. 2009; (46): 181-187.
- 93- Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº1, de 29 de dezembro de 2011. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- 94- Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 1999; (81):173-184. Pubmed; PMID 10190861.
- 95- Zanette MF. Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Araçatuba, SP. Tese [Mestrado em Ciência Animal] – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista. 2006.
- 96- Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine

leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay.

Vet Parasitol. 2002; (104):275-85.

97- Burns Junior JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; (90): 775-779.

98- Pinto PLS. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. Tese [Doutorado em Saúde Pública] – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2000.

99- Ávila HA, Pereira JB, Thiemann O, Paiva EDe, Degraeve W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J Clin Microbiol. 1993; 31:9. PMID: PMC265772

100- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda, M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003; (5): 574–583. Pubmed; PMID 12812349.

101- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y.. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol. 2000, 66 (5), 1933–193.

- 102 Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med Trop São Paulo. 1966; (8): 227-234.
- 103- Smith PK., Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Bioch. 1985; (150):76-85.
- 104- Lima VMF, Biazzono L, Silva AC, Correa APFL, Luvizotto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2005. 4. (25): 215- 218.
- 105- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, 359-371. In: Rose N.; Friedman H. Manual of clinical immunology. South Carolina: American Society for Microbiology, 1980; 359-371.
- 106- Machado RZ et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. Vet Parasitol. 1997; 71-(1):17-26. Pubmed; PMID 9231985.
- 107- Tenório MS, Oliveira E Sousa L, Paixao MS, Alves MF, Jusi MMMG, Paulan SC, Lima FL, Tasca KI, Machado RZ. , Buzetti WAS. Visceral Leishmaniasis In Captive Crab-Eating Fox *Cerdocyon Thous* (Carnivora, Canidae). J Zoo Wildl Med. Dez 2011; (42); 4:608-616. Pubmed; PMID 22204055.
- 108- Sherlock IA. Ecological interactions of visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; (91): 671-683.

- 109- Camargo-Neves VLE, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spinolla RMF, cruz OG. Utilização de ferramenta de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Cad Saúde Públ. 2001; (17): 1263-1267.
- 110- Silva DT, Starke-Buzetti WA, Alves MF, Paixão MS, Tenório MS. Comparação dos métodos ELISA (antígeno rK39 e solúvel bruto), RIFI e parasitológico para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. [Apresentação na XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP; 2012 nov 6-9; Ilha Solteira, SP].
- 111- Sobrinho LSV, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AMD, Lima VMF et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from na endemic área zoonotic visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2012; (187): 302-306. Pubmed; PMID 22285010.
- 112- Souza PT, Monteiro CLB, Frutuoso MS, Bastos KMS, Coelho ICB, Oliveira-Lima JW, Pompeu ML. Leishmaniose felina experimental. Rev Bras Parasitol Vet. 2004; (13):237.
- 113- Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Sobrinho LSV, Marcondes M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. J Res Anim Sci. 2010; 47:3.
- 114- Chiari E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; (94): 299-300.

- 115- Laurent MD, Lemos EM, Reis AB, Moreira MAB, Luvizzoto MCR, Corbett CEP et al. Evaluation of Kalazar Detect TM Rapid Test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Third World Congress on Leishmaniosis (Abstract Book), Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, 2005.
- 116- Marodin NB. Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pela *Leishmania* spp. nos felinos domésticos de uma região periurbana do Distrito Federal. Brasília. Tese [Mestrado em Saúde Animal]- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária; 2011.
- 117- Luz Z. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; (94): 295-298.
- 118- Ruíz-Sanches R, León MP, Matta V, Reyes PA, López R, Jay D, Montéon VM. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 3; (100).
- 119- Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL., Heredia V. Study of cases of leishmaniasis in the Province of Salta: evidences of mixed infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Medicina (Buenos Aires). 1996; (56):259-268.
- 120- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009; (164): 118-123. Pubmed; PMID 19625128.

- 121- Bresciani KDS, Serrano ACM, Matos LVS, Savani ESMM, D'Áuria SRN, Perri SHV, Bonello FL, Coelho WMD, Aoki CG, Costa AJ. Ocorrência de leishmania spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. 2010, 19; 2: 127-129.
- 122- Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. Specific anti-leishmania spp. antibodies in stray cats in Greece. J Feline Med Surg. 2009; (11): 728-730. Pubmed; PMID 19254858.
- 123- Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. Vet Parasitol. 2008; (158): 364-369. Pubmed; PMID 18986768.
- 124- Wisnivesky C, Gurtler C, Ricardo E, Solarz ND, Lauricella MA, Segura EL. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central área of Argentina. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1985; 27 (6): 346-352.
- 125- Jesus RCS, Corrêa ZC, Everdosa DR, Martins AP, Eliseu LS, Campos MB et al. Comparação das técnicas de RIFI (Ag.IECXAg Biomanguinhos) e Elisa no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Estado do Pará, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36 (supl.I):323-4
- 126- Neto LS, Martins CO, Machado RZ, Lima VMF. Uso dos antígenos total, FML e rK39 em ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *Leishmania* spp. em *Felis catus*. Araçatuba, SP. Tese [Mestrado em Ciência Animal] – Universidade Estadual Paulista; 2009.

- 127- Badaró R. Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rK39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. São Paulo. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo; 1996.
- 128- Streck AF, Gava D, Rech H, Canal CW. Técnicas de diagnóstico imunológico em suinocultura. *Acta Scientiae Veterinarie*. 2007. (35): 125-130.
- 129- Coelho WMD, Richini-Pereira VB, Langoni H, Brschiani KDS. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2011; (176): 281-282. Pubmed; PMID 21130575.
- 130- Rossi CN. Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba- São Paulo-Brasil. Jaboticabal. Tese [Mestrado] – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2007.
- 131- Da Costa Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexander B, Willians P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis relations hips between clinical status humoral immune response haematology and *Lutzomyia* (*Lutzmomyia*) *longipalpis* infectivity. *Vet J*. 2007; (174): 636-643.
- 132- Lappin RM. Doenças infecciosas. In: Nelson WR, Couto GC. *Medicine interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro. 2006; 3:1265-1266
- 133- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. parasitol.*. 2007; 145: 357-360. Pubmed; PMID 17174035.
- 134- Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo NF, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, Marques MS, Michalick M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by

Leishmania (Leishmania) infantum from a naturally infected cat of Brazil. Vet Parasitol .2010; (174):150-154.Pubmed; PMID 20832944.

ANEXOS

Anexo 1

(Autorização CEEA)

	<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA</p>		 Comissão de Ética em Experimentação Animal
			 Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99
<h1>Certificado</h1>			
<p>Certificamos que o (Protocolo CEEA 862-2011) <i>Avaliação diagnóstica e epidemiológica para doença de chagas e leishmaniose visceral em gatos domésticos (Felis catus domesticus) procedentes do município de Ilha Solteira -SP</i>, a ser conduzido por Maria Fernanda Alves, orientada pela Prof^a Dr^a Simone Baldini Luchies, Co-orientada pela Prof^a Dr^a Wilma Aparecida Starke Buzetti, com apoio técnico de Lúcio de Oliveira e Souza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "gatos" são provenientes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA), sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>			
<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 24/02/2011.</p>			
 Prof ^a Dr ^a Regina Helena Garcia Martins Presidente da CEEA		 Alberto Santos Capellupi Secretário da CEEA	
<small>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</small>			

Anexo 2

MEIO LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

Para o preparo de 250 mL de meio, em Kitassato estéril, acrescentou-se 2g de Na₂HPO₄, 1 g de NaCl e 0,1 g de KCl, acrescido de 44,5 mL de água milli-Q. Foi adaptado a este kitassato, um filtro de aço (Millipore®), com membrana de 22µm de poro (Millipore®). Esta solução contendo os sais diluídos foi autoclavada juntamente com o filtro a 121°C por 15 minutos, e nesse período, em um Erlenmayer de 250 mL, foram diluídos em 100 mL de água Milli-Q: 0,75 g de infusão de fígado (Difco™), 0,5 g de Dextrose (Oxoid®) e 1,25 g de Tryptose (Vetec®), com ajuste do pH a 7,4. Essa diluição foi filtrada no kitassato, acoplando-se ao mesmo uma bomba à vácuo. Após esta filtragem, em capela de fluxo laminar, foram acrescentados a esse meio 5,5 mL de hemoglobina bovina a 2,2% (BBL™), 30 mL de soro fetal bovino a 11% (Nutricell®) e 1 mL (20 mg) de gentamicina (Gentocin®). Foi realizado controle de esterilidade, por 48 horas em estufa a 37°C, utilizando meio BHI e após este período, o conteúdo final foi distribuído em tubos estéreis, mantidos em geladeira até o momento do uso.

Anexo 3:

Preparação das amostras para extração de DNA de acordo com Pinto (98)

As culturas positivas e, negativas foram lavadas três vezes em Solução Salina Tamponada estéril (SST – pH 7,4), centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sedimento armazenado em microtubos estéreis livres de DNAses e RNAses a -20°C, até o momento do uso para extração do DNA. A extração de DNA seguiu o protocolo do Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Spin Kit da GE Healthcare®.

Anexo 4

Protocolo de Extração de DNA para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* segundo protocolo do Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Spin Kit da GE Healthcare®.

As amostras em microtubos foram descongeladas sob refrigeração em gelo seco. Em seguida acrescentou-se em microtubos de 1,5 ml livres de DNAses e RNAses, 20µL de proteínase K e 300µL da amostra biológica, e foram homogeneizados em vortex por 10 segundos. A seguir, foi adicionado 400 µL de tampão de extração (Lysis buffer-“extraction solution”) para suspender as células brancas e novamente homogeneizou-se em vortex por 15 segundos. Em seguida, os tubos permaneceram em temperatura ambiente por dez minutos e foram transferidos para um tubo coletor acrescido de uma coluna do kit comercial empregado, onde o material foi centrifugado a 11000 rcf por 1 minuto. Logo após, descartou-se o sobrenadante do tubo coletor e acrescentou-se 500 µL de solução de lise a coluna. Em seguida, foi centrifugado a 11000 rcf por 1 minuto. Após desprezar o sobrenadante, voltou-se a coluna ao tubo coletor e acrescentou-se 500 µL de solução de lavagem à coluna e foi centrifugado a 11000 rcf por três minutos. O tubo coletor foi desprezado juntamente com o sobrenadante e a coluna colocada em microtubos de 1,5 mL livres de DNAses e RNAses, onde foi adicionado 100 µL de “elution buffer” previamente aquecido à 70°C, o qual permaneceu incubado por 1 minuto. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 11000 rcf por 1 minuto, obtendo-se a amostra de DNA, a qual será armazenada à -20°C para realização da PCR para *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*).

Anexo 5

Meio de Cultura NNN (Novy, McNeal, Nicolle)

Para o preparo de 150 mL de meio NNN, deve-se diluir 0,99 g de NaCl e 2,25 g de Ágar Base (Bacto Ágar) em um Erlenmeyer, com 150 mL de Água Milli-Q. Tampar com “boneca” de algodão hidrófobo, papel laminado e papel rosado. Após diluído, deve-se autoclavar esta solução, os tubos rosqueados para armazenar o meio NNN, e três pipetas de vidro, graduadas de 10 mL, a 121°C por 15 minutos. Após autoclavado, deve-se deixar a solução preparada em estufa, para que o material não endureça. Acrescentar 20mL de sangue bovino desfibrinado. Este frasco deve ser homogeneizado desde o momento que o animal foi puncionado. A homogeneização do frasco se deve ao fato da necessidade de se esgotar os fatores de coagulação. Colocar o frasco, as pipetas, a solução de sal e Ágar base e os tubos rosqueados de NNN na câmara de fluxo laminar e sob radiação de luz UV por 15 minutos, e, adicionar os 20 mL de sangue, com pipeta, no Erlenmeyer com o sal e Ágar base. Homogeneizar bem e proceder a distribuição do meio nos tubos de NNN. Deve-se adicionar 5 mL por tubo e deixá-los inclinados, para que formem um bixel até o final do tubo, permitindo assim, o perfeito crescimento das promastigotas em todo o tubo, não havendo desperdício de meio. O meio deve ser mantido em controle de esterilidade em estufa a 37°C por 48 horas. Após esse período, deve-se embrulhar os tubos em papel alumínio e papel rosado, e armazenados sob refrigeração até o momento do uso.

Anexo 6:

Técnica de Reação de Imunofluorescência (RIFI) segundo Camargo (102)

Utilizaram-se microplacas para a diluição inicial de 190 µL de solução salina tamponada (SST) 0,01 M com pH 7,2 e 10 µL do soro para uma diluição inicial (primeira diluição) de 1:20. Posteriormente, distribuiu-se 100 µL da primeira diluição em 100 µL de solução de PBS para obter-se uma diluição de 1:40 (segunda diluição), a qual foi utilizada para a triagem da reação. De mesma forma foram diluídos soros controles: positivos e negativos. Nas lâminas fixadas com o antígeno de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), distribuíram-se 10 µL de soro diluído (segunda diluição), incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Logo foram lavadas duas vezes com STS 0,01 M, pH 7,2 por 10 minutos, posteriormente foram secas em estufa. O conjugado espécie-específico (Anti gato IgG FITC, Sigma®, USA), foi diluído segundo título pré-estabelecido em solução de Azul de Evans a 20%, no qual foi previamente diluído em PBS 0,01 M y pH 7,2 na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10 µL do conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se novamente as lavagens por duas vezes com PBS 0,01 M pH 7,2 por 10 minutos e logo foram secas em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínulas de 24x60 mm, examinando-se em microscópio de Imunofluorescência na objetiva de 40. Depois da leitura dos controles, procedeu-se a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se positivos as amostras de soro com titulação igual 1:40. Os soros positivos na diluição 1:40 foram avaliados em diluições maiores (1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640), para determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em gatos.

Anexo 7:

Técnica de preparo dos antígenos brutos de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* para sensibilização das placas para o Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para a sensibilização da placa de ELISA para a realização do Ensaio Imunoenzimático, necessitou-se a produção dos antígenos brutos de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*

Para a obtenção de uma quantidade viável de promastigotas e epimastigotas para a sensibilização das placas do ELISA, foi necessário repicar 5 mL de cultura em LIT e NNN para um tubo de rosca contendo somente 40 mL de LIT. Procedeu-se dois repiques em LIT, com intervalo de sete dias para obtenção de maior concentração do agente (para maiores quantidades de promastigotas e epimastigotas) para o preparo dos antígenos para a sensibilização das placas de ELISA. Após a verificação do crescimento das promastigotas e epimastigotas em microscópio óptico, passou-se as culturas para um tubo de Falcon centrifugou-se 3000 rpm por 10 minutos; em seguida, desprezou-se o sobrenadante e foi acrescentado de 30 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2 (SST), e centrifugou-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se em seguida o sobrenadante. O processo foi repetido por mais duas vezes, e ao final as amostras foram tratadas com inibidor de protease (Fenilmetil Sufonil Fluorido – PMSF) a 1 mM diluído em metanol. A outra etapa do processo consistiu em submeter o extrato antogênico à lise por ultrassom de acordo com o seguinte ciclo: 50% a 4°C por 30 segundos (seis repetições). O método de quantificação proteica foi de acordo com Smith et al. (103).

Anexo 8

Técnica de ELISA indireto para *Leishmania* spp. segundo Lima et. al.(104).

Para o teste ELISA, em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *Leishmania infantum* na concentração 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão SST 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com SST-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com SST-T, para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados 100 µL por poço, em duplicata, das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos a serem testados na diluição 1:400 em SST-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com SST-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG total de gato ligado à peroxidase na diluição 1:40000 em PBS-T, foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm.

Anexo 9:

Técnica de ELISA indireto rK39 para *Leishmania* spp. segundo Lima et. al.

(104) com modificações.

Para o teste ELISA com antígeno rK39, em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 50µL do antígeno recombinante de *Leishmania infantum* na concentração de 25 ng/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa “overnight” em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão SST 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com SST-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por uma hora. Após quatro lavagens com SST-T, para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados 100 µL por poço, em duplicata, das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos a serem testados na diluição 1:50 em SST-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com SST-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG total de gato ligado à peroxidase na diluição 1:40000 em PBS-T, foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 50 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm

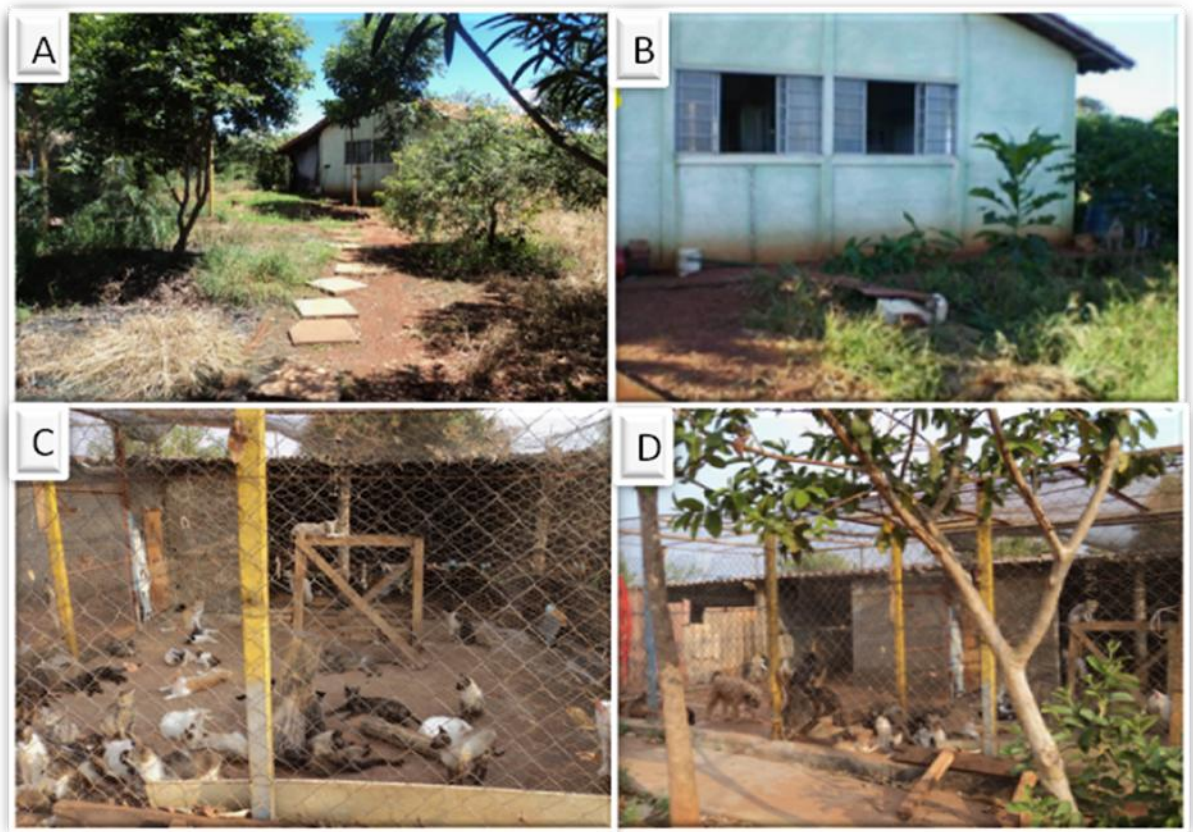
Anexo 10

ELISA indireto para *Trypanosoma cruzi*, segundo Lima et. al.(104) com modificações

Para o teste ELISA, em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *Trypanosoma cruzi* na concentração 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (SST-T). As placas foram bloqueadas com SST-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após três lavagens com SST-T, para a retirada da solução de bloqueio, foram adicionados 100 µL por poço, em duplicata, das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos a serem testados na diluição 1:200 em PBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com SST-T. Em seguida, 100 µL do conjugado anti-IgG total de gato ligado à peroxidase na diluição 1:40000 em SST-T, foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm

APÊNDICES

Apêndice 1:



Apêndice 1: Vista frontal da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA) (A), localizada na área rural da cidade de Ilha Solteira – SP, a casa sede (B), baia dos gatos (C) e proximidade dos gatos com os cães (D).

Apêndice 2



Apêndice 2: Contenção física (A) e química (B) dos felinos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA).

Apêndice 3



Apêndice 3: Observação dos aspectos clínicos (A); marcação feita em pavilhão auricular (B); condicionamento do animal durante a recuperação da anestesia (C) e soltura na baia (D).

Apêndice 4: Sinais clínicos observados em 30 dos 55 gatos estudados, procedentes da APAISA.

Gatos		Sinais Clínicos			
Identificação	Alopecia	Emagrecimento	Lesões (corpo)	Lesões (orelha)	Lesões (focinho)
2	-	-	-	+	-
3	+	-	+	-	-
5	-	-	-	+	-
6	-	+	-	-	-
7	+	-	+	+	-
10	-	+	+	-	-
11	+	-	+	-	-
18	-	-	+	-	-
24	-	-	-	-	+
26	+	-	-	+	-
27	-	+	-	-	-
28	-	+	-	-	-
30	-	-	-	+	-
31	-	+	-	-	-
32	+	-	+	-	-
34	-	-	+	-	-
37	+	+	-	-	-
39	+	-	-	-	-
43	-	-	-	+	-
44	+	-	+	+	-
45	+	+	-	-	-
46	+	-	-	+	-
47	+	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-
49	+	+	-	-	-
51	+	-	+	+	-
52	+	+	-	-	-
53	-	+	+	-	-
54	-	+	+	-	+
55	-	+	-	-	-

Apêndice 5: – Resultados da hemocultura e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* em 55 gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais – Ilha Solteira, 2013.

Gato	RIFI			Gato	RIFI (<i>Leishmania infantum</i>)		
	Hemocultura	(<i>Leishmania infantum</i>)	RIFI (<i>T.cruzi</i>)		Hemocultura	(<i>Leishmania infantum</i>)	RIFI (<i>T.cruzi</i>)
1	Negativo	80	Não reagente	29	Negativo	Não reagente	40
2	Negativo	160	Não reagente	30	Negativo	80	20
3	Negativo	80	40	31	Negativo	80	Não reagente
4	Negativo	80	40	32	Negativo	320	Não reagente
5	Negativo	160	40	33	Negativo	80	Não reagente
6	Negativo	160	40	34	Negativo	80	Não reagente
7	Positivo	80	20	35	Negativo	80	Não reagente
8	Negativo	NR*	NR*	36	Negativo	40	40
9	Negativo	Não reagente	20	37	Negativo	Não reagente	Não reagente
10	Negativo	40	Não reagente	38	Negativo	40	40
11	Negativo	160	Não reagente	39	Negativo	Não reagente	20
12	Negativo	Não reagente	20	40	Negativo	40	40
13	Negativo	Não reagente	40	41	Negativo	80	20
14	Negativo	160	20	42	Negativo	Não reagente	20
15	Negativo	Não reagente	Não reagente	43	Negativo	Não reagente	Não reagente
16	Negativo	Não reagente	Não reagente	44	Negativo	80	Não reagente
17	Negativo	Não reagente	Não reagente	45	Negativo	Não reagente	20
18	Negativo	Não reagente	20	46	Negativo	Não reagente	Não reagente
19	Negativo	NR*	NR*	47	Positivo	80	40
20	Negativo	80	40	48	Positivo	Não reagente	Não reagente
21	Negativo	Não reagente	Não reagente	49	Positivo	Não reagente	Não reagente
22	Negativo	160	20	50	Positivo	80	Não reagente
23	Negativo	NR*	NR*	51	Positivo	80	40
24	Negativo	Não reagente	Não reagente	52	Positivo	80	Não reagente
25	Negativo	NR*	NR*	53	Positivo	80	40
26	Negativo	160	20	54	Positivo	80	Não reagente
27	Negativo	Não reagente	20	55	Negativo	40	40
28	Negativo	160	20				

NR: Não realizado

Apêndice 6: Valores dos Níveis ELISA (NE) em relação aos valores de absorbância na reação de ELISA indireto para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*).

Tabela 3: Níveis de ELISA em relação aos valores de absorbância.

Níveis de ELISA (NE)	Valor de Absorbância (D.O.)
0	0 - 0,093
1	0,094- 0,1255
2	0,1254 - 0,169
3	0,170 - 0,228
4	0,229 - 0,308
5	0,309 - 0,417
6	0,418 - 0,562
7	0,563 - 0,760
8	0,761 - 1,02
9	$\geq 0,103$

D.O: Densidade Óptica

Apêndice 7: ELISA indireto com antígenos brutos de *Leishmania infantum* realizado com soros dos gatos da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira.

Gato	D.O.	A/P	N.E	Gato	D.O.	A/P	N.E
1	0,0880	0,0757	0	29	0,1160	0,1567	2
2	0,0680	0,0178	0	30	0,1860	0,3592	5
3	0,3290	0,7729	7	31	0,0890	0,0786	0
4	0,3420	0,8105	7	32	0,2750	0,6167	7
5	0,1750	0,3274	5	33	0,2410	0,5183	6
6	0,1970	0,3910	5	34	0,1500	0,2551	4
7	0,1670	0,3042	4	35	0,2160	0,4460	6
8	N.R	N.R		36	0,2180	0,4518	6
9	0,1950	0,3852	5	37	0,0630	0,0034	0
10	0,4210	1,0391	9	38	0,412	1,0130	8
11	0,1450	0,2406	4	39	0,128	0,1914	3
12	0,0630	0,0034	0	40	0,158	0,2782	4
13	0,1620	0,2898	4	41	0,179	0,3390	5
14	0,1370	0,2175	3	42	0,255	0,5588	6
15	0,1140	0,1509	2	43	0,187	0,3621	5
16	0,0830	0,0612	0	44	0,13	0,1972	3
17	0,1570	0,2753	3	45	0,163	0,2927	4
18	0,1080	0,1336	2	46	0,043	-0,0545	0
19	N.R	N.R		47	0,314	0,7295	7
20	0,1960	0,3881	5	48	0,06	-0,0053	0
21	0,2290	0,4836	6	49	0,103	0,1191	3
22	0,2710	0,6051	7	50	0,08	0,0526	0
23	N.R	N.R		51	0,134	0,2088	3
24	0,0770	0,0439	0	52	0,1945	0,3838	4
25	N.R	N.R		53	0,1375	0,2189	3
26	0,1870	0,3621	5	54	0,111	0,1422	2
27	0,1170	0,1596	2	55	0,289	0,6572	7
28	0,3900	0,8085	8				

NR: Não Realizado

Anexo 8: Níveis ELISA (NE) em relação aos valores de absorvância na reação de ELISA indireto com rK39 para *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*).

Tabela 5: Níveis de ELISA em relação aos valores de absorvância.

Níveis de ELISA (NE)	Valor de Absorvância (D.O.)
0	0 - 0,271
1	0,272- 0,366
2	0,367 - 0,494
3	0,495 - 0,668
4	0,669 - 0,901
5	0,902 - 1,216
6	1,217 - 1,643
7	1,644 - 2,218
8	2,219 - 2,993
9	2,994 - 4,042

D.O.: Densidade Óptica

Apêndice 9: Resultados do teste **sorológico ELISA** indireto com antígenos recombinante rK39 de *Leishmania infantum* realizado com soros dos gatos da Associação Protetora dos Animais.

Gato	D.O.	A/P	N.E	Gato	D.O.	A/P	N.E
1	0,4490	0,2363	0	29	0,8640	0,6967	4
2	0,4580	0,2463	0	30	0,9040	0,7411	4
3	0,4530	0,2408	0	31	0,2790	0,0477	0
4	0,2160	-0,0222	0	32	0,6930	0,5070	3
5	0,5520	0,3506	1	33	0,3080	0,0799	0
6	0,5210	0,3162	1	34	0,4170	0,2008	0
7	0,5740	0,3750	2	35	0,5360	0,3328	1
8	NR	NR	NR	36	0,3370	0,1121	0
9	0,6970	0,5115	3	37	0,4630	0,2518	0
10	0,4010	0,1831	0	38	0,95	0,7922	4
11	0,2900	0,0599	0	39	0,385	0,1653	0
12	0,3070	0,0788	0	40	0,598	0,4016	2
13	0,3320	0,1065	0	41	0,413	0,1964	0
14	0,4670	0,2563	0	42	0,75	0,5703	3
15	0,3920	0,1731	0	43	1,458	1,3558	6
16	0,5920	0,3950	2	44	0,288	0,0577	0
17	0,7860	0,6102	3	45	0,305	0,0766	0
18	0,4710	0,2607	0	46	0,251	0,0166	0
19	NR	NR	NR	47	0,523	0,3184	1
20	0,7640	0,5858	3	48	0,608	0,4127	2
21	0,5230	0,3184	1	49	0,24	0,0044	0
22	0,9400	0,7811	4	50	0,72	0,5370	3
23	NR	NR	NR	51	0,559	0,3584	1
24	0,2540	0,0200	0	52	0,422	0,2064	0
25	NR	NR	NR	53	0,576	0,3772	2
26	0,3490	0,1254	0	54	0,36	0,1376	0
27	0,2770	0,0455	0	55	0,616	0,4216	2
28	0,6440	0,3644	1				

NR: Não Realizado

Apêndice 10: ELISA (NE) em relação aos valores de absorbância na reação de ELISA indireto para *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 6: Níveis de ELISA em relação aos valores de absorbância.

Níveis de ELISA (NE)	Valor de Absorbância (D.O.)
0	0 - 0,423
1	0,424 - 0,572
2	0,573 - 0,771
3	0,772 - 1,041
4	1,042 - 1,406
5	1,407 - 1,898
6	1,899 - 2,563
7	2,564 - 3,460
8	3,461 - 4,671
9	$\geq 4,672$

D.O: Densidade Óptica

Apêndice 11: ELISA indireto com antígeno bruto de *T.cruzi* realizado com soros dos gatos da Associação Protetora de Animais de Ilha Solteira.

Gato	D.O.	A/P	N.E	Gato	D.O.	A/P	N.E
1	0,5600	0,4012	0	29	0,5950	0,4458	1
2	0,4350	0,2421	0	30	0,8880	0,8188	3
3	1,0580	1,0352	4	31	0,4530	0,2650	0
4	0,7360	0,6253	2	32	0,6290	0,4891	1
5	0,7480	0,6406	2	33	0,7300	0,6177	2
6	0,8150	0,7259	3	34	0,7310	0,6189	2
7	0,9420	0,8875	3	35	1,0000	0,9614	3
8	N.R	N.R		36	0,7020	0,5820	2
9	0,8710	0,7972	3	37	0,5240	0,3554	0
10	0,9830	0,9397	3	38	0,724	0,6100	2
11	0,5080	0,3350	0	39	0,711	0,5935	2
12	0,6380	0,5005	1	40	0,55	0,3885	0
13	0,7420	0,6329	2	41	0,989	0,9474	3
14	0,6410	0,5043	1	42	0,724	0,6100	2
15	0,4100	0,2103	0	43	0,738	0,6278	2
16	0,6090	0,4636	1	44	0,809	0,7182	3
17	0,5710	0,4152	1	45	0,523	0,3541	0
18	0,4150	0,2166	0	46	0,145	-0,1271	0
19	N.R	N.R		47	0,445	0,2548	0
20	0,9410	0,8863	3	48	0,167	-0,0991	0
21	0,8580	0,7806	3	49	0,173	-0,0914	0
22	1,0030	0,9652	3	50	0,304	0,0753	0
23	N.R	N.R		51	0,511	0,3388	0
24	0,4380	0,2459	0	52	0,312	0,0855	0
25	N.R	N.R		53	0,361	0,1479	0
26	0,7700	0,6686	2	54	0,368	0,1568	0
27	0,3280	0,1059	0	55	0,519	0,3490	0
28	0,8460	0,6389	2				

NR: Não Realizado/ D.O: Densidade Óptica/ N.E: Níveis ELISA

Apêndice 12: Comparação dos resultados da avaliação clínica com os teste sorológicos de RIFI e ELISA , hemocultura e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. em amostras procedentes de gato da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA). Botucatu, SP, 2013.

Resultados dos Exames clínicos e diagnósticos para <i>Leishmania</i> spp.						
Gato	Parasitológico			Sorológicos		Molecular
	Aspectos Clínicos	Hemocultura	RIFI	ELISA	ELISA	PCR
				(bruto)	rk39	
2	L.o	N	160	0	0	N
3	A./L.c	N	80	7	0	N
5	L.o	N	160	5	1	N
6	E	N	160	5	1	N
7	A./Lc./L.o	P	80	4	2	N
10	E./L.c	N	40	9	0	N
11	A./L.c	N	160	4	0	N
18	L.c	N	N.R	2	0	N
24	L.f	N	N.R	0	0	N
26	A./L.o	N	160	5	0	N
27	E.	N	N.R	2	0	N
28	E.	N	160	8	1	N
30	L.o	N	80	5	4	N
31	E.	N	80	0	0	N
32	A./Lc	N	320	7	3	N
34	L.c	N	80	4	0	N
37	A./E.	N	N.R	0	0	N
39	A.	N	N.R	3	0	N
43	L.o	N	N.R	5	6	N
44	A./L.c/L.o	N	80	3	0	N
45	A./E.	N	N.R	4	0	N
46	A./L.o	N	N.R	N.R	0	N
47	A.	P	80	80	1	P
48	A./E.	P	N.R	N.R	2	P
49	A./E.	P	N.R	N.R	0	P
51	A./L.c/L.o	P	80	80	1	N
52	A./E.	P	80	80	0	N
53	E./L.c	P	80	80	2	N
54	E./L.c/L.f	P	80	80	0	N
55	E.	N	40	40	2	N

A: Alopecia; E: Emagrecimento; L.c: Lesões no corpo; L.o: Lesões na orelha; L.f: Lesões no focinho; P: Positivo; N: Negativo; N.E: Nível Elisa; Ponto de corte RIFI: 40; Ponto de corte ELISA (bruto)=2; Ponto de corte ELISA rK39=3; N.R:Não Realizado

Apêndice 13: Comparação de resultados de titulação à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* em nove gatos positivos à hemocultura em meio Liver Infusion Tryptose (LIT), procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira, SP.

Gato	RIFI (<i>Leishmania</i> spp.)	RIFI (<i>T.cruzi</i>)	Hemocultura
	Título	Título	
Gato 7	80	20	Positiva
Gato 47	80	40	Positiva
Gato 48	Não reagente	Não reagente	Positiva
Gato 49	Não reagente	Não reagente	Positiva
Gato 50	80	Não reagente	Positiva
Gato 51	80	40	Positiva
Gato 52	80	Não reagente	Positiva
Gato 53	80	40	Positiva
Gato 54	40	Não reagente	Positiva

Apêndice 14– Apresentação dos resultados de ELISA indireto e da prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* em amostras de gatos procedentes da Associação protetora dos Animais de Ilha Solteira.

Gato	ELISA indireto	RIFI	Gato	ELISA indireto	RIFI
1	N	80	29	P	Não reagente
2	N	160	30	P	80
3	P	80	31	N	80
4	P	80	32	P	320
5	P	160	33	P	80
6	P	160	34	P	80
7	P	80	35	P	80
8	NR*	NR*	36	P	40
9	P	Não reagente	37	N	Não reagente
10	P	40	38	P	40
11	P	160	39	P	Não reagente
12	N	Não reagente	40	P	40
13	P	Não reagente	41	P	80
14	P	160	42	P	Não reagente
15	N	Não reagente	43	P	Não reagente
16	N	Não reagente	44	P	80
17	P	Não reagente	45	P	Não reagente
18	N	Não reagente	46	N	Não reagente
19	NR*	NR*	47	P	80
20	P	80	48	N	Não reagente
21	P	Não reagente	49	N	Não reagente
22	P	160	50	N	80
23	NR*	NR*	51	P	80
24	N	Não reagente	52	P	80
25	NR*	NR	53	P	80
26	P	160	54	N	80
27	P	Não reagente	55	P	40
28		160			
	P				

NR: Não Realizado

Apêndice 15– Apresentação dos resultados de ELISA indireto e da prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Trypanosoma cruzi*, em amostras de gatos procedentes da Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira.

Gato	ELISA indireto	RIFI	Gato	ELISA indireto	RIFI
1	N	Não reagente	29	N	40
2	N	Não reagente	30	P	20
3	P	40	31	N	Não reagente
4	P	40	32	N	Não reagente
5	P	40	33	P	Não reagente
6	P	40	34	P	Não reagente
7	P	20	35	P	Não reagente
8	NR*	NR*	36	N	40
9	P	20	37	N	Não reagente
10	P	Não reagente	38	N	40
11	N	Não reagente	39	N	20
12	N	20	40	N	40
13	P	40	41	P	20
14	N	20	42	N	20
15	N	Não reagente	43	P	Não reagente
16	N	Não reagente	44	P	Não reagente
17	N	Não reagente	45	N	20
18	N	20	46	N	Não reagente
19	NR*	NR*	47	N	40
20	P	40	48	N	Não reagente
21	P	Não reagente	49	N	Não reagente
22	P	20	50	N	Não reagente
23	NR*	NR*	51	N	40
24	N	Não reagente	52	N	Não reagente
25	NR*	NR*	53	N	40
26	P	20	54	N	Não reagente
27	N	20	55	N	40
28	P	20			

NR: Não Realizado

