

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

**INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM GATOS COM
DERMATOPATIAS PROVENIENTES DE ÁREA
ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Juliana Peloi Vides
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2010

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

**INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM GATOS COM
DERMATOPATIAS PROVENIENTES DE ÁREA
ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Juliana Peloi Vides

Orientadora: Prof. Adjunto Mary Marcondes

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

Araçatuba – SP
2010

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V652i Vides, Juliana Peloi.
Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos com dermatopatias provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral / Juliana Peloi Vides. – Araçatuba : [s.n.], 2010
72 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

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

1. ELISA 2. Histopatologia 3. Imunoistoquímica 4. Leishmaniose felina

CDD 636.0896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PELOI VIDES - nascida em 12 de maio de 1985 na cidade de São Paulo – SP. Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista – Unesp, campus de Araçatuba – SP no ano de 2007. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia, Unesp, campus de Araçatuba – SP, em março de 2008, sob orientação da Professora Adjunto Mary Marcondes.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Cristina Peli e Waldomiro Vides, que desde o início me apoiaram e incentivaram a realização deste sonho. Muito obrigada pela confiança, pelo orgulho, pelas orações e pelo amor que sempre estiveram presentes.

Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Mary Marcondes, por toda dedicação, paciência e incentivo durante todas as etapas deste projeto. Muito obrigada por me acolher e aguentar todas as minhas loucuras. Obrigada também por todos os conselhos profissionais e pessoais, por todo o seu carinho e amizade. Você é meu grande exemplo profissional. Te admiro demais!

Muito Obrigada por TUDO

AGRADECIMENTOS

Após tanto trabalho e dedicação não poderia ser diferente a lista de agradecimentos. É muito bom dizer **obrigada** a tantas pessoas que, neste período em que se é acometido de tantos surtos de alegrias, cansaço, incerteza e incapacidade, se mostraram sempre presentes, com participação ímpar no desenvolvimento do projeto.

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por estar sempre ao meu lado, me oferecendo boas oportunidades, pessoas especiais e muito amor.

À meus pais, Waldomiro Vides e Maria Cristina Peloi, por todo apoio, dedicação, amor e incentivo durante toda essa jornada de aprendizado. Vocês são o meu exemplo de vida.

À meu irmão Thiago Peloi Vides, sempre incentivador, amigo e presente, mesmo de tão longe, em todas as etapas de minha vida. E também à minha cunhadinha Adriana por tantos conselhos valiosos e oportunos.

Ao meu namorado Lucas Matos, pelo amor, cumplicidade, confiança, amizade e por me suportar até quando nem mesmo eu conseguia.

À minha mais que amiga Tatianna Schwardt, que participou de todas as etapas deste projeto. Obrigada pelas “visitas intermináveis a Dona Lourdes”, pelas palavras amigas, pelos bons momentos vividos, por tantas risadas, por tanta dedicação e por ser minha amiga. Ah! E também por fazer parte do “trio”.... não poderia deixar de citar a Lili aqui né?!?

As minhas amigas Livia Castanhas, Tatianna Schwardt e Emiliana Oliveira, por estarem sempre ao meu lado, por me aguentarem, por todos os “conselhos

gatis” vividos, pela cumplicidade, pelas fofocas e principalmente, por toda sinceridade, amor e respeito que existe entre nós.

Às amigas Verônica Albuquerque, Ludmila Sobrinho e Eveline Tozzi por todo o carinho e auxílio na concretização deste trabalho.

Aos amigos Gabriel, Talita, Acácio, Caio, Silmara, Carol Vivan, “Tenesmo”, João, “Fracasso” e “Schwas” que sempre estiveram ao meu lado, me confortando com suas palavras e me incentivando.

À professora Márcia Marinho e a auxiliar de laboratório Cilene pelo acolhimento, aprendizado e apoio durante o tempo em que estive no Laboratório de Microbiologia.

À professora Márcia Dalastra e à auxiliar de laboratório Thayse pela excelente recepção, por toda a orientação, paciência e dedicação na realização das etapas deste trabalho no Laboratório de Moléstias Infecciosas (LIM-50).

Aos Professores Wagner Ferreira, Alexandre Andrade, Flávia Rezende e Valéria Oliva pelo apoio profissional e pessoal e, pelo bom exemplo de dedicação à profissão escolhida.

À Professora Cecília por toda orientação no processamento do material para o exame histopatológico, sempre com muita paciência e dedicação, e também por todos os conselhos pessoais.

As professoras Cárís Nunes e Gisele Machado por, no momento da minha qualificação, serem atenciosas e contribuírem para a melhoria do projeto.

À professora Sílvia Venturolli, pela colaboração na realização da análise estatística.

Aos funcionários da Biblioteca do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, pelo auxílio na elaboração das referências bibliográficas.

À todos os proprietários dos animais do estudo, que abriram as portas de suas residências e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Aos meus queridos e mais que amados filhos, “Maylow”, “Cocada”, “Piter” e “Lola”, que por muitas vezes não dei a atenção merecida a eles para que este projeto fosse realizado, mas que mesmo assim, sempre me encontram com a maior felicidade e amor do mundo.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – campus de Araçatuba, pelo “acolhimento” e por todo o aprendizado durante os dois últimos anos.

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

E por último e mais importante, a todos os gatos que participaram do projeto.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.”

(Chico Xavier)

**INFECÇÃO POR *LEISHMANIA CHAGASI* EM GATOS COM
DERMATOPATIAS PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

RESUMO - A leishmaniose felina foi descrita pela primeira vez por Sergent e colaboradores em 1912 e, desde então, vários relatos de casos clínicos encontram-se dispostos na bibliografia mundial. O objetivo do presente estudo foi pesquisar a infecção por *Leishmania chagasi* em 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba, São Paulo, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. A avaliação desses animais foi realizada por meio de exame parasitológico direto de órgãos linfóides; exame histopatológico e reação de imunoistoquímica para pesquisa de formas amastigotas do parasito em pele hígida e lesionada; ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e a reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*; além da pesquisa de coinfeções por vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina e ainda, nas lesões cutâneas, a pesquisa de ácaros, fungos e bactérias coexistentes. Dos 55 gatos avaliados, foram identificados 27 animais com leishmaniose visceral. Destes, 12 (44,4%) foram positivos nos exames parasitológicos de órgãos linfóides e da pele, 11 (40,7%) por sorologia e quatro (14,8%) por ambos os métodos. O exame histopatológico evidenciou a presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* no interior de macrófagos da derme em apenas um dos gatos e, a reação de imunoistoquímica identificou o parasito em nove animais, incluindo aquele positivo na histopatologia de pele. Do total de animais positivos para leishmaniose visceral foi possível identificar a presença de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina em cinco (18,5%). Ainda nesses animais, observou-se o crescimento de colônias de *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. Levando-se em consideração a elevada ocorrência de *Leishmania chagasi* em gatos com lesões cutâneas do

presente estudo deve-se incluir a leishmaniose visceral no diagnóstico diferencial das dermatopatias de felinos provenientes de áreas endêmicas para a doença

Palavras-chave: ELISA, histopatologia, imunohistoquímica, leishmaniose felina

**INFECTION BY *LEISHMANIA CHAGASI* IN CATS WITH SKIN DISEASES
FROM AN ENDEMIC AREA FOR VISCERAL LEISHMANIASIS**

ABSTRACT - Feline leishmaniasis was first described by Sergent et al. in 1912 and since then several reports of clinical cases were reported worldwide . The aim of this study was to investigate the infection by *Leishmania chagasi* in 55 cats with skin diseases from the municipality of Araçatuba, São Paulo, Brazil, an endemic area for visceral leishmaniasis. The evaluation of these animals consisted in direct parasitological examination of lymphoid organs, histopathological and immunohistochemical reaction for detection of amastigotes in healthy and lesioned skin and serology for visceral leishmaniasis by immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence. We also searched for possible co-infections with feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV), and for the presence of mites, fungi or bacteria in skin lesions. From the 55 cats studied, we identified 27 animals with visceral leishmaniasis. Of these, 12 (44.4%) were positive in parasitological evaluation of lymphoid organs and skin, 11 (40.7%) by serology and four (14.8%) by both methods. Amastigote forms of *Leishmania chagasi* were evidenced, by histopathology, within macrophages in the dermis of only one cat. Immunohistochemical reaction identified the parasite in nine animals, including the one positive by histopathological examination. In five cats infected by *Leishmania chagasi* we identified the presence of antibodies against feline immunodeficiency virus (FIV). We also observed *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Pseudomonas* spp. in one animal. Based on the evidence of the high occurrence of *Leishmania chagasi* infection in cats with skin lesions of this study, one must include visceral leishmaniasis in the differential diagnosis of skin diseases in cats from endemic areas.

Keywords: ELISA, histopathology, immunohistochemistry, feline leishmaniasis

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO.....	19
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	21
OBJETIVOS.....	28
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Delineamento Experimental.....	29
3.3 Colheita de sangue total.....	30
3.4 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i>	30
3.5 Pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina e de antígenos do vírus da leucemia felina.....	32
3.6 Pesquisa de formas amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> em exame citológico de órgãos linfóides.....	32
3.7 Exame parasitológico de raspado cutâneo.....	33
3.8 Cultivo microbiano das áreas com lesões cutâneas.....	33
3.9 Biopsia cutânea.....	34
3.10 Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> sp. pela reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real.....	36
3.11 Análise Estatística.....	36
4.RESULTADOS.....	37
4.1 Animais.....	37
4.2 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> pelo métodos de Ensaio imunoenzimático indireto e reação de imuno- fluorescência indireta.....	43
4.3 Detecção de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV).....	45
4.4 Detecção de formas amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> por meio de exame parasitológico de órgãos linfóides.....	45
4.5 Exame histopatológico de lesões cutâneas e pesquisa de <i>Leishmania chagasi</i> por reação de imunoistoquímica.....	47

4.6 Exame parasitológico de raspado cutâneo.....	54
4.7 Cultivo microbiano das áreas com lesões cutâneas.....	54
5.DISSCUSSÃO.....	60
6.CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES	

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1.** Resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por meio das técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e, do exame parasitológico direto de órgãos linfóides e imunoistoquímica de pele, em número absoluto e percentagem, de 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)..... 44
- Tabela 2.** Resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por meio das técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba – SP, 2010)..... 45
- Tabela 3.** Resultados da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* em exame citológico obtido por meio de punção biopsia aspirativa (PBA) de medula óssea, linfonodo, baço e fígado, em número absoluto e percentagem, de 10 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010).... 47
- Tabela 4.** Resultados do exame parasitológico direto de órgãos linfóides (linfonodos poplíteos – LP, medula óssea – MO, baço – B e fígado - F), exame histopatológico corado por hematoxilina e eosina (HE) e imunoistoquímica (IHQ) de lesões cutâneas, sorologia por ELISA indireto e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral e pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) em 27 gatos com dermatopatias acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)..... 53

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Lesões cutâneas de gatos naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i>. Rarefação pilosa em face lateral do pavilhão auricular esquerdo com eritema e deposição de crostas melicéricas (a); mesmo animal apresentando, após 60 dias, ulceração profunda em ponta de orelha esquerda com deposição de crostas hemorrágicas e melicéricas (b); alopecia com sangramento ativo e deposição de crostas hemorrágicas em base de pavilhão auricular direito (c); mesmo animal, demonstrando que as lesões são bilaterais e simétricas (Araçatuba-SP, 2010).....</p>	38
<p>Figura 2. Lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por <i>Leishmania chagasi</i>. Presença de hiperqueratose e rarefação pilosa em região de cabeça (a); o mesmo animal apresentando áreas de alopecia, hiperqueratose, lignificação e descamação furfurácea ao longo do dorso (b); área de alopecia com solução de continuidade apresentando eritema, exsudação e deposição de crostas melicéricas em região de flanco esquerdo (c); mesmo animal apresentando área de alopecia com feridas perfurantes em região cervical ventral e, presença de comedos em região mentoniana (d) (Araçatuba-SP, 2010).....</p>	39
<p>Figura 3. Lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por <i>Leishmania chagasi</i>. Caquexia, estupor, áreas alopécicas eritematosas em face lateral de membros torácicos (a); Área alopécica, eritematosa, circular de aproximadamente um centímetro de diâmetro (b); Área de alopecia com eritema e exsudação em região cervical (c); Rarefação pilosa com deposição de crostas melicéricas em face lateral de pavilhão auricular esquerdo e, presença de úlcera profunda em ponta de orelha direita com alopecia e deposição de crostas melicéricas e hemorrágicas (d) (Araçatuba-SP, 2010).....</p>	40

- Figura 4.** Distribuição, em porcentagem, segundo as alterações dermatológicas de 27 gatos acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)..... 41
- Figura 5.** Distribuição, em porcentagem, segundo a topografia lesional de 27 gatos acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)..... 42
- Figura 6.** Distribuição, em porcentagem, segundo as alterações sistêmicas, de 19 gatos com dermatopatias acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)..... 43
- Figura 7.** Fotomicrografia de punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo de gatos com dermatopatias provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral. Notar a presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*; 100x (Araçatuba-SP, 2010)..... 46
- Figura 8.** Fotomicrografia de lesão cutânea localizada na extremidade do pavilhão auricular de um gato naturalmente acometido por leishmaniose visceral. Verificar a presença de um infiltrado inflamatório perivascular à intersticial composto por macrófagos e plasmócitos. HE 40x (Araçatuba-SP, 2010)..... 48
- Figura 9.** Fotomicrografia de lesão cutânea localizada na extremidade do pavilhão auricular de um gato naturalmente acometido por leishmaniose visceral. Verificar presença de estruturas parasitárias no interior de macrófagos. HE 100x (Araçatuba-SP, 2010)..... 49

- Figura 10.** Fotomicrografia de lesão cutânea localizada na extremidade de pavilhão auricular de um gato acometido por leishmaniose visceral. Verificar presença de formas amastigotas do parasito na reação de imunoistoquímica. 40x (Araçatuba-SP, 2010)..... 50
- Figura 11.** Distribuição, em porcentagem, segundo a localização, de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*, por meio da reação de imunoistoquímica, de nove gatos com dermatopatias do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)..... 51
- Figura 12.** Fotomicrografia de raspado cutâneo de um gato acometido por leishmaniose visceral. Verificar a presença de ácaro da espécie *Notoedres cati*. KOH 10%, 10x (Araçatuba-SP, 2010)..... 54
- Figura 13.** Cultivo bacteriano, em Ágar Sangue, de amostras de áreas com lesões cutâneas de gatos. Verificar a presença de crescimento puro e exuberante de colônias de *Staphylococcus* spp. β -hemolíticos. (Araçatuba-SP, 2010)..... 55
- Figura 14.** Cultivo bacteriano, em Ágar Sangue, de amostra de área com lesão cutânea de um gato. Verificar a presença de numerosas colônias de *Actinomyces* spp. (Araçatuba-SP, 2010)..... 55
- Figura 15.** Resultados do crescimento de colônias bacterianas, em Ágar Sangue, de amostras de lesões cutâneas de 27 gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)..... 56

- Figura 16.** Crescimento de *Trichophyton* spp. em Ágar Sabouraud Dextrose 4% (a); crescimento de colônia de *Microsporium canis* no meio de Ágar Mycosel (b e c). Amostras obtidas de lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)..... 57
- Figura 17.** Crescimento de colônias de *Aspergillus* spp. em Ágar Sabouraud Dextrose 4%. Amostras obtidas de lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)..... 57
- Figura 18.** Crescimento de colônia de *Candida* spp. em Ágar Mycosel. Amostra obtida de lesão cutânea de gato naturalmente acometido por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)..... 58
- Figura 19.** Resultados do crescimento de colônias fúngicas, em Ágar Mycosel e Sabouraud dextrose a 4%, de amostras de lesões cutâneas de 27 gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)..... 58

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose também conhecida como Calazar, é uma antroponose, causada por um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*, que, de acordo com a espécie, pode apresentar manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais. Estes protozoários foram descritos pela primeira vez por Ross, em 1903, e são englobados em dois grandes grupos de leishmanias, o grupo que causa a leishmaniose tegumentar e os agentes etiológicos da leishmaniose visceral. A forma visceral pertence ao Complexo *Leishmania donovani* que tem como espécies a *Leishmania donovani*, encontrada na Ásia e África, a *Leishmania infantum* na Ásia, África e Europa e a *Leishmania chagasi* nas Américas.

As leishmanioses são consideradas importantes pelo impacto que produzem na saúde pública devido à alta incidência de casos humanos e, pela letalidade que vem aumentando em muitas áreas endêmicas, constituindo-se em sério problema sanitário. A leishmaniose visceral é uma doença endêmica nos cinco continentes, com aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas em 88 países sendo que, a cada ano, entre um milhão e meio e dois milhões de novos casos estão sendo notificados.

No Brasil, encontra-se disseminada em 23 Estados da Federação, sendo a região nordeste considerada a principal zona endêmica da leishmaniose visceral nas Américas. Inicialmente sua ocorrência era limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, porém, atualmente, encontra-se em franca expansão para grandes centros. No início da década de 80 ocorreu um surto epidêmico em Teresina (PI) e, desde então, já foram identificados casos humanos autóctones em São Luís (MA), Fortaleza (CE), Natal (RN), Aracaju (SE), Belo Horizonte (MG), Santarém (PA), Corumbá (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO) e Araçatuba (SP).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico da doença, devido à alta susceptibilidade da espécie à infecção, ao elevado grau de parasitismo cutâneo desses animais e à sua estreita relação com o homem. Por este motivo, uma das medidas de controle da doença implementada pelo Ministério da Saúde do Brasil é a eutanásia de cães infectados. Todavia, existem evidências de que outras espécies domésticas possam ser infectadas e incluídas na cadeia epidemiológica da doença em áreas endêmicas. Dentre elas destacam-se os gatos, cujos hábitos crepusculares e noturnos, similares aos dos flebotomíneos, podem predispor esta espécie animal à infecção por *Leishmania* sp.. No tocante ao papel epidemiológico dos felinos, alguns autores consideram que estes são hospedeiros acidentais, enquanto outros sugerem que possam atuar como um potencial hospedeiro reservatório peridoméstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças endêmicas mundiais causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O parasito completa o seu ciclo de vida em dois tipos de hospedeiros, os vertebrados e os invertebrados. Nos hospedeiros vertebrados, tais como o homem, os animais domésticos e silvestres, as formas amastigotas parasitam o interior das células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos, onde sofrem divisão binária levando à lise celular. As amastigotas livres são novamente fagocitadas, disseminando-se por via hematogena e linfática para várias partes do organismo, ou são ingeridas pelo vetor, o hospedeiro invertebrado, durante seu repasto sanguíneo. Em seu tubo digestório as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, as quais se multiplicam bloqueando o proventrículo do flebótomo, fazendo com que, durante o repasto sanguíneo, ocorra o regurgitamento de sangue, o que favorece a inoculação das formas infectantes em um novo vertebrado suscetível. Finalmente, as formas promastigotas, no hospedeiro vertebrado, são fagocitadas e perdem o flagelo, originando as amastigotas (MACHADO et al., 2007). A transmissão do parasito aos vetores ocorre enquanto houver parasitismo na pele ou no sangue periférico dos reservatórios (CAMARGO et al., 2007).

Os vetores são flebotomíneos da família Psychodidae sendo a *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie encontrada nas Américas, considerada por muitos anos como a única transmissora da doença (REY, 2001). Entretanto, Santos e colaboradores (1998) demonstraram a presença de *Lutzomyia cruzi* como vetor da doença no Mato Grosso do Sul registrando, desta forma, a participação das duas espécies no Brasil.

O cão possui grande importância epidemiológica na doença por ser considerado o principal reservatório no ambiente doméstico, com prevalência variando de 63%-80% (Baneth et al., 2008). Em relação aos gatos, alguns

estudos foram desenvolvidos em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, com o intuito de estimar a prevalência de infecção nesta espécie animal porém, ainda não há uma definição real desta percentagem.

A primeira referência à leishmaniose felina data de 1756 quando Russel, no relatório de sua viagem à cidade de Aleppo, na Índia, descreveu que, além do homem e dos cães, os gatos também eram acometidos pela doença (NAUCKE, 2000). Em 1912, Sergent e colaboradores, na Argélia, descreveram pela primeira vez a infecção de um gato de quatro meses de idade por *Leishmania* sp. e, desde então, outros casos foram relatados no Brasil, Espanha, França, Irã, Itália, Jerusalém, Portugal e Suíça. (OZON et al., 1998; POLI et al., 2002; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; AYLLON et al., 2008; COSTA, 2008; MAIA et al., 2008; NASEREDDIN et al., 2008; HATAM et al., 2009).

O primeiro caso relatado no Brasil foi descrito por Mello, em 1940, de um gato com lesões na orelha e no plano nasal, sem a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (SIMÕES-MATTOS et al., 2004). Em 2004, Savani e colaboradores relataram o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral felina documentado nas Américas em um gato proveniente do município de Cotia, Estado de São Paulo, Brasil. O animal apresentava quadro dermatológico caracterizado por lesão nodular no plano nasal além de emagrecimento progressivo e linfadenomegalia. Outros três casos também foram identificados entre os anos de 2003 e 2004¹ no município de Araçatuba - São Paulo, Brasil (MIRACELLY, 2005).

No ano de 2005, Vita e colaboradores realizaram o primeiro estudo com uma população de 203 gatos residentes em Abruzzo, Itália, encontrando 16,3% de prevalência da infecção. Dois anos depois, Solano-Gallego e colaboradores identificaram em 445 animais provenientes de Barcelona, Tarragona e Ilha de Maiorca, Espanha, 6,29% de soropositividade, enquanto Martín-Sánchez e colaboradores avaliando uma população de 183 gatos do sudeste da Espanha encontraram uma soroprevalência de 60%. Ainda em 2007 um estudo conduzido em Araçatuba - São Paulo, Brasil, por Rossi, identificou 3% de

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

animais infectados em uma população de 200 gatos. No ano seguinte, foram demonstradas prevalências de 6,7% e 20% em populações de gatos provenientes de Jerusalém e Espanha, respectivamente (AYLLON et al., 2008; NASEREDDIN et al., 2008). Por outro lado, dois estudos realizados no mesmo ano em Araçatuba, Estado de São Paulo, identificaram 11,5% e 28,7% de amostras séricas positivas para leishmaniose de 200 e de 108 gatos, respectivamente. (COSTA, 2008; NETO et al., 2008). Finalmente, Sarkari e colaboradores, em 2009, avaliando 40 gatos do Irã identificaram 25% de animais positivos.

A despeito das discordâncias entre pesquisadores no tocante ao papel do gato como reservatório da doença, Maroli e colaboradores (2007) relataram a infecção de *Phlebotomus perniciosus* por *Leishmania infantum*, por meio de xenodiagnóstico, em um gato cronicamente infectado, com taxas de repasto sanguíneo e infecção semelhantes às observadas em cães. Cabe ressaltar que tratava-se de um animal de 13 anos de idade que não apresentava lesões cutâneas e que possuía apenas sinais clínicos de periodontite e linfadenomegalia submandibular (MAROLI et al., 2007).

O quadro clínico apresentado pelo hospedeiro é dependente da resposta imune desenvolvida por este. O principal fator que influencia a evolução desta enfermidade é a resposta das células T. Em camundongos inoculados com *Leishmania infantum* demonstrou-se que macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans atuam como apresentadoras de antígenos e ativam os linfócitos Th1 e Th2. Com a ativação da sub-população Th1 há a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ) que, por sua vez, aumentam a eficiência das células fagocitárias e produzem radicais livres tóxicos ao parasito, o que pode levar à eliminação da infecção. Em contraste, com a ativação da sub-população Th2, há a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10). Esta produção leva à proliferação de linfócitos B, subsequente produção de anticorpos, principalmente IgG, e o desenvolvimento da doença. Desta forma, a

resposta mediada por Th1 está associada à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção e a resposta Th2 está mais correlacionada com a progressão da doença (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK; GENARO, 2007). O cão apresenta uma resposta imune similar à descrita anteriormente, entretanto, não se conhece o tipo de imunidade desenvolvida pelos gatos .

Apesar da existência de vários relatos na literatura confirmando a infecção em gatos por leishmanias do Complexo *donovani*, a maior parte dos autores realizou estudos de cunho epidemiológico (MANCIANTI, 2004; VITA et al., 2005; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; AYLLON et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009) com objetivo de tentar identificar a prevalência de animais infectados em áreas endêmicas. Desta forma, pouca atenção foi dispensada na descrição de possíveis quadros clínicos desenvolvidos por estes animais. Por este motivo, ainda não se conhece com segurança, quais as alterações clínicas mais importantes na leishmaniose visceral felina, exceto o fato de que muitos autores descrevem a ocorrência de lesões cutâneas.

Nas escassas publicações sobre os achados de exame físico de gatos com leishmaniose visceral, foram descritos quadros clínicos de apenas 51 animais. Lesões cutâneas foram relatadas em 12 (23,5%) animais, e linfadenomegalia local ou generalizada foi descrita em nove (17,6%). Presença de secreção ocular, desidratação, emaciação e êmese foram relatadas em oito (15,7%), sete (13,7%), cinco (9,8%) e cinco (9,8%) animais, respectivamente. Anorexia, hipertermia, hepatoesplenomegalia e alterações do sistema respiratório foram descritos em quatro animais (7,8%). Dois (3,9%) animais possuíam distensão abdominal e outros dois (3,9%) periodontite. A ocorrência de ceratite ulcerativa, diarreia, hematuria e poliúria com polidipsia foram relatadas apenas uma vez na literatura (OZON et al., 1998; HERVÁS et al., 1999; POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004; GREVOT et al., 2005; LEIVA et al., 2005; VITA et al., 2005; ROSSI, 2007; AYLLON et al., 2008; NASEREDDIN et al., 2008; HATAM et al., 2009). Cabe ressaltar que muitos foram os relatos em que o animal infectado estava em boas condições gerais, permanecendo assintomático durante todo o estudo.

Ainda não está claro se o quadro dermatológico é causado por uma ação da leishmania ou decorrente de coinfeções, como por exemplo, piодermites ou dermatofitoses, desencadeadas pela imunossupressão ocasionada pelo parasito. Outro problema a ser levantado é o fato do uso de determinados medicamentos, como antifúngicos, poder melhorar temporariamente lesões cutâneas causadas por leishmanias, uma vez que estes fármacos podem ter ação leishmaniostática. Deste modo, a suspeita clínica passa a ser de outras enfermidades, uma vez que o tratamento melhora os sintomas, o que dificulta o diagnóstico de leishmaniose visceral. Por esta razão, há que se pensar que o número de casos de leishmaniose felina pode estar sendo subestimado (SIMÕES-MATTOS et al., 2004; SOUZA et al., 2005).

Em cães, os quadros dermatológicos podem apresentar padrões variados, nem sempre pruriginosos, podendo estar presentes na ausência de outras manifestações clínicas da enfermidade. As alterações tegumentares incluem excessiva descamação, rarefação pilosa, alopecia, despigmentação, hiperqueratose, ulcerações e presença de pápulas e nódulos intradérmicos (FEITOSA et al., 2000). Em felinos, foram relatados quadros ulcerativos, nodulares, alopecicos e em um caso observou-se a presença de dermatite seborreica (OZON et al., 1998; POLI et al., 2002; PENNISI et al., 2004; GREVOT et al., 2005; NASEREDDIN et al., 2008).

No que diz respeito à distribuição topográfica de assentamento lesional nos gatos, Craig et al. (1986) referiram que o pavilhão auricular é a área mais predisposta ao surgimento de lesões, pois é a região mais exposta ao vetor, uma vez que os felinos possuem uma pelagem mais rarefeita neste local. Também são descritas lesões no plano nasal (PENNISI et al., 2004) e região periocular (BONFANTE-GARRIDO et al., 1990).

Dentre os diversos padrões histopatológicos observados na pele de cães com leishmaniose visceral, frequentemente observa-se uma dermatite perivascular mononuclear superficial ou profunda, uma hiperqueratose paraqueratótica ou ortoqueratótica folicular e epidérmica, uma dermatite intersticial, adenite sebácea, inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa e

uma perifoliculite granulomatosa (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Menos comumente identificam-se quadros de dermatite periglandular, dermatite liquenóide, dermatite nodular, paniculite lobular, foliculite supurativa, dermatite pustular intraepidérmica e vasculite necrotizante (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). O diagnóstico diferencial por meio deste método é dificultado pela inespecificidade de seus achados, entretanto, torna-se viável quando formas amastigotas são identificadas nos tecidos. Para aumentar a possibilidade do achado do parasito, pode-se fazer uso de técnicas de imunistoquímica, que apresentam elevadas sensibilidade e especificidade. Estas utilizam anticorpos específicos anti-*Leishmania* sp., permitindo a visualização de formas amastigotas em tecidos, aumentando a possibilidade de diagnóstico (FERRER et al., 1988; BOURDOISEAU et al., 1997).

A primeira descrição das alterações histopatológicas da pele de um gato naturalmente acometido por *Leishmania infantum*, foi realizada por Ozon e colaboradores no ano de 1998 e incluem uma hiperqueratose paraqueratótica com numerosas colônias de cocos e presença de *Malassezia* sp., acompanhada de hiperplasia epidérmica irregular e severa, associada a uma espongiose multifocal e, à congestão e infiltrado inflamatório perivascular da derme superficial estendendo-se ao longo dos anexos. O infiltrado inflamatório era composto de macrófagos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. No citoplasma de alguns macrófagos foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* sp.. Tratava-se de um gato de seis anos de idade, de vida livre que vivia em uma área enzoótica para leishmaniose canina no sul da França. O animal apresentava lesões alopecicas e dermatite seborreica ulcero-crostosa por todo o corpo (OZON et al., 1998). Anos depois, Poli e colaboradores (2002) descreveram outro padrão histopatológico em um felino evidenciando uma dermatite piogranulomatosa nodular a difusa com infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos e células plasmáticas.

O diagnóstico de leishmaniose visceral deve ser confirmado através de exames laboratoriais, uma vez que os sinais clínicos, quando presentes, não são específicos e podem sugerir outras enfermidades. O exame parasitológico

direto fundamenta-se na demonstração de formas amastigotas do parasito em esfregaços de órgãos linfóides ou até mesmos de lesões cutâneas. Este método apresenta uma especificidade de 100% e possui vantagens como simplicidade e rapidez na sua execução, no entanto, pode apresentar uma baixa sensibilidade, sendo diretamente proporcional ao grau de parasitismo do órgão avaliado (SLAPPENDEL; GREENE, 1990).

O Ministério da Saúde do Brasil utiliza exames sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral em inquéritos epidemiológicos caninos. O ensaio imunoenzimático (ELISA) apresenta, na espécie canina, uma sensibilidade variando de 80% a 99,5% e a especificidade que varia de 81% a 100% (ASHFORD et al., 1995; MANCIANTI et al., 1995; ZANETTE, 2006). Na espécie felina nota-se dificuldades quando da realização da sorologia, uma vez que não há ainda uma padronização da técnica a ser empregada nesta espécie animal, principalmente devido à resposta imune dos gatos, que parece apresentar uma menor produção de anticorpos quando comparados aos cães. Em estudos pretéritos observa-se discordâncias entre os autores quanto à técnica utilizada, com variações nas concentrações de antígenos, nas diluições das amostras de soros utilizados, na escolha do anticorpo conjugado ou, até mesmo, nota-se a falta de descrição detalhada da metodologia (ROSSI, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; COSTA, 2008; NASEREDDIN et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009). Em relação à sensibilidade da técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em gatos observa-se uma variação de 12,5% a 25% e, uma especificidade variando de 19,2% a 96,4% (ROSSI, 2007).

Outro método de diagnóstico sorológico inclui a reação de imunofluorescência indireta. Em cães a sensibilidade varia de 90 a 100% e, a especificidade de 80 a 100% (METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006). Em relação aos gatos, a dificuldade da técnica não é diferente da encontrada quando da realização do ELISA. Nos trabalhos publicados observa-se diferenças quanto à escolha do anticorpo conjugado mas, a grande divergência ocorre no que tange ao ponto de corte da reação, ou seja, em qual titulação

pode-se considerar a amostra reagente. Neste contexto, observa-se trabalhos que consideram os felinos positivos quando apresentam soro reagente na concentração de 1:2 e, outros, que apontam como o título a ser determinado para positividade valores iguais ou superiores à 1:40 (VITA et al., 2005; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007; AYLLON et al., 2008; MAIA et al., 2008). A sensibilidade nesta espécie animal, de acordo com Rossi (2007) foi de 12,5% e, a especificidade encontrada foi de 100%. Desta forma, ambos os métodos devem ser interpretados com cautela uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, podendo apresentar resultados falso-positivos e falso-negativos.

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), ampliam seletivamente sequências de DNA da *Leishmania* sp., identificando a espécie envolvida. A detecção do DNA é possível em uma variedade de tecidos, como a medula óssea, pele, linfonodos, baço, fígado, rins entre outros. No entanto, ainda não é um exame de rotina clínica devido ao custo, às vezes elevado, e por tratar-se de um método de diagnóstico pouco difundido em medicina veterinária (MARY et al., 2004).

Em face ao exposto, o presente estudo teve por principal objetivo pesquisar a ocorrência de infecção por *Leishmania chagasi* em gatos domésticos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba, área endêmica para leishmaniose visceral, por meio de exames parasitológicos direto de órgãos linfóides, exame histopatológico de lesões cutâneas, reação de imunistoquímica de pele hígida e de áreas lesionadas, assim como por sorologia por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e reação de imunofluorescência indireta; além de pesquisar a existência de coinfeções por ácaros, bactérias e fungos nas lesões de pele dos referidos animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados 55 gatos (*Felis catus domesticus*), independente de sexo e raça, domiciliados no município de Araçatuba - São Paulo, área endêmica para leishmaniose visceral.

3.2. Delineamento Experimental

O critério de seleção dos animais foi a presença de lesões cutâneas. Em vista da baixa casuística de felinos com problemas dermatológicos encaminhados ao Hospital Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Araçatuba, optou-se por procurar animais em residências e em gatis. Sendo assim, parte das amostras (32 gatos) foi obtida de dois locais com grande número de animais. Muitos eram animais abandonados, recolhidos da rua e levados às propriedades para serem submetidos a tratamento. Após serem selecionados e, com o consentimento dos proprietários, os gatos eram encaminhados ao laboratório do Curso de Medicina Veterinária da Unesp de Araçatuba, para serem submetidos à castração (46 animais) e para a colheita das amostras.

Foram colhidas amostras séricas para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e antígenos do vírus da Leucemia Felina (FeLV). No trans-operatório eram realizadas as punções biopsia aspirativas de baço e fígado e, após o término da cirurgia, as de linfonodo poplíteo e de medula óssea, todas para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* por meio de exame parasitológico direto.

As áreas com lesões cutâneas e outras áreas pré-determinadas (ponta de orelha, plano nasal, região supra-orbitária e mentoniana) foram biopsiadas

para a realização de exame histopatológico e reação de imunistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp. Foram também obtidas amostras para pesquisa de ácaros e para o cultivo microbiológico das lesões.

Para a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida amostras de sangue total em EDTA foram colhidas e encaminhadas para IDEXX Laboratories em Sacramento – Califórnia para a realização da reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real.

3.3 Colheita de sangue total

Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular e mantidas à temperatura ambiente até a retração visível do coágulo para, a seguir, serem centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, para obtenção do soro. Este, por sua vez, foi transferido em alíquotas para ependorfes e armazenado a -20°C até o momento de seu processamento.

3.4 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*

3.4.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Realizou-se a titulação em bloco para a padronização das diluições mais apropriadas do soro dos gatos e, para a determinação das concentrações de proteína A e de antígeno. As concentrações do antígeno testadas foram 10µg/mL e 20µg/mL e as do anticorpo proteína A foram 1:80.000, 1:100.000, 1:120.000, 1:160.000 e 1:200.000. As diluições de 1:100 e 1:200 foram testadas nos soros dos gatos. A escolha dos melhores valores foi determinada através de uma curva onde foi possível observar uma melhor diferenciação entre os controles positivos e negativos, e pela presença de reprodutibilidade. Dessa forma preconizou-se as concentrações de antígeno de 20µg/mL, soro de 1:200 e de proteína A peroxidase de 1:80.000.

Após a titulação em bloco, padronizaram-se as seguintes condições: as microplacas¹ foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/72/cepa46), em uma concentração de 20µg/mL em tampão carbonato 0,05M, pH9.6, e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram bloqueadas com 150µL de solução salina tamponada (PBS), acrescida de leite desnatado a 10%², e incubadas à 37°C durante duas horas. Adicionaram-se 100µL, por poço, das amostras de soro dos gatos, dos controles positivos e dos controles negativos (animais saudáveis de área não endêmica para leishmaniose visceral). Estas foram testadas em duplicata, diluídas 1:200 em solução salina tamponada contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e, incubadas por uma hora à 37°C. Colocaram-se 100µL por poço de proteína A marcada com peroxidase³ diluída 1:80.000 em PBS-T. Após a incubação por 45 minutos à 37°C foram adicionados 100µL de uma solução de tetrametilbenzidina⁴, com posterior incubação por 30 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50µL de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) e, a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 450nm utilizando o leitor de ELISA⁵. Entre cada etapa as placas foram lavadas com solução PBS-T por três vezes. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata.

3.4.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Lâminas de vidro para realização de RIFI foram sensibilizadas adicionando-se a cada círculo 20mL da suspensão de parasitos (MHOM/BR/72/cepa46), em solução salina tamponada (SST), na concentração de $8,1 \times 10^6$ promastigotas/ml. Após a secagem em estufa, as lâminas foram embaladas em papel extra-fino e papel alumínio e, armazenadas em freezer à -20°C. No momento do uso as lâminas foram descongeladas em estufa durante dez minutos. Foram, então, adicionados 20µL das amostras séricas dos gatos a serem testados, bem como, em cada lâmina, uma amostra de controle positivo e negativo, todas diluídas nas concentrações de 1:20 e 1:40 em SST.

¹ Costar® 3590

² Leite desnatado Molico® - Nestlé

³ Sigma – Aldrich Brasil LTDA cód. P8651

⁴ BD – TMB Substrate Reagent cód. 555214

⁵ Labsystems Multiskan EX

As lâminas foram, em seguida, incubadas em câmara úmida à 37°C por 30 minutos e lavadas por imersão em três banhos de SST de cinco minutos cada. Após a secagem, foram acrescidos 20µL do anticorpo anti-IgG de gato fluoresceinado⁶ diluído a 1:100 em azul de Evans 4mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas como descrito anteriormente. Posteriormente foram montadas com glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 8,0) e recobertas por lamínula, sendo a leitura efetuada em microscópio de imunofluorescência em objetiva 40X. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentaram as promastigotas fluorescentes, inclusive no flagelo e, não reagentes as amostras que não apresentaram fluorescência, tendo uma cor avermelhada. As amostras positivas na concentração 1:40 foram novamente processadas, diluídas em 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320, para a titulação de cada amostra sérica. Em cada lâmina foram utilizadas novamente amostras de controles positivos, negativos para a validação do teste.

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

As amostras de soro dos gatos foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e de antígenos do vírus da leucemia felina (FeLV), por meio do Kit comercial SNAP Combo FeLV/FIV Test⁷. A metodologia empregada neste teste foi a recomendada pelo fabricante.

3.6 Pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* em exame citológico de linfonodos, medula óssea, baço e fígado

As punções biopsia aspirativas de baço, fígado e linfonodos foram realizadas com agulhas 25X7 e as de medula óssea com agulha 40X12, acopladas a uma seringa de 10 ml e 20 ml, respectivamente. Após a confecção

⁶ Sigma-Aldrich cód F4262

⁷ IDEXX Laboratories Inc., USA

dos esfregaços as lâminas foram coradas com corante hematológico⁸ e observadas ao microscópio óptico, em objetiva de 100X, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*.

3.7 Exame parasitológico de raspado cutâneo

Com o auxílio de uma lâmina metálica, a superfície da área a ser examinada foi escarificada, de forma que a lâmina estivesse posicionada perpendicularmente à área de lesão. O material colhido foi depositado numa lâmina histológica, sendo distribuído na sua superfície com o auxílio de uma segunda lâmina. O material foi clarificado por 20 minutos com hidróxido de potássio (KOH) a 10% e visualizado em microscópio óptico com objetiva de 10x, para pesquisa direta de ácaros.

3.8 Cultivo microbiano das áreas com lesões cutâneas

3.8.1 Cultivo Bacteriano

Colheu-se das áreas com lesões cutâneas amostras de crostas e secreção, quando da presença destes. As amostras foram semeadas em Ágar Sangue de carneiro a 5% e Ágar MacConkey e incubadas a 37°C, em atmosfera de aerobiose, realizando-se leituras às 24 e 48 horas. Observou-se as características culturais e morfotintoriais, por meio do método de coloração de Gram (QUINN et al., 2004). Para a diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, além das características morfotintoriais e da presença de hemólise, também foi realizada a prova de catalase. Para a classificação dos *Staphylococcus* procedeu-se o teste da coagulase.

⁸ Panótico Rápido – Laborclin

3.8.2 Cultivo Fúngico

Visando a pesquisa de fungos filamentosos e de leveduras procedeu-se ao cultivo das amostras (secreção e pêlos) em Ágar Sabouraud dextrose a 4%, com incubação a 25°C e a 37°C, e em Ágar Mycosel, com incubação a 25°C, todos por um período de sete a 15 dias com observação diária dos mesmos. Para a identificação dos gêneros dos fungos, foi realizada análise macroscópica das colônias e também foram confeccionados esfregaços corados com azul algodão, para as colônias com crescimento na forma filamentosa, e com nanquim para as leveduras.

3.9 Biopsia Cutânea

As biopsias das lesões cutâneas foram realizadas com auxílio de bisturi, após bloqueio infiltrativo da lesão dermatológica com lidocaína a 2% sem vasoconstritor. Os locais biopsiados foram as áreas de transição das lesões cutâneas e áreas pré-determinadas que incluíram a região de extremidade do pavilhão auricular, plano nasal, região supra-orbitária e mentoniana.

3.9.1 Exame Histopatológico

As amostras de tecidos foram fixadas em formalina tamponada a 10% e posteriormente incluídas em parafina para os procedimentos de rotina histopatológica, fazendo-se cortes de cinco a seis micrômetros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Por meio do exame histopatológico foram observadas as alterações microscópicas das áreas de lesões de pele, e, pesquisou-se a presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*.

3.9.2 Pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* por meio da reação de imunoistoquímica

Todos os fragmentos em que se constatou uma reação inflamatória na pele foram submetidos à reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania chagasi*. Os cortes foram desparafinizados e hidratados em banhos de xilol, álcool em concentrações decrescentes (100°, 92,8° e 70°), água corrente por 10 minutos e imersão em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através de oito banhos de cinco minutos cada em peróxido de hidrogênio 2% (10 volumes), seguido de lavagem em água corrente e imersão em água destilada. A recuperação antigênica foi feita com tratamento dos cortes em tampão citrato pH 6,0, aquecido em banho-maria de 95° a 99°C, durante 60 minutos, utilizando-se banho-maria. Após o resfriamento (55°C) realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas utilizando-se leite desnatado 6% em PBS 0,05%, durante uma hora, em estufa a 37°C. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS-T por três vezes de cinco minutos cada e, incubados com anticorpo primário anti-*Leishmania amazonensis*, produzido em camundongo, pelo Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, durante toda a noite.

No dia seguinte os cortes foram novamente lavados e submetidos à nova incubação, desta vez com anticorpo secundário biotilado⁹ a 37°C, por 60 minutos. Após nova lavagem realizou-se incubação com streptavidina-peroxidase⁹ a 37°C por mais 45 minutos. A reação final foi revelada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de 3,3'-diaminobenzidina (DAB)¹⁰. A contra-coloração do tecido foi feita com hematoxilina de Harris. Após a desidratação dos cortes, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se resina, e foram observadas em microscopia óptica comum (40X) para identificação de formas amastigotas de leishmanias.

⁹ Kit LSAB - Dako North America, Inc.

¹⁰ DakoCytomation CA, USA K3468

3.10 Amplificação de DNA de *Leishmania* sp. pela reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real.

Extração de DNA

Amostras de sangue total em EDTA foram estocadas a -20°C antes da extração total do ácido nucleico e da realização do PCR em tempo real. A extração foi realizada por meio de protocolo padrão do sistema Corbett XTractor-Gene platform¹¹. O controle interno da reação foi feito por amplificação de fragmento do gene 18S-rRNA.

PCR em tempo real (TaqMan)

O PCR foi baseado em oligonucleotídeos para PCR em tempo real de propriedade da IDEXX (IDEXX Laboratories Inc., USA), que são derivados do gene metaloproteinase gp63, com sonda desenhada para o sistema TaqMan.

3.11 Análise Estatística

Para avaliar a concordância dos métodos de ELISA e RIFI com os exames parasitológicos foi calculado o coeficiente Kappa. A interpretação da concordância entre os métodos, a partir dos valores de kappa, foi de acordo com Pereira (2002).

As análises foram realizadas utilizando-se o programa “GraphPadInStat” e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

¹¹ Qiagen, Valencia, CA

4. RESULTADOS

4.1 Animais

Dos 55 animais avaliados 35 (63,6%) eram machos e 20 (36,4%) eram fêmeas, com idade variando entre três meses e 13 anos e média de três anos e seis meses; seis (10,9%) eram da raça siamês e 49 (89,1%) não possuíam raça definida. Nos animais selecionados, as alterações dermatológicas mais frequentemente observadas foram áreas de alopecia e rarefação pilosa com deposição de crostas hemorrágicas e/ou melicéricas. Em alguns animais foi possível observar também colaretes epidérmicos, escoriações, ulcerações, eritema e, mais raramente, hiperpigmentação. Notou-se, ainda, a presença de formações sólidas, representadas por pápulas e nódulos, tanto em região de cabeça quanto ao longo do dorso.

Na população de gatos ora estudada foram identificados 27 (49,1%) animais infectados por leishmaniose visceral. Destes, 12 (44,4%) foram positivos nos exames parasitológicos, 11 (40,7%) foram sororeagentes e quatro (14,8%) positivos por ambos os métodos.

Em relação às alterações dermatológicas dos 27 gatos positivos para leishmaniose visceral, observou-se em 14 (51,8%) presença de rarefação pilosa em região de membro, ao longo do dorso, no pavilhão auricular e, em região de abdômen, cauda e de plano nasal. Áreas de alopecia foram identificadas em dez (37%) animais principalmente nos pavilhões auriculares, seguido de região cefálica, membros e região abdominal. Constatou-se também a presença de crostas melicéricas e hemorrágicas em nove (33,3%) e oito (29,6%) animais, respectivamente, com acometimento das regiões de pavilhões auriculares, de membros e cabeça (Figuras 1). Oito (29,6%) gatos possuíam ulcerações profundas nos pavilhões auriculares (Figuras 1 e 3) e, um (3,7%) animal apresentava o mesmo tipo de lesão no espelho nasal. Também em oito (29,6%) animais notou-se a presença de eritema nas áreas de pavilhão

auricular, região abdominal, membros, região cervical e de plano nasal. Hiperpigmentação, hiperqueratose, lignificação e presença de exsudação foram observadas em três (11,1%) animais, respectivamente, em áreas ao longo do dorso, membros, região cefálica e abdominal ventral (Figura 2). Ainda, identificou-se em um (3,7%) gato a existência de descamação furfurácea, colaretes epidérmicos e comedos em áreas ao longo do dorso e em pavilhão auricular (Figura 4).

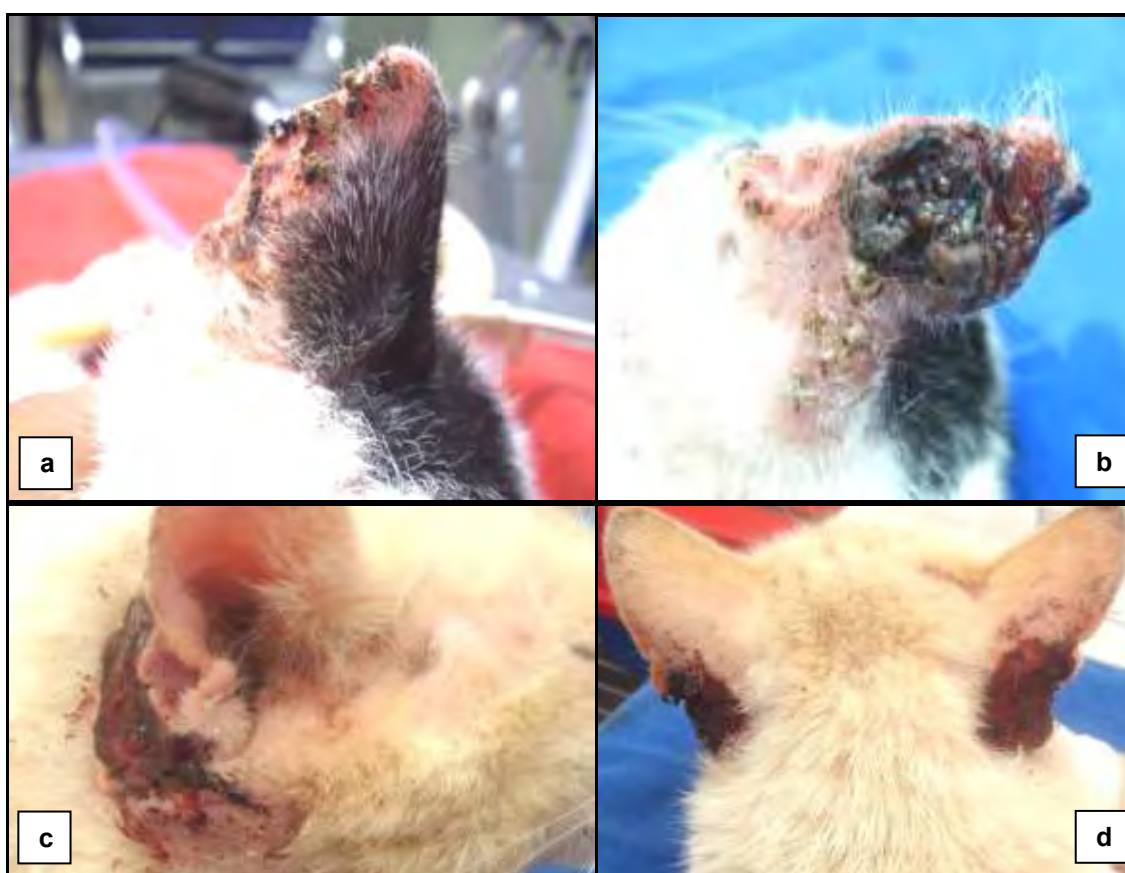


Figura 1 – Lesões cutâneas de gatos naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Rarefação pilosa em face lateral do pavilhão auricular esquerdo com eritema e deposição de crostas melicéricas (a); mesmo animal apresentando, após 60 dias, ulceração profunda em ponta de orelha esquerda com deposição de crostas hemorrágicas e melicéricas (b); alopecia com sangramento ativo e deposição de crostas hemorrágicas em base de pavilhão auricular direito (c); mesmo animal, demonstrando que as lesões são bilaterais e simétricas (Araçatuba-SP, 2010)



Figura 2 – Lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por *Leishmania chagasi*. Presença de hiperqueratose e rarefação pilosa em região de cabeça (a); o mesmo animal apresentando áreas de alopecia, hiperqueratose, lignificação e descamação furfurácea ao longo do dorso (b); área de alopecia com solução de continuidade apresentando eritema, exsudação e deposição de crostas melicéricas em região de flanco esquerdo (c); mesmo animal apresentando área de alopecia com feridas perfurantes em região cervical ventral e, presença de comedos em região mentoniana (d) (Araçatuba-SP, 2010)



Figura 3 – Lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por *Leishmania chagasi*. Caquexia, estupor, áreas alopécicas eritematosas em face lateral de membros torácicos (a); Área alopécica, eritematosa, circular de aproximadamente um centímetro de diâmetro (b); Área de alopecia com eritema e exsudação em região cervical (c); Rarefação pilosa com deposição de crostas melicéricas em face lateral de pavilhão auricular esquerdo e, presença de úlcera profunda em ponta de orelha direita com alopecia e deposição de crostas melicéricas e hemorrágicas (d) (Araçatuba-SP, 2010)

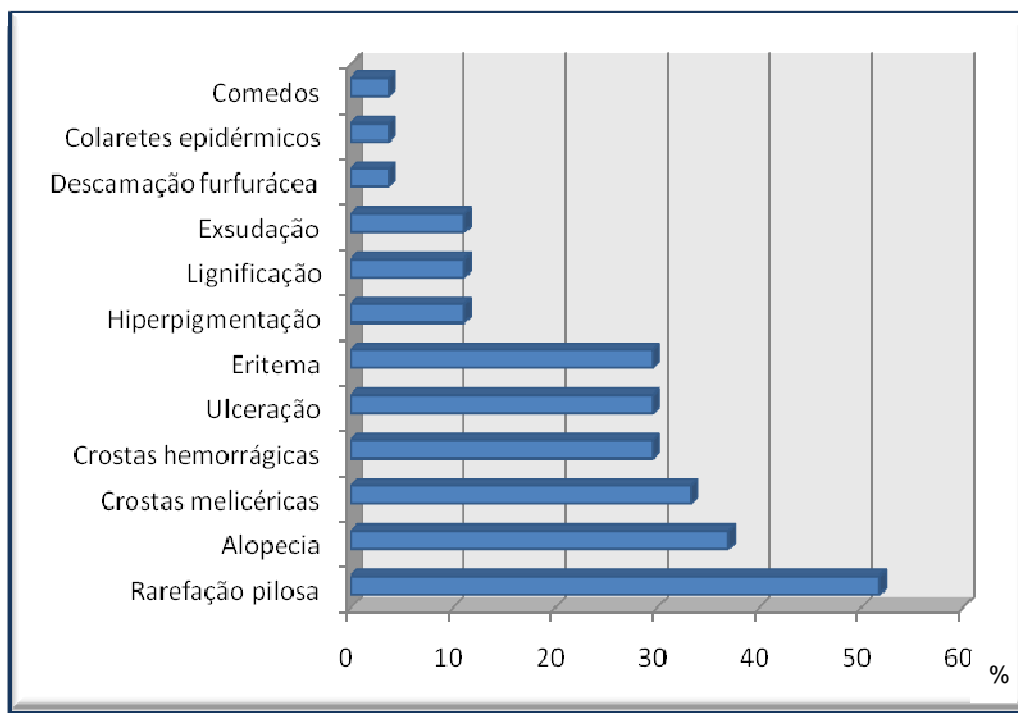


Figura 4 – Distribuição, em porcentagem, segundo as alterações dermatológicas de 27 gatos acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Quanto à distribuição topográfica das lesões, pôde-se verificar, em ordem decrescente de ocorrência, que 15 (55,5%) animais possuíam acometimento em região cefálica, seis (22,2%) em membros, seis (22,2%) em região dorsal, três (11,1%) em região de cauda e três (11,1%) em região abdominal ventral (Figura 5). Na região cefálica, os locais mais comprometidos foram os pavilhões auriculares (60%), seguidos do envolvimento generalizado (20%) e do espelho nasal (20%).

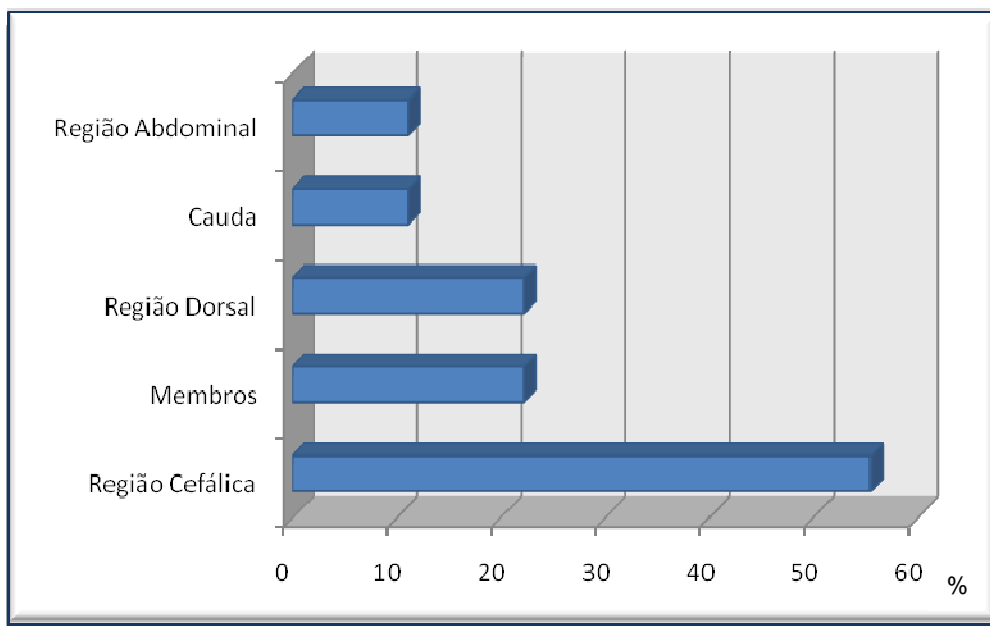


Figura 5 – Distribuição, em porcentagem, segundo a topografia lesional de 27 gatos acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Do ponto de vista do quadro mórbido observou-se que, dos 27 animais positivos para leishmaniose visceral, 19 possuíam além do envolvimento dermatológico, o comprometimento de outros sistemas, evidenciado pela presença de linfadenomegalia (52,6%), desidratação (52,6%), emaciação (36,8%), diarreia (21%), secreção ocular mucopurulenta bilateral (15,8%), alteração no estado de consciência (15,8%), presença de úlceras em cavidade oral (10,5%), dispnéia (5,3%), secreção nasal purulenta bilateral (5,3%), opacidade de córnea bilateral (5,3%) e hiperplasia de glândula ad-anal (5,3%) (Figura 6). Vale ressaltar que em oito (29,6%) animais não foi evidenciada nenhuma outra alteração no exame físico além do envolvimento cutâneo.

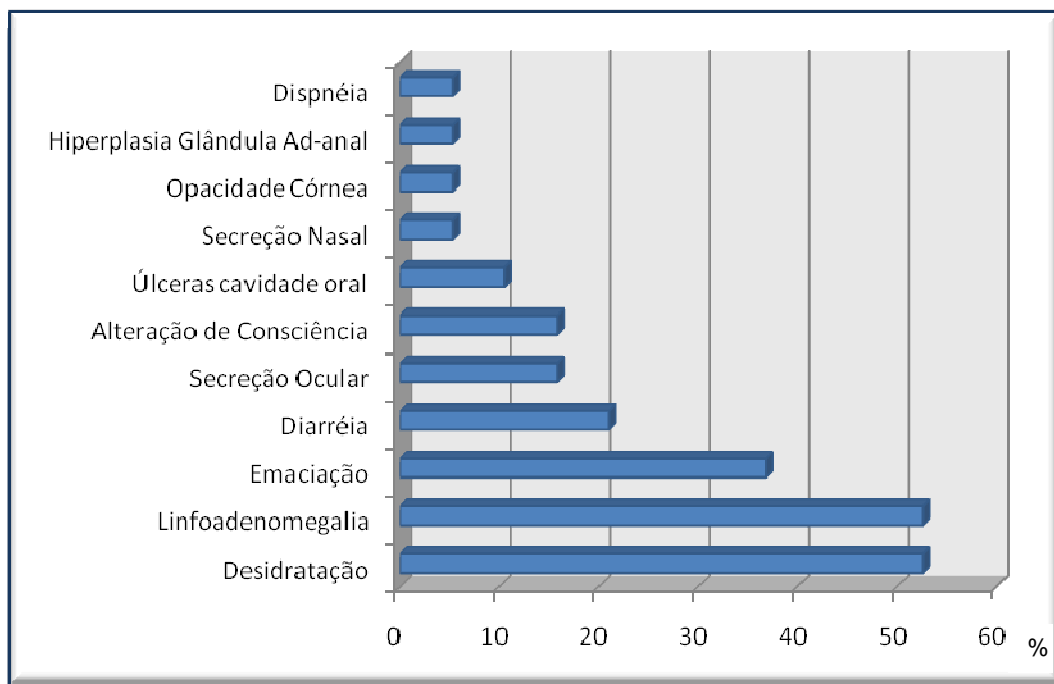


Figura 6 – Distribuição, em percentagem, segundo as alterações sistêmicas, de 19 gatos com dermatopatias acometidas por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

4.2 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pelos métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Das 55 amostras de soro dos gatos submetidas à técnica de ELISA, 14 (25,4%) foram sororeagentes (ponto de corte: 0,2765). Os valores individuais das médias das densidades ópticas (DO) encontram-se apresentados no Apêndice 1. Destes 14 animais, em apenas quatro (28,6%) foram evidenciadas formas amastigotas do parasito por meio de exames parasitológicos (Tabela 1), obtendo-se um coeficiente Kappa = - 0,006, o que determina uma concordância ruim entre os dois métodos.

Os resultados da reação de imunofluorescência indireta demonstraram positividade em seis dos 55 gatos avaliados, representando 10,9% da população estudada. O valor do coeficiente Kappa foi de 0,1356, sendo

considerada uma fraca concordância entre o método de RIFI e os exames parasitológicos. Dos seis animais positivos na RIFI, cinco (83,3%) foram considerados positivos também no ELISA indireto (Tabela 2) e, em três encontrou-se formas amastigotas do parasito em linfonodo, medula óssea, fígado e na pele (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por meio das técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e, do exame parasitológico direto de órgãos linfóides e imunoistoquímica de pele, em número absoluto e percentagem, de 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

		Parasitológico Direto			
		Positivo		Negativo	
		Número de Animais	Percentagem	Número de Animais	Percentagem
ELISA	Positivo	4	7,3%	10	18,2%
	Negativo	13	23,6%	28	50,9%
RIFI	Positivo	3	5,4%	3	5,4%
	Negativo	14	25,4%	34	61,8%

Tabela 2 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por meio das técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba – SP, 2010)

		RIFI			
		POSITIVO		NEGATIVO	
		Número de Animais	Percentagem	Número de Animais	Percentagem
ELISA	POSITIVO	5	9,1%	9	16,4%
	NEGATIVO	1	1,8%	40	72,7%

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

Apenas seis (10,9%) gatos, do total de animais investigados, possuíam anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e em nenhum identificou-se o vírus da leucemia felina. Dos 27 animais positivos para leishmaniose visceral, cinco (18,5%) apresentaram títulos de anticorpos positivos para o vírus da imunodeficiência felina. Destas seis amostras com coinfeção foram evidenciadas formas amastigotas do parasito em três (50%) animais e, cinco (83,3%) possuíam títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* positivos para a doença.

4.4 Detecção de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* por meio do exame parasitológico direto de linfonodo, medula óssea, baço e fígado

Foram avaliados dois esfregaços obtidos por punção biopsia aspirativa de cada órgão linfóide (linfonodo, medula óssea, baço e fígado), totalizando 380 lâminas observadas. Destas, em dez (18,2%) animais foram observadas

formas amastigotas do parasito e, em cinco (50%) foram identificados parasitos em mais de um órgão linfóide. Os órgãos em que o parasito foi encontrado mais frequentemente foram a medula óssea (70%), seguido do baço (40%), linfonodo poplíteo (30%) e fígado (20%) (Figura 7 e Tabela 3). Dos dez gatos em que se evidenciou a presença do parasito, apenas três (30%) foram sorologicamente positivos para leishmaniose visceral.

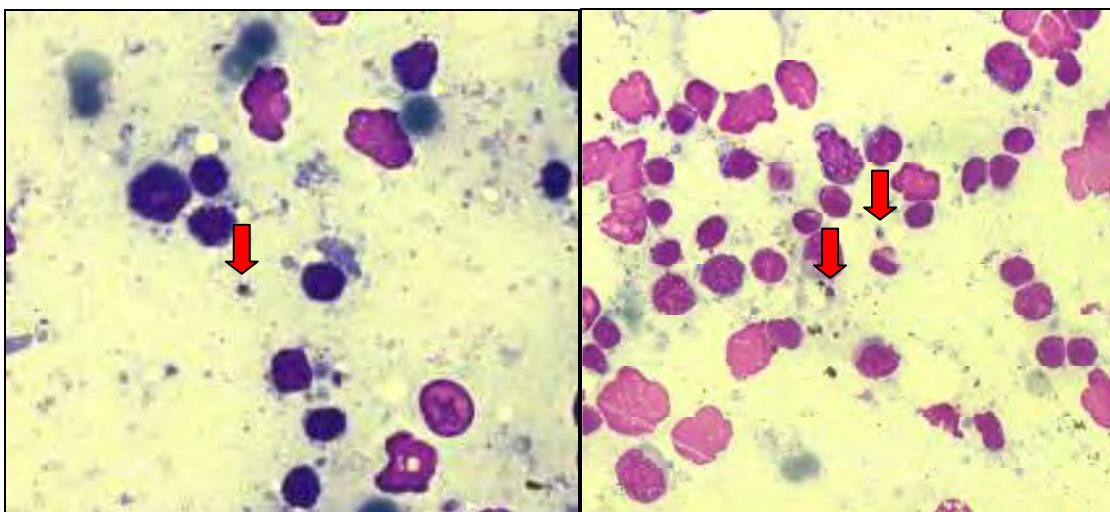


Figura 7 – Fotomicrografia de punção biopsia aspirativa de linfonodo poplíteo de gatos com dermatopatias provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral. Notar a presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*; 100x (Araçatuba-SP, 2010)

Tabela 3 – Resultados da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* em exame citológico obtido por meio de punção biopsia aspirativa (PBA) de medula óssea, linfonodo, baço e fígado, em número absoluto e percentagem, de 10 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Tecido	PBA	
	Número de Animais	Percentagem
Medula Óssea	7	70
Baço	4	40
Linfonodo	3	30
Fígado	2	20
Total	10	100

Os achados individuais para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* em esfregaços obtidos por PBA de medula óssea, linfonodo poplíteo, baço e fígado encontram-se apresentados no Apêndice 2.

4.5 Exame histopatológico de lesões cutâneas e pesquisa de *Leishmania chagasi* por reação de imunoistoquímica

Os resultados individuais dos achados histopatológicos dos 27 animais positivos para leishmaniose visceral encontram-se apresentados no apêndice 3. Os padrões observados variaram de uma dermatite perivascular observada em sete (25,9%) gatos (Figura 8), áreas de fibrose dérmica verificadas em quatro (14,8%) animais, alterações compatíveis com hipersensibilidade cutânea em três (11,1%) e, dermatite intersticial com presença de espongirose, exocitose e acantose em um (3,7%) único animal. Três (11,1%) gatos apresentavam, associado ao quadro de leishmaniose visceral, carcinoma de células escamosas em pavilhão auricular (2 animais) e em plano nasal (1 animal).

No exame histopatológico de apenas um animal (Nº6) foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania chagasi* no interior de macrófagos na derme (Figura 9). No entanto, quando da realização da técnica de imunohistoquímica para pesquisa do parasito nas lesões cutâneas o número total de positivos se elevou para nove (16,4%), incluindo o gato com formas amastigotas observadas na histopatologia corada por hematoxilina e eosina.

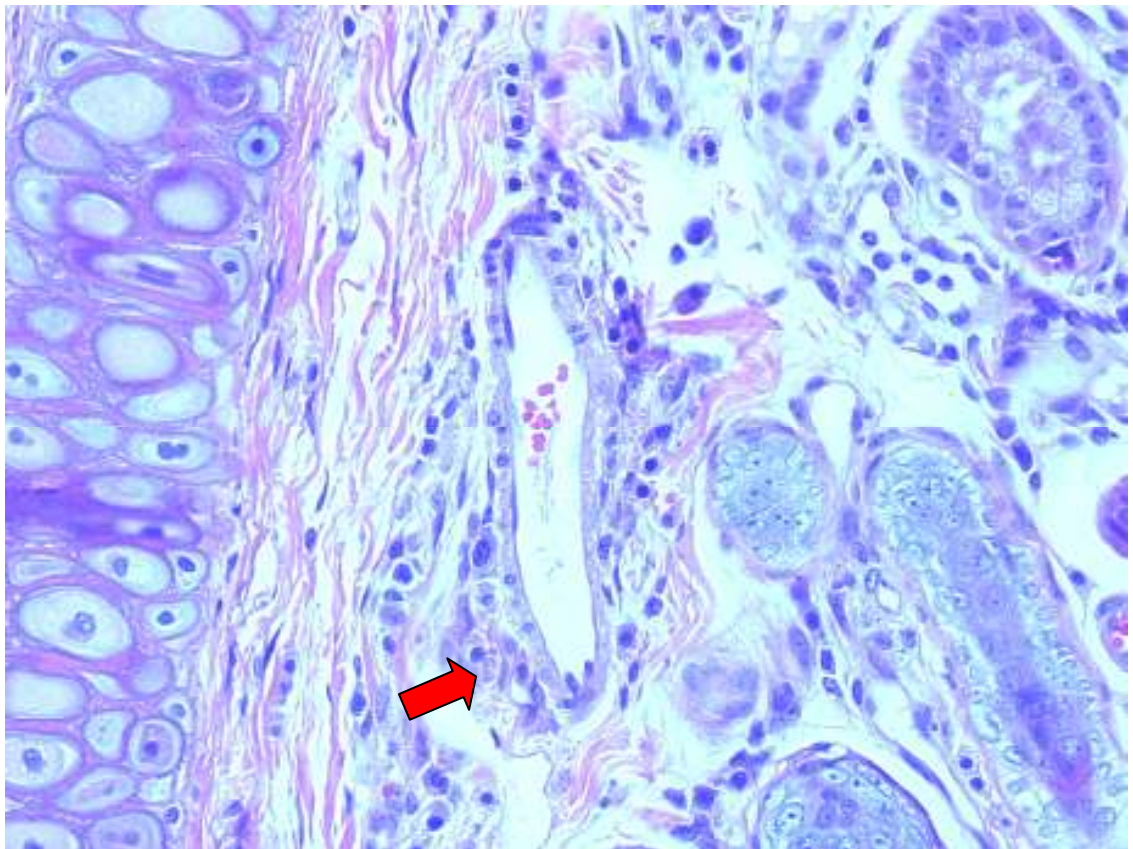


Figura 8 – Fotomicrografia de lesão cutânea localizada na extremidade do pavilhão auricular de um gato naturalmente acometido por leishmaniose visceral. Verificar a presença de um infiltrado inflamatório perivascular à intersticial composto por macrófagos e plasmócitos. HE 40x (Araçatuba-SP, 2010)

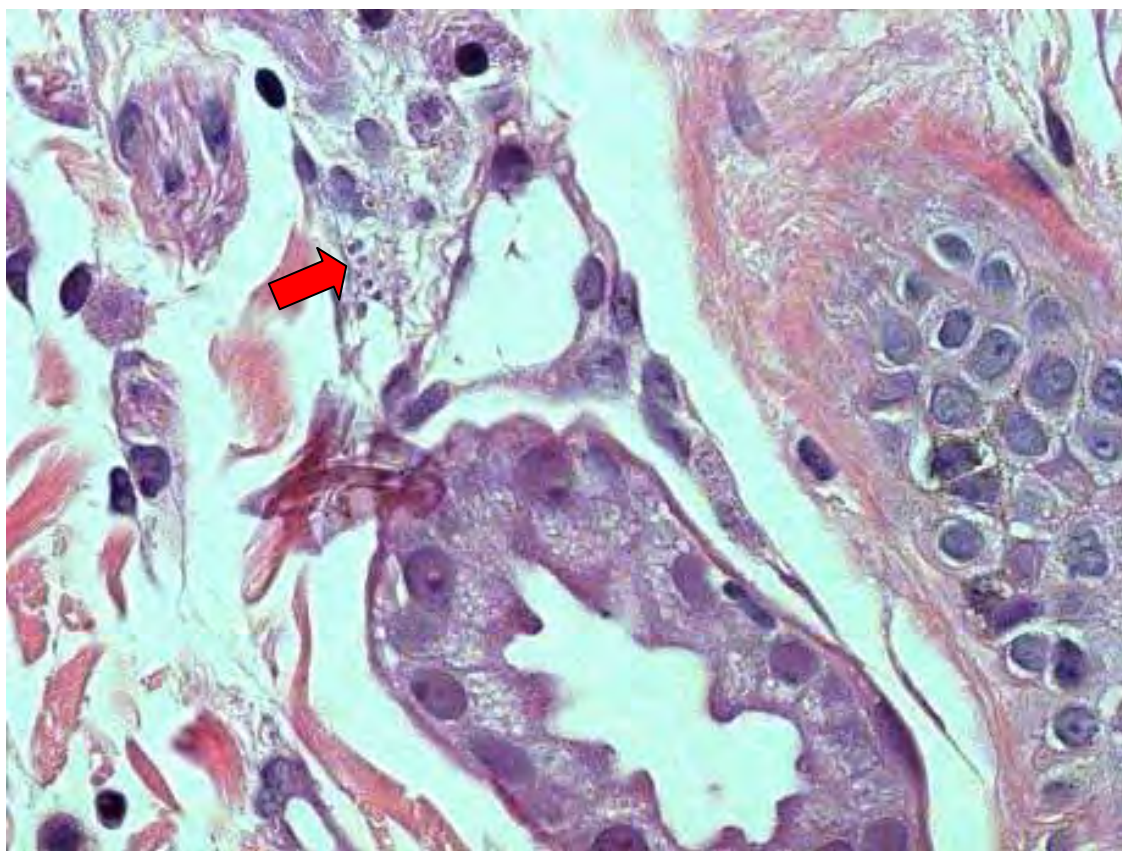


Figura 9 – Fotomicrografia de lesão cutânea localizada na extremidade do pavilhão auricular de um gato naturalmente acometido por leishmaniose visceral. Verificar presença de estruturas parasitárias no interior de macrófagos. HE 100x (Araçatuba-SP, 2010)

A imunomarcção para formas amastigotas de *Leishmania* sp. ocorreu em áreas dérmicas e epidérmicas nas regiões de ponta de orelha (55,5%), plano nasal (22,2%), mentoniana (11,1%) e em região supra-orbitária (11,1%) (Figura 10 e 11). Em todos os animais positivos por esta técnica haviam áreas de lesões cutâneas nas regiões imunomarcadas e não se observou esta marcação em áreas híidas submetidas à biopsia cutânea. As alterações histopatológicas dos nove animais positivos na reação de imunistoquímica encontram-se dispostas no quadro 1.

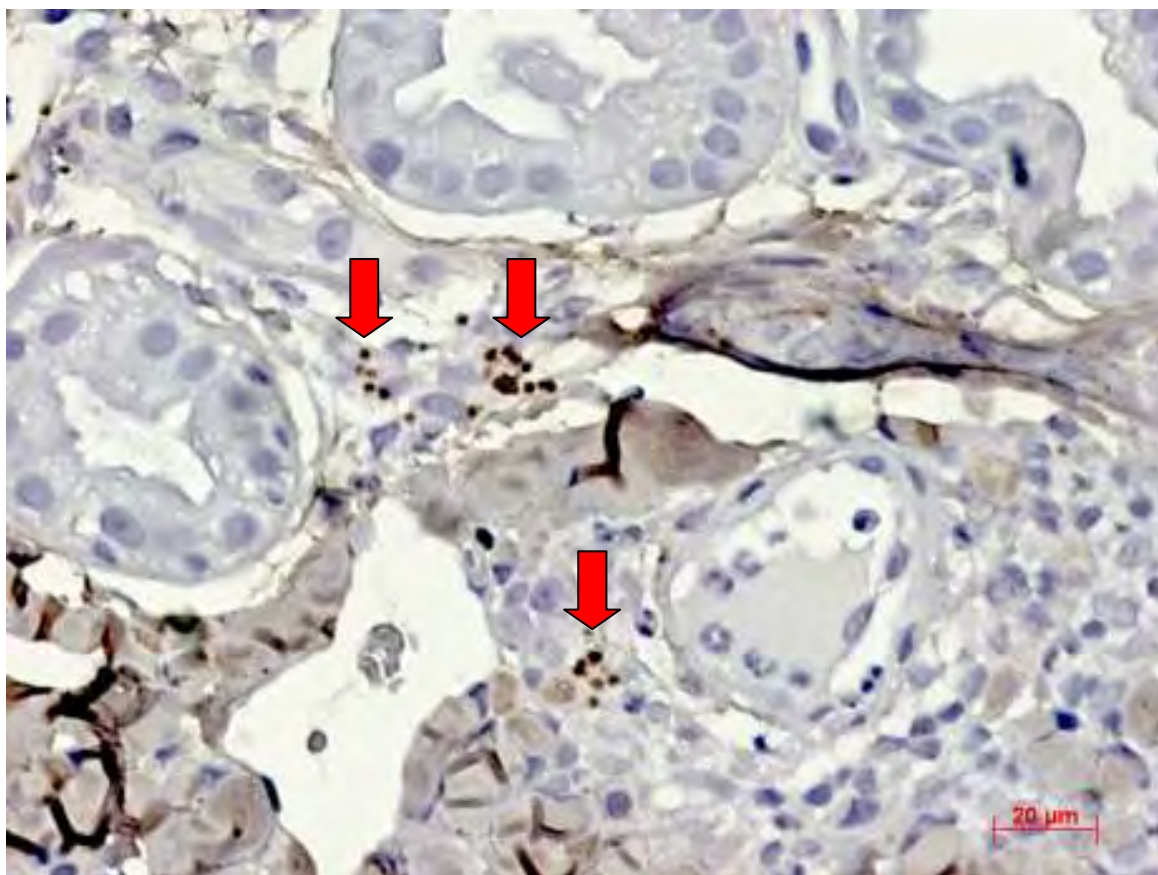


Figura 10 – Fotomicrografia de lesão cutânea localizada na extremidade de pavilhão auricular de um gato acometido por leishmaniose visceral. Verificar presença de formas amastigotas do parasito na reação de imunistoquímica. 40x (Araçatuba-SP, 2010)

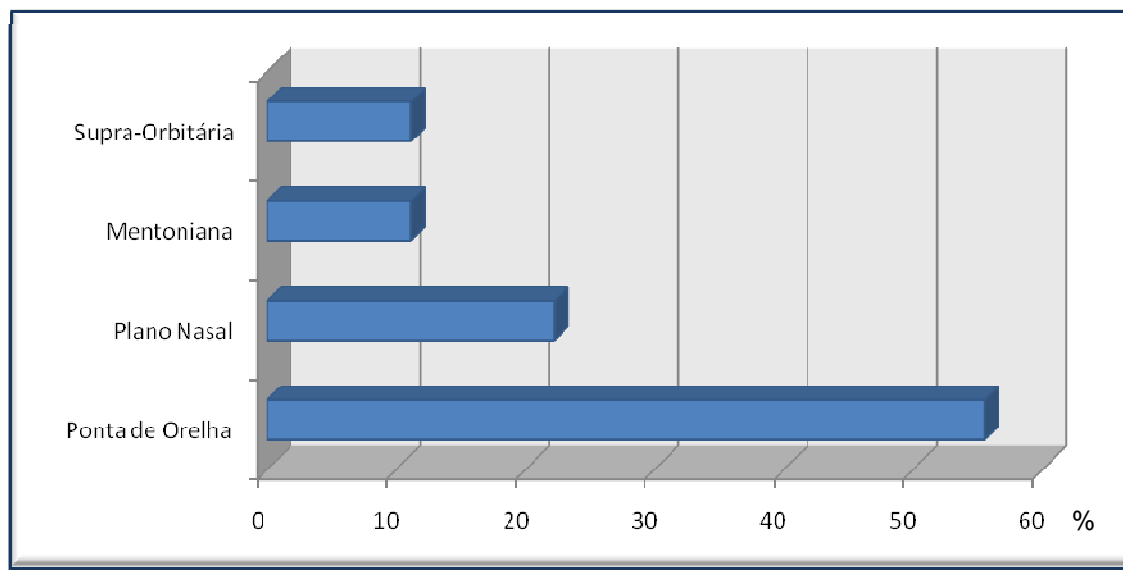


Figura 11 – Distribuição, em porcentagem, segundo a localização, de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*, por meio da reação de imunoistoquímica, de nove gatos com dermatopatias do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Quadro 1 – Descrição dos achados histopatológicos de lesões cutâneas de nove gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com imunomarcagem para *Leishmania chagasi*, provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	Exame Histopatológico
2	Camada córnea contendo crostas serocelulares, com presença de queratina e infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, colônias bacterianas e ácaros da espécie <i>Notoedres cati</i> . Na epiderme observa-se acantose irregular e na derme nota-se a presença de infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, mastócitos e eosinófilos de localização perivascular.
3	Presença de extensas áreas de ulceração revestidas por crostas serocelulares densas com grande quantidade de neutrófilos, colônias bacterianas, queratina, hemácias livres, eosinófilos e presença de ácaros da espécie <i>Notoedres cati</i> . Abaixo evidencia-se a existência de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos. Também foi observada a presença de vasculite neutrofilica.
6	Epitélio de revestimento cutâneo com acantose irregular, áreas de espongiose e exocitose de neutrófilos e eosinófilos, com formação de micropústulas

continuação..

continuação...

6	eosinofílicas. Na derme observou-se um infiltrado inflamatório perivascular a intersticial composto por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos. Os folículos pilosos estavam em diferentes fases de maturação. Ainda na derme, foram identificados macrófagos contendo estruturas do parasito do gênero <i>Leishmania</i> .
8	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Na derme superficial observam-se áreas focais de fibrose.
15	Hiperqueratose ortoqueratótica e presença de ácaros da espécie <i>Notoedres cati</i> . Na derme evidenciam-se extensas áreas de fibrose em faixa superficial e profunda, com diminuição ou até mesmo ausência de anexos cutâneos, e discreta quantidade de fibrócitos maduros.
16	Presença de hiperqueratose ortoqueratótica. Na derme superficial foi evidenciada a existência de um infiltrado inflamatório perivascular a intersticial composto por neutrófilos, linfócitos, histiócitos, eosinófilos e plasmócitos e na derme profunda foi observada a presença de infiltrado inflamatório perivascular composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos.
18	Presença de extensas áreas de ulceração revestidas por crostas serocelulares densas com grande quantidade de neutrófilos, colônias bacterianas, queratina e material seroso. Abaixo desta foi observada uma proliferação celular epitelial, mal circunscrita, composta por lóbulos e ninhos de células escamosas, formando estruturas pseudoglandulares. Nestas pode-se observar citoplasmas de tamanho variados, arredondados a ovalados, hiper Cromáticos e com nucléolos evidentes. Ainda neste local, foi identificada a presença de um infiltrado inflamatório intersticial composto por linfócitos, mastócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos. Quadro histopatológico compatível com carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado.
24	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Evidenciou-se a presença de mastócitos e linfócitos em região perivascular da derme.
25	Epiderme com área focal de exocitose de linfócitos.

Tabela 4 – Resultados do exame parasitológico direto de órgãos linfóides (linfonodos poplíteos – LP, medula óssea – MO, baço – B e fígado – F), exame histopatológico corado por hematoxilina e eosina (HE) e imunistoquímica (IHQ) de lesões cutâneas, sorologia por ELISA indireto e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral e pesquisa de anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) em 27 gatos com dermatopatias acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	EXAME PARASITOLÓGICO	ELISA	RIFI	HE	IHQ	FIV
1	+MO	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	-
3	+MO/ +B/ +F	-	-	-	+	-
4	-	+	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-	-
6	+LP/ +F	+	+	+	+	+
7	-	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	+	-
9	-	+	-	-	-	-
10	+MO/ +B	-	-	-	-	-
11	+MO/ +B	+	-	-	-	-
12	+LP/ +B	-	-	-	-	-
13	+MO	-	+	-	-	-
14	-	+	-	-	-	-
15	-	+	-	-	+	-
16	-	-	-	-	+	-
17	+MO	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	+	-
19	+MO	-	-	-	-	-
20	+LP	-	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-	-
22	-	+	-	-	-	+
23	-	+	-	-	-	+
24	-	-	-	-	+	-
25	-	+	+	-	+	+
26	-	+	+	-	-	-
27	-	+	-	-	-	-

4.6 Exame Parasitológico de Raspado Cutâneo

Em todos os animais foram realizados dois a três raspados cutâneos, para pesquisa de ectoparasitos, nas áreas com dermatopatias. Em 11 dos 55 gatos foram encontrados ácaros da espécie *Notoedres cati* em, pelo menos, um dos raspados, diagnosticando-se assim a presença de sarna notoédrica em 20% dos animais estudados. Dos animais positivos para leishmaniose visceral em apenas dois (18,2%) foi detectada a presença do ácaro (Figura 12).

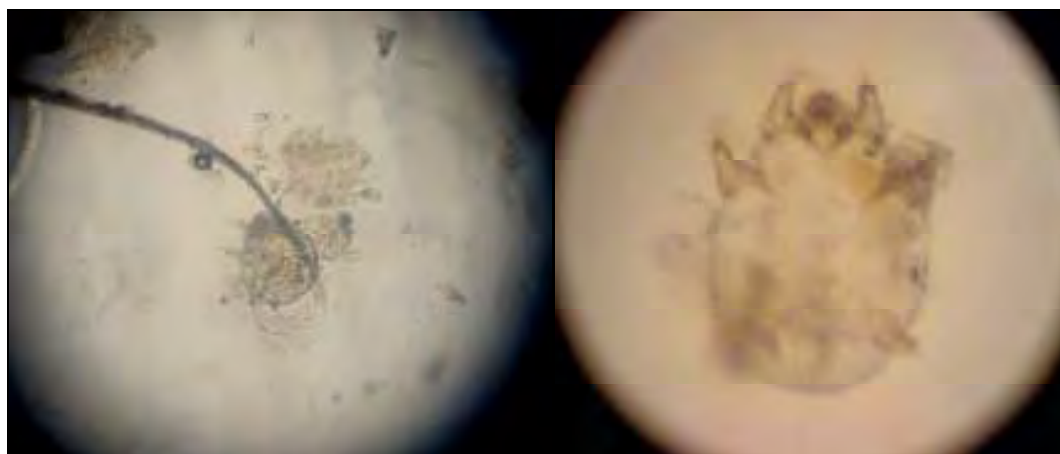


Figura 12 – Fotomicrografia de raspado cutâneo de um gato acometido por leishmaniose visceral. Verificar a presença de ácaro da espécie *Notoedres cati*. KOH 10%, 10x (Araçatuba-SP, 2010)

4.7. Cultivo microbiano das áreas com lesões cutâneas

4.7.1 Cultivo Bacteriano

Trinta e nove (70,9%) dos 55 gatos avaliados apresentaram crescimento de colônias no cultivo bacteriano de suas amostras em Ágar Sangue. No tocante à essas 40 amostras, isolou-se a presença de *Staphylococcus* spp. em 32 (80%) (Figura 13), seguido de *Streptococcus* spp. em sete (17,5%) e, por fim, *Pseudomonas* spp. e *Actinomyces* spp. (Figura 14) em uma (2,5%)

amostra cada. Em relação aos 27 animais positivos para leishmaniose visceral por meio dos métodos sorológicos e/ou parasitológicos, o cultivo bacteriano resultou na presença de *Staphylococcus* spp. em 13 (48,1%) amostras, *Streptococcus* spp. em cinco (18,5%) e *Pseudomonas* spp. em uma (3,7%) (Figura 15). Não foi observado crescimento de colônias em nenhuma das alíquotas semeadas em Ágar MacConkey, um dos meios selecionados para o cultivo bacteriano.

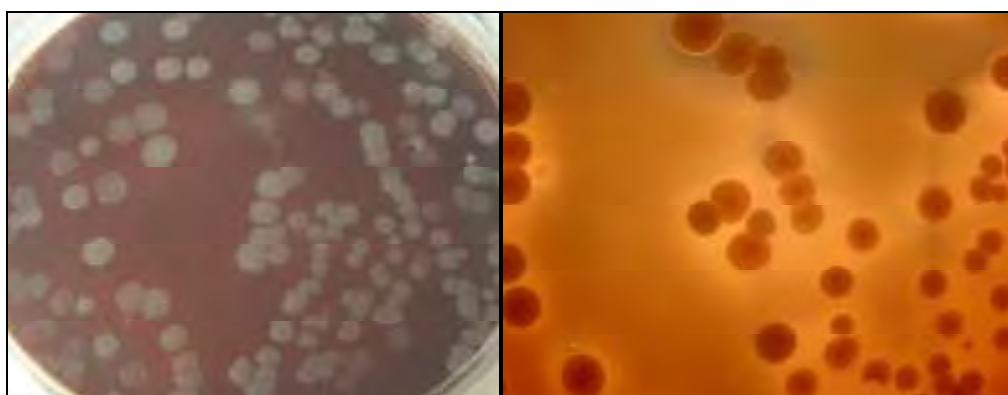


Figura 13 – Cultivo bacteriano, em Ágar Sangue, de amostras de áreas com lesões cutâneas de gatos. Verificar a presença de crescimento puro e exuberante de colônias de *Staphylococcus* spp. β -hemolíticos. (Araçatuba-SP, 2010)

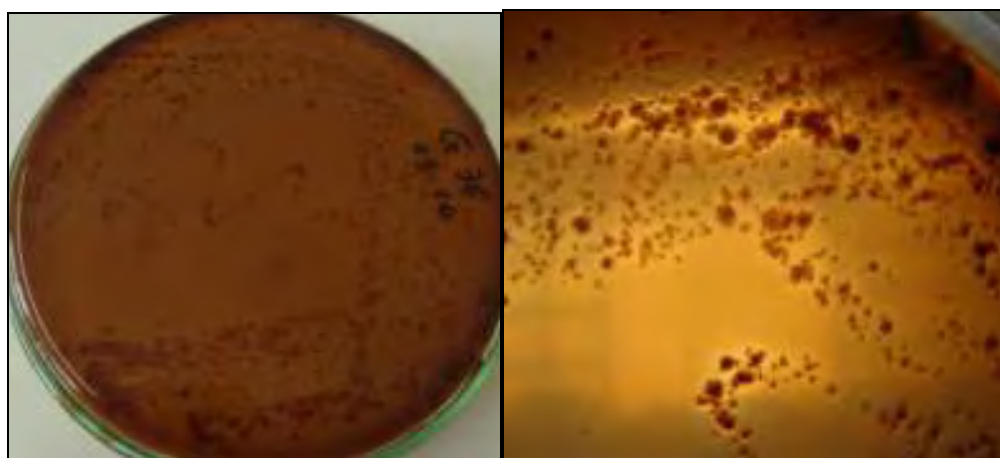


Figura 14 – Cultivo bacteriano, em Ágar Sangue, de amostra de área com lesão cutânea de um gato. Verificar a presença de numerosas colônias de *Actinomyces* spp. (Araçatuba-SP, 2010)

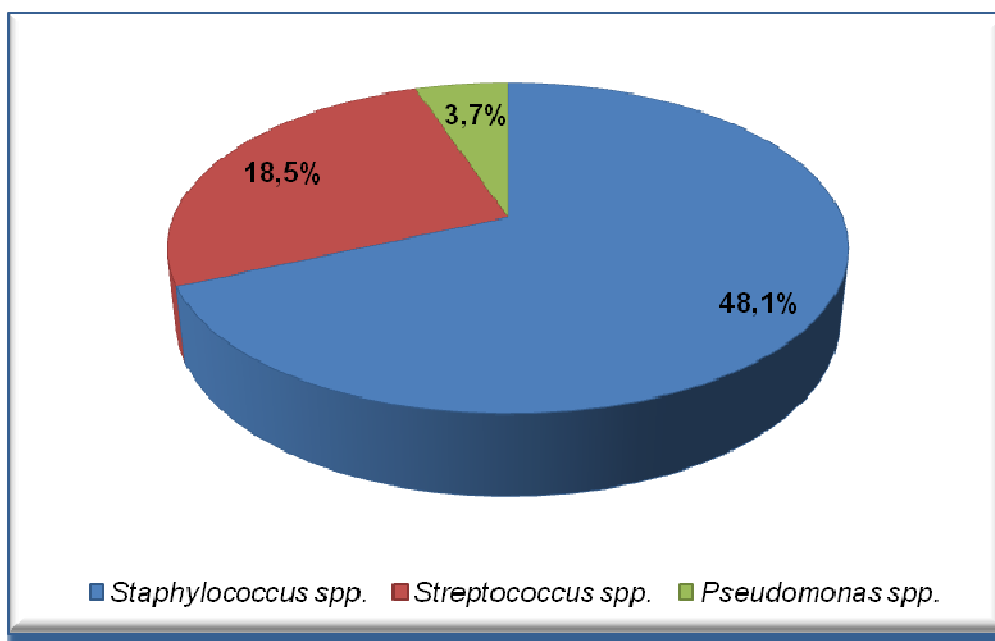


Figura 15 – Resultados do crescimento de colônias bacterianas, em Ágar Sangue, de amostras de lesões cutâneas de 27 gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)

4.7.2 Cultivo Fúngico

De um total de 55 gatos com dermatopatias observou-se o crescimento de colônias fúngicas em 49 (89,1%) amostras. Foram identificados como possíveis agentes etiológicos envolvidos nas lesões cutâneas o *Microsporum* spp. em 26 (53,1%) amostras, seguido do isolamento de *Trichophyton* spp. em 25 (51%), *Aspergillus* spp. em 18 (36,7%) e *Candida* spp. em 15 (30,6%) animais. No que diz respeito aos 27 gatos com leishmaniose visceral, em 18 (66,7%) verificou-se crescimento de colônias de *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp. (Figura 16), seguido pela presença de *Aspergillus* spp. (Figura 17) em 12 (44,4%) e *Candida* spp. (Figura 18) em seis (22,2%) amostras (Figura 19).

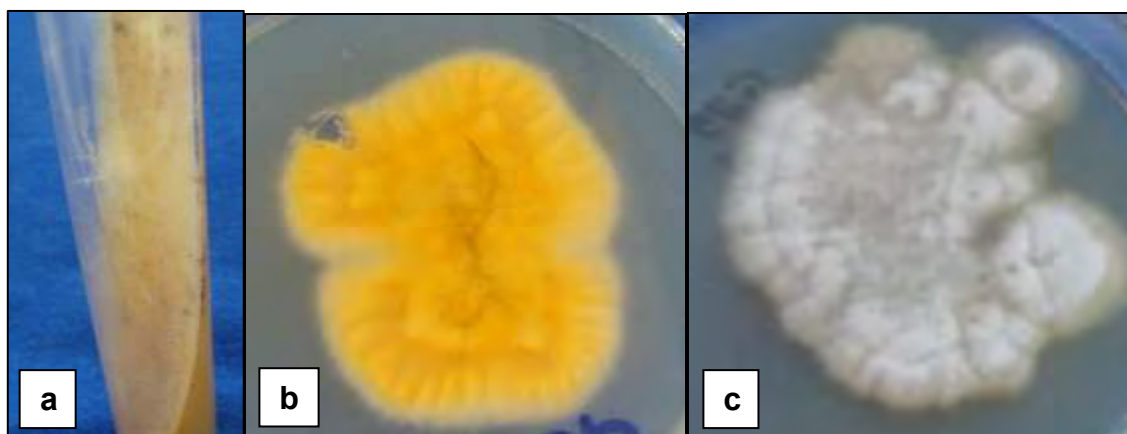


Figura 16 – Crescimento de *Trichophyton* spp. em Ágar Sabouraud Dextrose 4% (a); crescimento de colônia de *Microsporium canis* no meio de Ágar Mycosel (b e c). Amostras obtidas de lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)

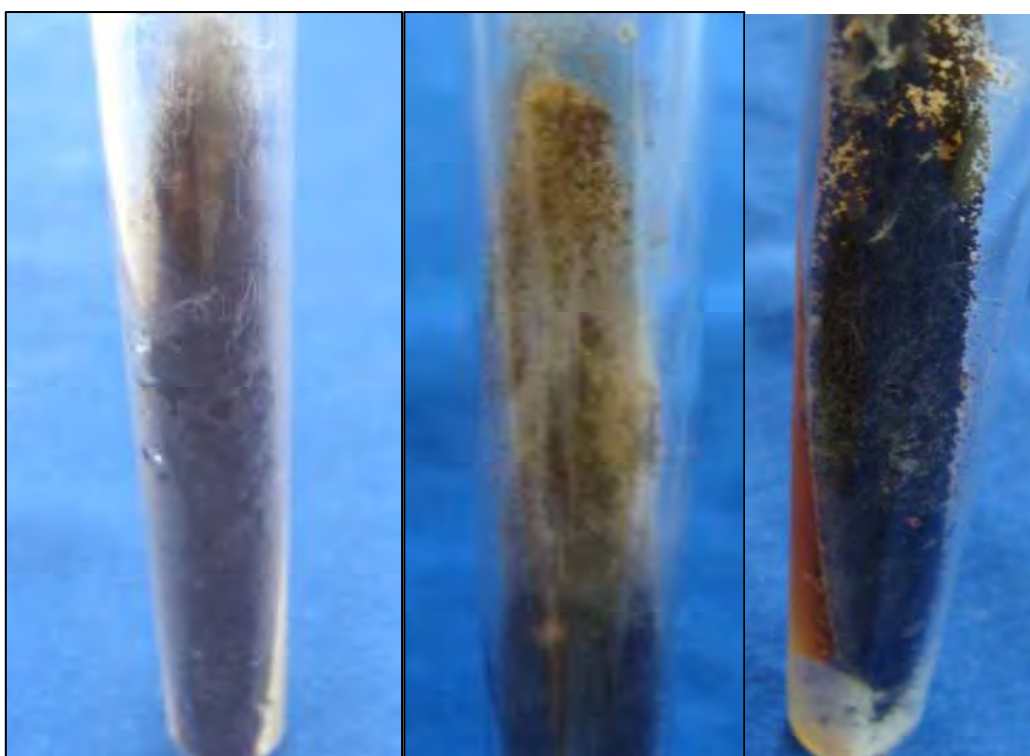


Figura 17 – Crescimento de colônias de *Aspergillus* spp. em Ágar Sabouraud Dextrose 4%. Amostras obtidas de lesões cutâneas de gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)



Figura 18 – Crescimento de colônia de *Candida* spp. em Ágar Mycosel. Amostra obtida de lesão cutânea de gato naturalmente acometido por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)

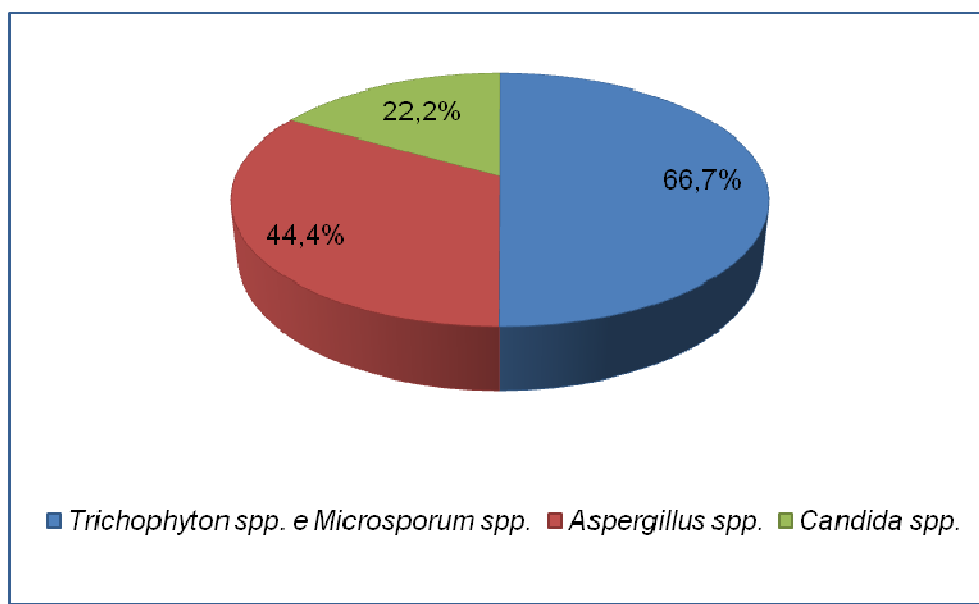


Figura 19 – Resultados do crescimento de colônias fúngicas, em Ágar Mycosel e Ágar Sabouraud Dextrose 4%, de amostras de lesões cutâneas de 27 gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2010)

4.8 Reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real

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

5. DISCUSSÃO

A escolha por utilizar gatos com dermatopatias foi baseada em estudos pretéritos que descreveram o quadro clínico de felinos acometidos por leishmaniose visceral, ressaltando o envolvimento cutâneo como uma das principais alterações clínicas e, também, por ser este o sinal clínico mais frequentemente observado na leishmaniose visceral canina. Apesar de trinta e dois gatos (58,2%) serem provenientes de apenas duas residências, cabe ressaltar que estas serviam como abrigos de animais, portanto, os gatos tinham diversas procedências por terem sido recolhidos da rua ou abandonados na porta dessas propriedades. Nestas, os animais não só conviviam com cerca de 200 gatos, como também com cães, galinhas e outras aves domésticas o que, segundo Alexander et al. (2002), pode favorecer à atração dos flebotomíneos. Do total de animais avaliados houve um predomínio de machos (63,6%) em relação às fêmeas (36,4%) e, a idade média foi de três anos e seis meses. Quanto à raça, seis (10,9%) eram da raça siamês e 49 (89,1%) não possuíam raça definida, distribuição esta já esperada ao se estudar, na grande maioria, animais acolhidos em abrigos.

A prevalência de infecção na população ora estudada foi de 49,1% (27/55 gatos), superior à relatada por Vita et al. (2005) e Solano-Gallego et al. (2007), cujas prevalências foram 16,3% e 6,29%, respectivamente. No entanto foi inferior à taxa de 60% observada por Martín-Sánchez et al. (2007), em um estudo conduzido em gatos encaminhados às clínicas veterinárias no sudeste da Espanha. Ao confrontarmos os resultados do presente estudo com os de Rossi (2007), Costa (2008) e Neto et al. (2008), todos realizados também no município de Araçatuba, pode-se observar que os valores são bastante superiores aos encontrados pelos referidos autores, quais sejam, 3%, 11,5% e 28,7%, respectivamente. Houve um predomínio de machos (59,3%) acometidos em relação às fêmeas (40,7%), relação esta inversa à relatada por Nasereddin et al. (2008).

Dentre os 27 gatos com quadro dermatológico positivos para leishmaniose visceral, observou-se que 19 também apresentavam acometimento sistêmico, sendo a desidratação e a linfadenomegalia, presentes em dez animais, as alterações mais evidenciadas, seguidas em ordem decrescente de ocorrência, por emaciação em sete (Figura 3), diarreia em quatro, secreção ocular em três, depressão em três, úlcera em cavidade oral em dois, secreção nasal em um, opacidade de córnea em um e hiperplasia de glândula ad-anal em um gato. Achados semelhantes foram relatados por Poli et al. (2002) que diagnosticaram a enfermidade em um gato de seis anos de idade com quadro clínico de emaciação, linfadenomegalia, estomatite, letargia e presença de nódulo ulcerado em pálpebra. Ainda em relação aos sinais observados, Vita et al. (2005) encontraram em 33 gatos acometidos pela doença a presença de desidratação, linfadenomegalia, secreção ocular, emagrecimento, depressão, secreção nasal e diarreia, no entanto, também relataram a presença de hipertermia, anorexia, êmese, otite, distensão abdominal e mucosas congestas ou pálidas, sintomas estes não identificados nos animais do presente estudo.

As alterações do sistema tegumentar constituíram-se em ampla variedade de manifestações tais como: rarefação pilosa, alopecia, presença de crostas melicéricas e/ou hemorrágicas, áreas de ulceração profunda, eritema, hiperpigmentação, hiperqueratose, lignificação, descamação furfurácea, colarinhos epidérmicos e, por fim, presença de comedos. Tais achados corroboram, em parte, os relatos de Hervás et al. (1999) e Pennisi et al. (2004), os quais descreveram, dentre as alterações dermatológicas observadas em gatos com leishmaniose visceral, a ocorrência de rarefação pilosa, alopecia, ulcerações profundas, eritema e descamação cutânea, à semelhança do que se observa em cães infectados por *Leishmania chagasi*. No que tange à frequência de ocorrência das referidas lesões cutâneas, verificou-se um predomínio de rarefação pilosa e alopecia, seguido de deposição de crostas melicéricas e hemorrágicas e, de ulcerações profundas, concordando com os

relatos de Feitosa et al. (2000), os quais observaram em cães uma maior ocorrência de alopecia, lesões ulcerativas, prurido e dermatite seborreica.

Embora haja a descrição na literatura de gatos acometidos por leishmaniose visceral, alguns achados de exame dermatológico dos animais do presente estudo não haviam sido relatados por outros autores. Entre eles destacam-se a presença de crostas, tanto hemorrágicas quanto melicéricas, indicativas de um processo exsudativo composto por queratina, debris celulares e microorganismos. A hiperqueratose, presente em quase todas as dermatoses crônicas, decorrente de um aumento na espessura do estrato córneo, foi também verificada nos gatos ora estudados, sem relatos pretéritos na literatura indexada. Esta, muitas vezes, se fez acompanhada de lignificação, geralmente resultante de constante fricção da área de pele lesada como descrito por Scott et al. (2001). Por sua vez, a identificação de colarinhos epidérmicos também não deve ser atribuída especificamente à leishmaniose visceral, uma vez que estes podem ser vistos em processos neoplásicos, granulomatosos e dermatoses supurativas. Alterações dermatológicas inespecíficas semelhantes às citadas anteriormente também foram descritas por Genaro (1993), Noli (1999) e Feitosa et al (2000) quando da avaliação de cães.

Ainda em relação aos quadros clínicos dermatológicos, é importante enfatizar o fato de que alguns animais possuíam apenas áreas eritematosas com rarefação pilosa ou com deposição de crostas, sem a presença de nódulos ou de áreas ulceradas, divergindo de Poli et al. (2002) que relataram estes dois últimos como sendo os sinais mais evidentes na leishmaniose visceral felina.

Quanto à distribuição topográfica lesional pôde-se verificar um maior acometimento de região cefálica (55,5%) seguida dos membros (22,2%), da região dorsal (22,2%), cauda (11,1%) e abdomen (11,1%), corroborando com as afirmações de Simões-Mattos et al. (2004). Em relação à região cefálica, no presente estudo, os pavilhões auriculares foram os mais comprometidos (60%), seguido de várias áreas da cabeça (20%) e do espelho nasal (20%), observações estas divergentes das citadas por Simões-Mattos et al. (2004) que

descreveram uma maior frequência de lesões em áreas do plano nasal e, posteriormente, nos pavilhões auriculares e na região periocular.

O exame parasitológico direto de linfonodo, medula óssea, baço e fígado é um dos métodos tradicionais e, supostamente, mais simples dentre os empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral. Dez animais (18,2%) foram positivos a partir de material colhido por biopsia aspirativa destes órgãos, concordando com Ozon et al. (1998), Pennisi et al. (2004), Rossi (2007), Costa (2008), Hatam et al. (2009) e Marcos et al. (2009), que também descreveram gatos positivos para a enfermidade através de punção de órgãos linfóides. É imprescindível destacar que este método é dependente do grau de parasitismo apresentado, do treinamento daquele que avalia a citologia e, ainda, da eventual interposição de tratamentos realizados por anti-fúngicos ou anti-parasitários, por exemplo. Portanto, apesar de se tratar de uma técnica 100% específica, sua sensibilidade pode ser baixa, na dependência destes fatores (WOLSCHRIJN et al., 1996).

Dos dez gatos em que se observaram amastigotas de leishmanias por punção biopsia aspirativa de órgãos linfóides, cinco (50%) foram exclusivamente positivos por este método e, os outros cinco (50%) também foram soropositivos ou apresentaram formas amastigotas do parasito na pele por meio da reação de imunoistoquímica. Ainda em relação aos dez animais positivos, em sete as formas amastigotas foram identificadas na medula óssea, em quatro no baço, em três nos linfonodos poplíteos e em dois no fígado (Tabela 3). Em alguns animais foi possível observar a presença do parasito em mais de um órgão linfóide, sendo encontrado em um animal na medula óssea, baço e no fígado, em dois animais no linfonodo e no fígado e, em outros dois gatos, na medula óssea e no baço. A maior facilidade de observação de formas amastigotas na medula óssea verificada no presente estudo, concorda com os relatos de Ozon et al. (1998), Leiva et al. (2005) e Marcos et al. (2009) que realizaram o diagnóstico parasitológico de gatos com leishmaniose visceral por meio da punção de medula óssea. No entanto, punções de linfonodo, baço e fígado também podem ser utilizadas como uma opção para o diagnóstico

parasitológico, como demonstrado no presente estudo e também nos relatos de Costa Durão et al. (1994) e Pennisi et al. (2004), que identificaram o parasito nos linfonodos de cinco animais, e de Hatam et al. (2009) que encontraram as formas amastigotas no baço e no fígado de quatro animais. Confrontando-se os resultados do presente estudo com aqueles obtidos por Rossi (2007) verifica-se que o órgão linfóide em que o autor mais evidenciou o parasito foi o linfonodo, seguido da medula óssea, divergindo da proporção vista no presente ensaio.

O teste de ELISA indireto identificou 14 (25,5%) animais sororeagentes, corroborando com os achados de Neto et al. (2008) que, avaliando 108 gatos do mesmo município, identificaram 28,7% de positividade. Entretanto, a proporção de animais sororeagentes foi superior às observadas por Rossi (2007), que obteve 3% de sororeatividade utilizando ELISA indireto com proteína A como anticorpo conjugado e, de Costa (2008) que avaliando amostras séricas por ELISA indireto, com proteína A e com IgG, verificou taxas de prevalência equivalentes a 4,5% e 11,5%, respectivamente. A discrepância entre os resultados do presente ensaio e aqueles obtidos por esses dois autores poderia ser devida à diferenças nas técnicas de realização do ELISA. Rossi (2007) utilizou os soros a serem testados em uma concentração de 1:50, diluição esta quatro vezes inferior à empregada neste trabalho, e o anticorpo conjugado na proporção de 1:100, valor este 800 vezes inferior. Desta forma, correlacionando a metodologia do presente estudo com a dos referidos autores, conclui-se que as diluições utilizadas por eles são menores, evidenciando soros e proteína A altamente concentrados. Mesmo assim, as taxas de prevalência foram inferiores às do atual ensaio que, por ter utilizado gatos com dermatopatias, pode ter favorecido uma elevação na prevalência da infecção. Quando da utilização de IgG como anticorpo conjugado, Costa (2008) concentrou o antígeno, e diluiu os soros a serem testados oito vezes mais que na metodologia utilizando proteína A, encontrando 11,5% de soropositividade na mesma população. Apesar dos resultados de Costa com o uso de IgG (11,5%) terem sido superiores aos observados com proteína A (4,5%), cabe ressaltar

que o autor utilizou como cromógeno para a leitura da reação, no primeiro caso, a tetrametilbenzidina (TMB) que sabidamente é mais sensível que a ortofenilenediamina (OPD), utilizada no segundo ensaio. Controvérsias quanto à metodologia do ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral felina são evidentes na literatura. As concentrações dos soros variam, quanto à diluição, de 1:40 a 1:400 e, da proteína A de 1:100 à 1:8.000 (ROSSI, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; COSTA, 2008; FIGUEIREDO et al., 2009). Além disso, alguns estudos não descrevem a metodologia empregada. Desta forma, justifica-se, em parte, a existência de valores de prevalência tão discrepantes.

A escolha da proteína A marcada com peroxidase para o diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral felina baseou-se em estudo pretérito de Costa (2008), que comparava a sensibilidade e a especificidade da proteína A e do IgG, obtendo como resultado uma maior especificidade quando da utilização da proteína A. Antes de se optar pela concentração de 1:80.000, indicada na bula como sendo a mínima a ser utilizada, foram realizados ensaios prévios nas diluições de 1:80.000, 1:100.000, 1:120.000, 1:160.000 e 1:200.000. Optou-se por utilizar a menor diluição, por ser esta a que melhor diferenciou os soropositivos dos soronegativos, e também por ser a que apresentou reprodutibilidade.

A concordância entre o método parasitológico, considerado como teste ouro para o diagnóstico de leishmaniose visceral no presente estudo, e o ensaio imunoenzimático foi considerada ruim ($k = -0,006$), corroborando os resultados de Rossi et al. (2007). Esta fraca concordância torna-se compreensível, por terem sido identificados sete animais positivos exclusivamente por meio da técnica de ELISA indireto e, por apenas quatro dos 14 animais positivos por ELISA terem o diagnóstico parasitológico confirmado.

No presente estudo, a reação de imunofluorescência indireta resultou em seis (10,9%) animais positivos, sendo que em três (50%) foram identificadas também formas amastigotas do parasito em órgãos linfóides ou na pele. Comparando-se com os resultados do teste de ELISA, cinco (83,3%) dos seis animais foram soropositivos por ambos os métodos. O ponto de corte

utilizado para identificar animais positivos foi de 1:40, uma vez que amostras séricas de gatos sabidamente negativos foram reagentes em uma diluição de 1:20, concordando com Silva et al. (2008) que também utilizaram o mesmo ponto de corte da reação. Dos seis gatos sororeagentes, cinco (83,3%) possuíam títulos equivalentes a 1:40 e apenas um (animal 6) possuía título de 1:80, resultados esses discordantes de Mancianti et al. (2004), Vita et al. (2005) e Silva et al. (2008) que encontraram títulos de até 1:320 em gatos naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Ainda, é possível encontrar trabalhos que utilizaram um ponto de corte muito inferior ao do presente estudo, como os de Maia et al. (2008) e Martín-Sánchez et al. (2007) que consideraram positivas as amostras diluídas nas proporções de 1:2 a 1:16, títulos esses que podem ser reativos devido à existência de anticorpos basais, e não necessariamente pela presença da infecção. Já Hérvas et al. (1999), em um estudo conduzido na Espanha, concluíram que deve-se considerar positivas as amostras reagentes na concentração maior ou igual a 1:80. Neste contexto, observa-se a dificuldade na determinação da soropositividade desta reação, tanto pela escolha do ponto de corte como pelo tipo de anticorpo utilizado. A concordância deste teste com os exames parasitológicos, no presente estudo, foi considerada fraca ($kappa = 0,1356$), semelhante ao descrito por Rossi (2007).

A resposta imunológica do gato frente à esta enfermidade parece ser diferente daquela desenvolvida nos cães. Enquanto estes últimos apresentam predominantemente uma resposta humoral, Solano-Gallego et al. (2007) sugeriram que a resposta dos felinos seja predominantemente celular explicando, desta forma, a presença de um maior número de animais assintomáticos em relação aos que desenvolvem quadro clínico dentro de uma população. De acordo com os autores, a resposta imune celular dessa espécie é efetiva o suficiente para controlar a infecção e conferir certo grau de resistência natural, exceto em casos em que ocorrem eventos imunossupressores, tais como infecções por retrovírus, que levariam a uma disseminação e visceralização do parasito. No presente estudo, de um total de

27 gatos infectados, somente seis (22,2%) tinham anticorpos anti-vírus da imunodeficiência felina (FIV) e, destes, em três foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania chagasi*. Em relação a estes seis animais positivos para FIV, uma atenção especial deve ser dada ao animal de número 6. Tratava-se de uma fêmea, sem raça definida, de aproximadamente oito anos de idade, que obteve resultado positivo para leishmaniose visceral em todos os métodos de diagnóstico empregados. Na reação de ELISA apresentou o maior título de anticorpos (DO média: 1,631) e, na RIFI, foi a única amostra positiva na diluição de 1:80. Neste animal, o parasito foi identificado no linfonodo, no fígado, e também na pele, tanto por meio do exame histopatológico como por reação de imunistoquímica. A presença da co-infecção com o vírus da imunodeficiência felina poderia explicar a maior resposta imune humoral com queda da imunidade celular e, conseqüente disseminação do parasito para vários órgãos, conforme citação de Solano-Gallego et al. (2007). No entanto, vale lembrar que 14 gatos foram positivos por meio de exame parasitológico e 11 por meio de exames sorológicos e em nenhum foi identificada a presença de co-infecção por esta enfermidade.

Os padrões histopatológicos das lesões cutâneas dos 27 animais positivos para leishmaniose visceral foram bem variados, evidenciando-se principalmente dermatite perivascular a intersticial, áreas de fibrose dérmica e presença de infiltrados inflamatórios. Tais achados podem ser decorrentes da própria doença ou de co-morbidades como, por exemplo, ocorrência de dermatofitose (18/27), aspergilose (12/27), candidíase (6/27), sarna notoédrica (4/27) e carcinoma espinocelular (3/27).

Ao analisarmos as alterações histopatológicas dos nove gatos em que se verificaram formas amastigotas nas lesões cutâneas, a observação mais frequente foi a presença de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos na derme de quatro (44,4%) animais. A presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos é, de acordo com Ferrer et al (1988) e Lorangeira (2008), um achado comum na leishmaniose visceral canina. A existência de eosinófilos e neutrófilos é comum

nas dermatoses perivasculares, reações predominantemente inflamatórias de vasos sanguíneos da derme superficial ou profunda, geralmente desencadeadas por reações de hipersensibilidade, ectoparasitismo, dermatofitose, deficiência nutricional ou desordens de queratinização. No entanto, a presença de mastócitos nestes infiltrados não foi relatada previamente em casos de leishmaniose visceral canina, tendo sido descrita também por Ozon et al. (1998) em lesão de pele de um felino com leishmaniose visceral, mas não evidenciada por Poli et al. (2002) em um gato com dermatite piogranulomatosa por leishmaniose visceral. A presença destas células é um achado comum em gatos com dermatoses inflamatórias, desordens de caráter alérgico ou de origem imunomediada, conforme salientado por Scott et al. (2001).

Outras alterações observadas em dois gatos cada (22,2%) foram a existência de acantose epidérmica irregular, caracterizando uma hipertrofia difusa da camada de células granulosas; a presença de áreas de fibrose dérmica, visualizadas nos estágios de resolução de processos inflamatórios consequente à destruição do colágeno; e hiperqueratose ortoqueratótica, uma hipertrofia da camada córnea da pele encontrada comumente nas dermatoses crônicas, observada também por Ozon et al. (1998) em um felino com leishmaniose visceral. Dois animais tiveram as biopsias cutâneas realizadas em áreas ulceradas e, em um gato evidenciou-se exocitose de neutrófilos e eosinófilos com formação de micropústulas, além de espongiose, caracterizando um edema intercelular na epiderme, fato também notificado por Ozon et al. (1998).

A reação de imunoistoquímica dos gatos com dermatopatias elevou a sensibilidade à busca de formas amastigotas de *Leishmania chagasi*. Nove animais foram positivos por meio desta técnica e, em sete, foi o único método parasitológico positivo para detecção da enfermidade, confirmando as descrições de Ferrer et al. (1988) e de Bourdoiseau et al. (1997), os quais concluíram que o uso deste exame pode aumentar a possibilidade do encontro do parasito quando o número destes é baixo nos tecidos avaliados. Diversas

áreas, lesionadas ou não, foram avaliadas por este método; no entanto, só foi possível identificar o parasito nas áreas lesionadas, divergindo de Gonçalves (2004), que estudando cães sintomáticos com leishmaniose visceral identificou, na mesma proporção, o parasito na pele lesionada e sadia e, ainda, em cães sem alterações dermatológicas ou assintomáticos, observou a presença de formas amastigotas em 40% e 30%, respectivamente, independente da área estudada. Optou-se por biopsiar a região mentoniana, supra-orbitária, plano nasal e ponta de orelha por serem áreas com baixa densidade de pêlos, facilitando, portanto, o repasto sanguíneo de flebotomíneos.

O objetivo de realizar cultivo bacteriano e micológico de material obtido nas lesões dos animais estudados, foi o de tentar identificar se as lesões eram decorrentes de leishmaniose visceral ou devidas à coinfeções por outros agentes infecciosos. É grande o número de animais encaminhados a clínicas veterinárias com problemas dermatológicos, principalmente casos de dermatofitose felina, conforme relatado por Scott et al. (2001). Nesse contexto, é importante avaliar se existe associação entre diferentes quadros mórbidos, uma vez que o diagnóstico de uma dermatofitose ou de uma piodermite em gatos provenientes de áreas endêmicas para leishmaniose visceral, pode mascarar uma infecção por *Leishmania* sp.

Das 55 amostras analisadas foi observado em 39 (70,9%) o crescimento de colônias no cultivo bacteriano em Ágar Sangue. O gênero com maior frequência de isolamento foi o *Staphylococcus* spp. com um percentual de 80% das amostras, seguido do isolamento de *Streptococcus* spp. em 17,5% e *Pseudomonas* ssp. em 2,5%, concordando com as observações de Cavalcanti et al. (2004) quando da avaliação de cães com dermatopatias e leishmaniose visceral. Ressalta-se que a microflora normal da pele por ser composta por bactérias que vivem em simbiose, contribuam para a imunidade cutânea, sendo classificadas como residentes ou transitórias, dependendo da sua capacidade de se multiplicar neste habitat. Enquanto as residentes são organismos normalmente inofensivos e que se auto-restabelecem quando removidos. As transitórias não se multiplicam na pele, a menos que se tornem envolvidas em

um processo patológico como invasores secundários. A microflora pode ser alterada por diversos fatores tais como o pH, a umidade e os níveis de albumina e ácidos graxos da pele. Como exemplo de bactérias residentes pode-se citar, na espécie felina, os *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, *Micrococcus* spp. e *Acinetobacter* spp.. Já os *Streptococcus* β -hemolíticos, *E. coli*, *Pseudomonas* spp. e alguns *Staphylococcus* spp. são consideradas bactérias transitórias (SCOTT et al., 2001).

As bactérias isoladas nos gatos do presente estudo eram na sua grande maioria bactérias residentes (*Staphylococcus* spp.). Segundo Scott et al. (2001) quando colônias de *Staphylococcus* spp. são isoladas de lesões dermatológicas de gatos deve-se considerar uma anormalidade cutânea, metabólica ou imunológica subjacente. Infecções bacterianas secundárias são muito comuns nesses casos e podem envolver vários microorganismos, respondendo mal à antibioticoterapia caso a desordem de base não seja tratada. A taxa de crescimento bacteriano verificada nos animais ora avaliados foi superior à relatada por Scott et al. (2001), os quais descrevem a ocorrência de 50% de negatividade em culturas bacterianas da pele de felinos.

Vinte e sete gatos foram positivos para leishmaniose, sendo 12 (44,4%) parasitologicamente positivos, dez (37,1%) sororeagentes e cinco (18,5%) por ambos os métodos. Dos 12 animais parasitologicamente positivos isolou-se em quatro (33,3%) colônias de *Staphylococcus* spp. e em três (25%) identificou-se *Streptococcus* spp. Quando da avaliação dos dez animais sororeagentes, observou-se o crescimento de *Staphylococcus* spp. em sete (70%) amostras e de, *Streptococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. em uma (10%) de cada amostra. Já nos cinco animais parasitologicamente positivos e sororeagentes identificou-se em dois (40%) animais, colônias de *Staphylococcus* spp. e em um (20%) de *Streptococcus* spp.

Das 55 amostras de lesões de pele analisadas foi observado o crescimento de colônias fúngicas em 49 (89,1%). Os fungos são microorganismos onipresentes no ambiente, podendo ser encontrados na pele e nos pêlos sadios de felinos, sendo o número de colônias isoladas um fator a

ser considerado na decisão de identificar um agente contaminante ou patogênico. Das milhares de espécies de fungo, apenas algumas tem a capacidade de provocar doenças nos animais (FERREIRA et al., 2007). Em aproximadamente 50% das amostras foram identificadas colônias de *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp., agentes estes causais da grande maioria das dermatofitoses. A incidência desta enfermidade varia, principalmente, de acordo com o clima e com o tipo de reservatório, sendo maior em climas quentes e úmidos. Do total de amostras com crescimento de *Microsporum* spp. e *Trichophyton* spp., somente um animal (número 8) apresentava lesões de pele caracterizada por área de alopecia numular, eritematosa, com um centímetro de diâmetro, em região de plano nasal, sugestiva de dermatofitose. Este animal também foi positivo para leishmaniose por meio da reação de imunoistoquímica na área de pele lesionada.

Na literatura compulsada há inúmeras tentativas de atestar que gatos são reservatórios de *Microsporum canis*, entretanto, esses resultados são conflitantes. Segundo Scott et al. (2001) as dermatofitoses dos cães e gatos constituem zoonoses de importância. O isolamento de *Microsporum canis* de gatos assintomáticos pode representar um estado de portador passivo de artrósporos e hifas nos pêlos, adquiridos diretamente de um gato infectado ou indiretamente de um ambiente contaminado. Como ocorre com muitas doenças infecciosas, deficiências na resposta imune, particularmente na imunidade celular, podem predispor ao aparecimento de infecções fúngicas da pele, como em casos de infecção pelo FIV e FeLV, conforme salientado por Scott et al. (2001). Dos 18 gatos positivos para leishmaniose e com isolamento de dermatófitos, quatro (22,2%) eram infectados pelo vírus da imunodeficiência felina (animais 6, 15, 22, 23). Cabe ressaltar que destes 18 gatos positivos para leishmaniose, oito (44,4%) foram apenas parasitologicamente positivos, seis (33,3%) foram sororeagentes e quatro (22,2%) foram positivos por ambos os métodos.

Dentre os gatos positivos para leishmaniose, identificou-se colônias de *Aspergillus* spp. em 44,4% (12) das amostras, corroborando com os resultados

descritos por Cavalcanti et al. (2004), quando da avaliação de seis cães com dermatopatias acometidos por leishmaniose visceral. No homem a aspergilose é apenas uma infecção oportunista associada a pacientes imunocomprometidos. Já em gatos a doença é considerada rara. O *Aspergillus fumigatus* é a espécie mais comumente encontrada nos animais com envolvimento primário do trato respiratório, embora outras espécies do gênero *Aspergillus* já foram isoladas, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. deflexus* e *A. terreus* (FERREIRA et al., 2007). A análise comparativa entre os resultados, do isolamento de *Aspergillus* spp. e do parasitológico para leishmaniose, observou-se em sete animais um estado de coinfeção (animais 1, 10, 12, 17, 18, 19, 24). Destes, vale salientar que as amostras foram colhidas de áreas ulceradas em quatro animais, de áreas com rarefação pilosa em dois e, em um gato de uma lesão característica de dermatite úmida aguda. Dentre os dez animais sororeagentes foi possível identificar a presença de *Aspergillus* spp. em três (animais 4, 22, 23), com o isolamento do agente em áreas com rarefação pilosa de dois gatos e, em área com hiperqueratose e lignificação de um animal. Em relação aos animais parasitologicamente positivos para leishmaniose e sororeagentes, foram isoladas colônias de *Aspergillus* spp. em duas (animais 11 e 13) amostras, sendo uma obtida de área ulcerada e outra de área com rarefação pilosa.

Nos resultados do presente estudo verificou-se que em doze animais foram isoladas colônias de *Candida* spp., com um total de seis animais positivos para leishmaniose. Estas seis amostras foram obtidas de animais parasitologicamente positivos para leishmaniose (3 gatos), de animais sororeagentes (2 gatos) e de animais positivos por ambos os métodos (1 gato). Em dois, destes seis animais, foi confirmada a presença de coinfeção pelo vírus da imunodeficiência felina. De acordo com Scott et al. (2001), a candidíase envolvendo a pele de gatos é extremamente rara, podendo, entretanto, aparecer em estados imunossupressores. Tal fato foi evidenciado no presente estudo, mas cabe ressaltar que em outros seis animais com

isolamento de *Candida* spp. nas áreas lesionadas, não foi identificada nenhuma das doença de base pesquisadas.

Os relatos à respeito de leishmaniose felina, em sua maioria, não identificaram a espécie envolvida nesta doença, acreditando tratar-se de leishmaniose visceral por serem diagnosticadas em áreas endêmicas para tal. Entretanto, às vezes, existe a dúvida em relação a uma possível infecção por parasitos causadores de leishmaniose tegumentar, particularmente quando da sobreposição de ambos agentes na mesma região geográfica.

O diagnóstico de leishmaniose visceral, tanto canina quanto felina, é desafiador, especialmente em áreas endêmicas, devido à diversidade de manifestações clínicas e à alta prevalência de animais assintomáticos, como salientado por Francino et al. (2006). Clínicos veterinários geralmente se confrontam em casos compatíveis com a doença mas, muitas vezes, com resultados diagnósticos contraditórios. Nestas situações, a utilização de uma ferramenta diagnóstica altamente sensível e específica como a PCR em tempo real, auxilia a confirmação do diagnóstico. No presente estudo, foi possível confirmar por meio de RT-PCR que se tratava de infecção natural por *Leishmania chagasi*.

6. CONCLUSÕES:

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

1. Gatos com dermatopatias, provenientes de áreas endêmicas para leishmaniose visceral, podem estar infectados por *Leishmania chagasi*, e ser este o agente etiológico das lesões cutâneas;
2. A presença da infecção pode ser identificada por meio de exame parasitológico direto de órgãos linfóides, por reação de imunistoquímica e exame histopatológico da lesão e, pela pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* por ELISA indireto e RIFI;
3. Nas áreas de lesões cutâneas de gatos naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* pode-se identificar a presença de outros agentes infecciosos, como *Notoedres cati*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomyces* spp., *Microsporium* spp., *Trichopytom* spp., *Aspergillus* spp e, *Candida* spp.;
4. Gatos com leishmaniose visceral podem apresentar sintomas, independente da presença de co-infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV).
5. Levando-se em consideração a elevada ocorrência de *Leishmania chagasi* em gatos com lesões cutâneas do presente estudo, deve-se incluir a leishmaniose visceral no diagnóstico diferencial das dermatopatias de felinos provenientes de áreas endêmicas para a doença.

REFERÊNCIAS:

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; COSTA, S.C.G. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.179-187, 2004

ALBUQUERQUE, A.R.; ARAGÃO, F.R.; FAUSTINO, M.A.G.; GOMES, Y.M.; LIRA, R.A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, n.12, p.78-80, 2007.

ALEXANDER, B.; CARVALHO, R.L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M.H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p. 1480-1485, 2002.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JUNIOR, R.H.; BADARÓ, R.; DAVID, J.R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, p.251-255, 1995.

AYLLON, T.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; VILLAESCUSA, A.; RODRIGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Serologic and Molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, v.1149, p.361-364, 2008.

BANETH, G. (Ed.). Leishmaniasis. In GREENE: Infectious diseases. Canadá: Elsevier, 2006, p. 685-698.

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

BETTENAY, S.; YAGER, J. Getting the best from skin biopsies. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 32., 2007, Sidney. **Proceedings...** Sidney: WSAVA, 2007. Disponível em: <<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2007&PID=18093&O=Generic>>. Acesso em: 11 jan. 2008.

BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.53, 1991.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.439-440, 1997.

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

CAVALCANTI, M.P.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.; BORBA, M.A.C.; SILVA, L.B.G.; MOTA, R.A. Infecções micóticas e bacterianas em lesões cutâneas de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, p. 160-162, 2004.

COSTA, T.A.C. **Utilização da técnica de ELISA com proteína A e anti-IgG para o diagnóstico sorológico da leishmaniose felina**, 2008. 57f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

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

DANTAS-TORRES, F.; MATTOS-SIMÕES, L.; BRITO, F.L.C.; FIGUEREDO, L.A.; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, n.11, p.32-40, 2006.

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

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

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.29, p.381-388, 1988.

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

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA,

X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v.137, p.214-221, 2006.

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

GONÇALVES, M.E. Identificação de *Leishmania* spp. em amostras de diferentes regiões do tecido cutâneo de cães. Botucatu, 2004. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, 2004.

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

HATAM, G.R.; ADNANI, S.J.; ASGARI, Q.; FALLAH, E.; MOTAZEDIAN, M.H.; SADJJADI, S.M.; SARKARI, B. First report of natural infection in cats with *Leishmania infantum* in Iran. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.0, p.1-4, 2009.

HERVÁS, J.; CHACÓN-M, L.F.; SÁNCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J.A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. **Journal of feline medicine & surgery**, v.1, p.101-105, 1999.

LARANGEIRA, D.F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. São Paulo, 2008. 79f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2008.

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

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n.12, p.50-58, 2007.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, p.555-559, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

MIRACELLY, K. Leishmania em gatos. **Jornal UNESP**, São Paulo, julho 2005. 19 (202). Disponível em : <http://www.unesp.br/aci/jornal/202/aracatuba1.php>. Acesso em: 31 jun. 2010.

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

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

NETO, L.S.; SOUZA, F.; MARTINS, C.O.; LIMA, V.M.F. Uso do ELISA-FML para diagnóstico de leishmaniose visceral em *Felis catus* na área endêmica de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia** 15 (2), p.87, 2008. (suppl.)

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

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.273-277, 1998.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.104, p.227-237, 2005.

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

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.181-191, 2002.

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

ROSSI, C.N. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba**. São Paulo, 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária e Ciências Agrárias, Unesp, Jaboticabal, 2007.

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

SARKARI, B.; HATAM, G.R.; ADNANI, S.J.; ASGARI, Q. Seroprevalence of feline leishmaniasis in areas of Iran where *Leishmania infantum* is endemic. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v.103, p.275-277, 2009.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RUBEIRO, A.A.; PAIVA, H.M.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v.12, p.315-317, 1998.

SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O.; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁURIA, S.R.N.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.229-233, 2004.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Small Animal Dermatology**. 6.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001. 1526p.

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

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; POMPEU, M.M.L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, p.79-87, 2004.

SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.45-458.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p. 7-12, 2004.

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

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

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

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

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

Apêndice A – Densidades ópticas (DO) médias, obtidas por meio da técnica de ELISA, dos soros de 55 gatos com dermatopatias provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	DO média	Animal	DO média
1	0,1295	29	0,1145
2	0,0960	30	0,1490
3	0,0910	31	0,1200
4	0,0850	32	0,2160
5	0,0330	33	0,2670
6	0,1738	34	0,1240
7	0,2785	35	0,1125
8	1,6315	36	0,0885
9	0,7715	37	0,0835
10	0,0635	38	0,4945
11	0,2760	39	0,4125
12	0,0925	40	0,0800
13	0,4540	41	0,6940
14	0,1725	42	0,0525
15	0,5100	43	0,0635
16	0,1310	44	0,1920
17	0,1045	45	0,1255
18	0,1725	46	0,1775
19	0,1590	47	0,1425
20	0,0290	48	0,1585
21	0,1370	49	0,0870
22	0,2578	50	1,3995
23	0,0635	51	0,1225
24	0,0880	52	1,1765
25	0,1680	53	0,8965
26	0,4365	54	0,1195
27	0,4770	55	0,0630
28	0,0455	-	-

Apêndice B – Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* em preparados citológicos obtidos por punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 55 gatos com dermatopatias do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado	Resultado
1	-	-	-	-	-
2	-	+	-	-	+
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	+	-	-	-	+
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	+	+	-	+
15	-	+	+	-	+
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	+	-	+	-	+
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	+	-	-	+
25	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-
30	-	+	-	-	+
31	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado	Total
34	-	-	-	-	-
35	-	+	-	-	+
36	-	-	-	-	-
37	+	-	-	-	+
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-

Apêndice C – Descrição dos achados histopatológicos de lesões cutâneas de 27 gatos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	Exame Histopatológico
1	Epiderme e derme dentro dos padrões de normalidade. Observa-se na região de glândula sudorípara a presença de um infiltrado inflamatório linfoplasmocítico.
2	Camada córnea contendo crostas serocelulares, com presença de queratina e infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, colônias bacterianas e ácaros da espécie <i>Notoedres cati</i> . Na epiderme observa-se acantose irregular e, na derme nota-se a presença de infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, mastócitos e eosinófilos de localização perivascular.
3	Presença de extensas áreas de ulceração revestidas por crostas serocelulares densas com grande quantidade de neutrófilos, colônias bacterianas, queratina, hemácias livres, eosinófilos e presença de ácaros da espécie <i>Notoedres cati</i> . Abaixo evidencia-se a existência de um infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos. Também foi observada a presença de vasculite neutrofilica.
4	Epiderme com presença de acantose irregular discreta. Na derme, evidencia-se campos de fibrose superficial e discreto infiltrado inflamatório composto por linfócitos e mastócitos.
5	Epitélio de revestimento cutâneo com acantose irregular e discreta hiperqueratose ortoqueratótica. Na epiderme observam-se áreas focais de espongiose, com exocitose de linfócitos e eosinófilos. Abaixo desta, evidencia-se a presença de um infiltrado inflamatório composto por grande quantidade de eosinófilos associados a mastócitos, de localização intersticial. Em alguns folículos observou-se a existência de exocitose de linfócitos.
6	Epitélio de revestimento cutâneo com acantose irregular, áreas de espongiose e exocitose de neutrófilos e eosinófilos, com formação de micropústulas eosinofílicas. Na derme observa-se a presença de um infiltrado inflamatório perivascular a intersticial composto por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos. Os folículos pilosos estavam em diferentes fases de maturação. Ainda na derme, foram identificados macrófagos contendo estruturas do parasito do gênero <i>Leishmania</i> .

7	Presença de hiperqueratose ortoqueratótica. Na derme evidencia-se um infiltrado inflamatório composto por linfócitos e mastócitos, com localização perivascular discreta. Os folículos apresentam grande quantidade de artroconídeas ao redor das hastes pilosas. No interior destas observa-se presença de grande quantidade de hifas fúngicas. Quadro histopatológico compatível com dermatofitose.
8	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Na derme superficial observam-se áreas focais de fibrose.
9	Presença de hiperqueratose ortoqueratótica. Na epiderme observa-se uma discreta acantose irregular. Os folículos pilosos apresentam grande quantidade de artroconídeas ao redor das hastes pilosas. No interior destas evidencia-se a presença de hifas fúngicas. Presença de foliculite linfocítica em alguns campos. Quadro histopatológico compatível com dermatofitose.
10	Presença de hiperqueratose ortoqueratótica. Folículos pilosos com presença de artroconídeas ao seu redor e hifas fúngicas em hastes pilosas. Presença de um infiltrado inflamatório linfoplasmocítico em região perivascular. Quadro histopatológico compatível com dermatofitose.
11	Na derme evidencia-se a presença de um discreto infiltrado inflamatório perivascular composto por linfócitos. Em um folículo piloso observa-se a existência de foliculite mural contendo linfócitos, neutrófilos e hifas fúngicas. Quadro histopatológico compatível com dermatofitose.
12	Presença de hiperqueratose paraqueratótica na camada córnea. Na epiderme nota-se a presença de acantose irregular, com área focal de exocitose de linfócitos. Na derme evidencia-se infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, de localização intersticial. Na região superficial evidenciam-se ninhos de células escamosas atípicas, com citoplasmas de tamanhos variados, núcleos arredondados, ovalados e, alguns hiper cromáticos. Em região adjacente, observa-se a presença de um infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e fibroblastos reativos. Quadro histopatológico compatível com Carcinoma de Células Escamosas.
13	Camada córnea com presença de crostas serocelulares focal, contendo neutrófilos degenerados, queratina e hiperqueratose orto e paraqueratótica. Na derme superficial observa-se área focal de fibrose.
14	Na derme evidencia-se a presença de área focal de fibrose e de infiltrado inflamatório perivascular à intersticial composto por linfócitos, mastócitos e, predominantemente, por eosinófilos.

15	Hiperqueratose ortoqueratótica e presença de parasitas da espécie <i>Notoedres cati</i> . Na derme evidenciam-se extensas áreas de fibrose em faixa superficial e profunda, com diminuição ou até mesmo ausência de anexos cutâneos, e discreta quantidade de fibrócitos maduros.
16	Presença de hiperqueratose ortoqueratótica. Na derme evidenciada a existência de um infiltrado inflamatório perivascular composto por neutrófilos, linfócitos, histiócitos, eosinófilos e plasmócitos e na derme profunda foi observada a presença de infiltrado inflamatório perivascular composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos.
17	Na epiderme nota-se a presença de acantose irregular. Na derme superficial evidenciam-se áreas focais de fibrose e, na região de derme profunda evidencia-se uma proliferação celular epitelial, mal circunscrita, composta células escamosas atípicas. Estas células se caracterizam por apresentarem citoplasmas de tamanhos variados, núcleos grandes, arredondados, com nucléolos evidentes e figuras de mitoses atípicas. Observa-se ainda, a presença de infiltrados inflamatórios compostos por neutrófilos. A neoplasia se infiltra em tecido muscular adjacente. Quando histopatológico compatível com Carcinoma de Células Escamosas.
18	Na camada córnea observa-se a presença de extensas áreas de ulceração revestidas por crostas serocelulares densas com grande quantidade de neutrófilos, queratina, bactérias cocóides e material seroso. Abaixo desta, evidencia-se proliferação celular epitelial, mal circunscrita e composta por células escamosas. Estas apresentam citoplasmas de tamanhos variados, núcleos arredondados a ovalados, com nucléolos evidentes e hipercromáticos. Observa-se ainda a presença de infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, mastócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. Quadro histopatológico compatível com Carcinoma de Células Escamosas.
19	Na camada córnea observa-se a presença de hiperqueratose ortoqueratótica e paraqueratótica, com presença de grande quantidade de colônias bacterianas cocóides. Na epiderme evidencia-se acantose irregular e exocitose focal de neutrófilos. Na derme nota-se a presença de infiltrado inflamatório perivascular à intersticial composto por neutrófilos, mastócitos e linfócitos.

20	Na epiderme observa-se a presença de discreta melanose. Na derme evidencia-se presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos e mastócitos, de localização perivascular e, áreas focais de continuação... pigmentar.
21	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Na derme evidencia-se infiltrado inflamatório composto por linfócitos e mastócitos, de localização perivascular.
22	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Na derme observa-se fibrose discreta superficial e uma área de infiltrado inflamatório composto por macrófagos e linfócitos.
23	Na epiderme observa-se a existência de acantose irregular e difusa. Na derme evidencia-se a presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos e mastócitos, de localização perivascular.
24	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Evidenciou-se a presença de mastócitos e linfócitos em região perivascular da derme.
25	Epiderme com área focal de exocitose de linfócitos.
26	Epiderme dentro dos padrões de normalidade. Na derme evidencia-se a presença de um infiltrado inflamatório composto por mastócitos e eosinófilos de localização perivascular, além de área focal de discreta fibrose.
27	Epiderme com acantose irregular e exocitose de linfócitos. Os folículos pilosos apresentam acantose irregular, hiperqueratose e discreta mucinose em região de parede folicular. Na derme evidencia-se a presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, histiócitos e mastócitos, de localização perivascular a intersticial.