

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM GATOS
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA

LUCIANA CRISTINA BALDINI PERUCA

Botucatu-SP

JUNHO-2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM GATOS
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA PARA
LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA

LUCIANA CRISTINA BALDINI PERUCA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Titular Hélio Langoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Peruca, Luciana Cristina Baldini.

Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose canina e humana / Luciana Cristina Baldini Peruca. -Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Hélio Langoni

Co-orientador: Simone Baldini Lucheis

Capes: 50502000

1. Animais domésticos - Doenças. 2. Leishmania - Diagnóstico.

Palavras-chave: Gato; Hemocultura; *Leishmania chagasi*; Reação em cadeia pela polimerase; Reação de imunofluorescência indireta.

Nome do autor: Luciana Cristina Baldini Peruca

Título: INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM GATOS PROVENIENTES DE
ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE CANINA E HUMANA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Hélio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP- Botucatu

Profa. Ass. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani

Membro Titular

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

FMVA- Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba- UNESP- Araçatuba

Prof. Ass. Dr. Cassiano Victória

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matins Ribolla

Membro Suplente

Departamento de Parasitologia

IB- UNESP- Botucatu

Prof. Adj. Antônio Carlos Paes

Membro suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 20 de junho de 2011.

“ (...) Sede pacientes. A paciência também é uma caridade e deveis praticar a lei de caridade ensinada pelo Cristo, enviado de Deus. A caridade que consiste na esmola dada aos pobres é a mais fácil de todas. Outra há, porém, muito mais penosa e, conseqüentemente, muito mais meritória: a *de perdoarmos aos que Deus colocou em nosso caminho para serem instrumentos do nosso sofrer e para nos porem à prova a paciência.*

A vida é difícil, bem o sei. Compõe-se de mil nada, que são outras tantas picadas de alfinetes, mas que acabam por ferir. Se, porém, atentarmos nos deveres que nos são impostos, nas consolações e compensações que, por outro lado, recebemos, havemos de reconhecer que são as bênçãos muito mais numerosas do que as dores. O fardo parece menos pesado, quando se olha para o alto, do que quando se curva para a terra a frente (...)

Allan Kardec

Aos meus pais Luiz Antonio e Fátima, ao meu irmão Luiz, à minha cunhada Cecília, aos meus sobrinhos Taís e Giovanni, ao meu marido Fabio e ao meu filho Lucas por serem a justificativa da minha existência, permanência e perseverança.

Primeiramente a Deus por toda luz e fé que colocou em meu caminho para que eu continuasse e seguisse sem medo de fracassar.

Ao meu filho Lucas que esteve EM MIM desde o começo dessa nossa jornada. Você é a razão de tudo, filho. Obrigada por me ensinar a ser um ser humano cada vez melhor.

Ao meu marido Fabio que sempre me apoiou e estimulou na busca do meu aperfeiçoamento profissional. Você é minha alma gêmea.

Ao meu pai Luiz Antonio por ser tão presente e persistente. Você é meu ídolo, pai. Eu te admiro mais e mais a cada dia e tenho muito orgulho de ser sua filha.

À minha mãe Fátima por estar sempre, sempre ao meu lado. Você é minha amiga, companheira, meu amor, minha mãe. Obrigada por me ensinar a ser o indivíduo íntegro que sou.

Ao meu irmão Luiz por ser meu ponto de referência pra tudo. A sua existência é o suficiente para estimular minha busca constante pelo conhecimento. Você é meu coração. Obrigada por participar ativamente dos meus maiores sonhos e conquistas.

Aos meus sobrinhos Taís e Giovanni pela pureza e sinceridade das palavras. Vocês representam meu recomeço de vida.

À minha cunhada, Cecília por ser mais que uma amiga.....uma irmã.

Aos meus queridos e amados, muito amados, e sempre presentes em meu coração, avós paternos e maternos: Luiz, Cleonice, Antonio e Diva (*in memoriam*). Vocês são a minha melhor lembrança, meu melhor exemplo e a recordação que sempre, em qualquer momento me faz sorrir e crer que tudo vale à pena. Obrigada por terem me dado a honra de fazer parte dessa família.

Às minhas amigas de sempre Andréa e Soraya. Sei que apesar da ausência física, a presença espiritual existiu e existirá em todos os momentos.

Às minhas amigas de pós-graduação Marcella, Ana Paula, Rozeani e Lucilene. MUITÍSSIMO obrigada por toda a amizade, apoio, compreensão e principalmente ensinamento nessa minha trajetória.

Ao meu orientador de mestrado, de iniciação científica e de vida: Prof. Hélio Langoni, com muito carinho. Obrigada por ter sido, na graduação, o pai presente quando o meu estava ausente e quando eu precisava tanto de um pai. E...obrigada por ser, na pós-graduação, mais uma vez meu pai. Que Deus te abençoe hoje e sempre Prof.

À minha co-orientadora Profa. Simone Baldini Lucheis. Obrigada pela oportunidade e por ter participado ativamente de todo o nosso trabalho desde o começo.

Aos queridos Profs. Carlos Alberto ("Cal"), Márcio Kuchembuck, Roberto Calderon e Stélio Pacca por todos os grandiosos ensinamentos profissionais e de vida. Obrigada por serem meus amigos, morarem em meu coração e estarem comigo quando eu mais precisei.

A todos os colegas de pós-graduação, residentes e funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

À equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Birigui – SP, especialmente à Silvana que se disponibilizou prontamente em me auxiliar na colheita de sangue dos animais do estudo.

Aos gatos que participaram desse estudo pela colaboração no momento da colheita.

Ao CNPq por ter concedido a bolsa de estudo para que eu conseguisse realizar esse projeto.

A todos os amigos e inimigos não citados que estiveram presentes e me auxiliaram de alguma forma para que eu realizasse mais esse sonho. Meu muito obrigada.

Lista de quadros e tabelas

TABELA 1	Resultados das hemoculturas de 109 gatos provenientes de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	51
TABELA 2	Valores em porcentagem (%) de Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo (VPP) e Negativo (VPN), Acurácia e Coeficiente Kappa, pela Hemocultura considerando a Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2011.....	52
TABELA 3	Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos de <i>Leishmania</i> spp. em amostras de soro de 109 gatos provenientes de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	53
TABELA 4	Valores em porcentagem (%) de Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo (VPP) e Negativo (VPN), Acurácia e Coeficiente Kappa, pela Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) considerando a Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2011.....	54

TABELA 5	Estimativa da distribuição dos sinais clínicos segundo diagnóstico para <i>Leishmania (L.) chagasi</i> pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de 109 gatos provenientes de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	57
TABELA 6	Resultados da pergunta quanto à localização da área da casa que o gato habita respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, Botucatu-SP, 2011.....	58
TABELA 7	Resultados da pergunta quanto à esterilização do gato respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	61
TABELA 8	Resultados da pergunta quanto ao ambiente que o gato habita respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	61
TABELA 9	Resultados da pergunta quanto ao tipo de alimentação do gato respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	61
TABELA 10	Resultados da pergunta quanto ao hábito noturno do gato respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	62

TABELA 11 Resultados da pergunta quanto ao contato do gato com outro animal na mesma residência respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	62
---	----

TABELA 12 Resultados da pergunta quanto ao contato do gato com outro animal de residência vizinha respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.....	63
---	----

Lista de gráficos e figuras

FIGURA 1	Colheita de sangue de gato proveniente de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	44
FIGURA 2	Imagem de um tripanossomatídeo flagelado (<i>seta</i>) obtida por microscopia óptica. NUPEZO- Botucatu-SP, 2011.....	51
FIGURA 3	Produtos da amplificação dos fragmentos do minicírculo do kDNA de <i>Leishmania chagasi</i> , pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir das amostras de sangue de gatos de Birigui (SP). Amostras amplificadas utilizando os iniciadores Lc14 e Lc15. Gel em agarose 1,5%. Botucatu-SP, 2010.....	55
FIGURA 4	Visualização de banda de 190pb, em gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos de amplificação das diluições de <i>Leishmania chagasi</i> utilizando os <i>primers</i> Lc14 e Lc15 em água ultra-pura.....	56
FIGURA 5	Imagem do corredor para acesso ao gatil da casa nº 11 do projeto. Birigui (SP), 2009. Botucatu-SP, 2011.....	58
FIGURA 6	Imagem do gatil da casa nº 11 do projeto. Birigui (SP), 2009. Botucatu-SP, 2011.....	59

FIGURA 7	Imagem do interior do gatil da casa nº 11 do projeto. Birigui (SP), 2009. Botucatu-SP, 2011.....	60
FIGURA 8	Resultado da questão “O Sr. acha que o cão pode pegar leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	63
FIGURA 9	Resultado da questão “O Sr. acha que o gato pode pegar leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	64
FIGURA 10	Resultado da questão “O Sr. sabe o que é leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	64
FIGURA 11	Resultado da questão “Por qual meio o Sr. ficou sabendo da leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	65
FIGURA 12	Resultado da questão “Como o Sr. acha que se pega leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.....	65

Sumário

RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 As leishmanioses.....	29
2.2 Impacto das leishmanioses na saúde pública.....	30
2.3 Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos e diagnóstico.....	32
2.4 Leishmaniose felina.....	36
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Autorização para a realização do estudo.....	42
4.2 Locais de execução dos procedimentos laboratoriais.....	42
4.3 Animais.....	42
4.4 Exame clínico e questionário epidemiológico.....	42
4.5 Colheita das amostras de sangue.....	43
4.6 Hemocultura.....	43

4.6.1 Leitura das hemoculturas.....	44
4.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania chagasi</i>	44
4.7.1 Preparo do antígeno e lâminas de imunofluorescência.....	44
4.7.2 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta..	45
4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	46
4.8.1 Preparo das amostras de sangue em meio LIT para extração do DNA de <i>Leishmania chagasi</i>	46
4.8.2 Extração do DNA.....	46
4.8.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania chagasi</i>	46
4.8.4 Eletroforese em gel de agarose.....	47
5. RESULTADOS.....	50
5.1 Hemocultura.....	50
5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de <i>Leishmania</i> spp.....	52
5.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de <i>Leishmania chagasi</i>	54
5.3.1 Limiar de detecção do DNA de <i>Leishmania chagasi</i> pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	56
5.4 Exame clínico e questionário epidemiológico.....	56
6. DISCUSSÃO.....	67

6.1 Hemocultura.....	67
6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	68
6.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	71
6.4 Exame clínico e questionário epidemiológico.....	72
7. CONCLUSÕES.....	75
8. BIBLIOGRAFIA.....	77
Anexos.....	88
Apêndice.....	99

Resumo

BALDINI-PERUCA, L.C. **Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose canina e humana.** Botucatu, 2011, 108p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A leishmaniose visceral é uma enfermidade de grande impacto na saúde pública e de importância mundial que acomete o homem, animais silvestres e domésticos, como cães e gatos. A transmissão ocorre pela picada de flebotômídeos do gênero *Lutzomya*. Objetivou-se pesquisar a ocorrência de *Leishmania (L.) chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose canina e humana pela utilização dos métodos diagnósticos: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania (L.) chagasi*, comparar os resultados desses métodos quanto à especificidade e sensibilidade e realizar inquérito epidemiológico por meio de entrevista aos proprietários dos gatos avaliados. Foram colhidas amostras de sangue de 109 gatos provenientes de Birigui (SP), região endêmica para leishmaniose visceral canina e humana. Das 109 amostras de sangue, 52 (47,7%) foram positivas na hemocultura, três (2,7%) pela RIFI e 17 (15,6%) pela PCR. De acordo com os resultados encontrados, pode-se concluir que os gatos provenientes de áreas endêmicas para leishmaniose canina e humana são frequentemente expostos ao agente, podem se infectar, provavelmente desenvolver sintomatologia clínica e parasitemia. Faz-se também necessária a associação das técnicas sorológicas e moleculares para elevar a acuidade diagnóstica e, conseqüentemente, elucidar o verdadeiro papel do gato no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) chagasi*, gato, Reação de Imunofluorescência Indireta, hemocultura, Reação em Cadeia pela Polimerase.

Abstract

BALDINI-PERUCA, L.C. **Infection by *Leishmania chagasi* in cats from an endemic area for leishmaniose in dogs and in human beings.** Botucatu, 2011, 108p. Dissertation (Master) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus of Botucatu, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

The visceral leishmaniasis is a disease of great impact in the public health and of world significance. It affects man, wild and domestic animals, such as dogs and cats. The transmission occurs by the sting of phlebotomine vectors of the *Lutzomyia* gender. This work was aimed to study the occurrence of *Leishmania (L.) chagasi* in cats from an endemic area for canine and man leishmaniasis using Indirect Immunofluorescence Reaction (IFA), hemoculture and Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Leishmania (L.) chagasi* diagnostic methods, compare the results of these methods as for the specificity and sensibility, and make an epidemiologic search through a questionnaire answered by the owners of the cats assessed. Blood samples were collected from 109 cats from Birigui (SP), an endemic region for canine and man visceral leishmaniasis. From 109 blood samples, 52 (47,7%) were positive in hemocultures, three (2,7%) in the IFA and 17 (15,6%) in the PCR. According to the results found one can conclude that cats from endemic areas for canine and man leishmaniasis are frequently exposed to the agent, they can infect themselves, develop a clinical symptomatology and parasitemia. It is also required an association of serological and molecular techniques to increase the diagnostic accuracy and, consequently, elucidate the true role of a cat in the epidemiological cycle of the visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania (L.) chagasi*, cat, Indirect Immunofluorescence Reaction, hemoculture, Polymerase Chain Reaction.

1- Introdução

As leishmanioses são grupos de enfermidades de grande impacto na saúde pública e de importância mundial, sendo endêmicas em 88 países, acometendo o homem, animais silvestres e domésticos, como cães e gatos (WHO, 2004). Entre os animais domésticos, os cães estão envolvidos na transmissão doméstica em humanos, principalmente em casos de infecção por *Leishmania (L.) chagasi* (SIMÕES-MATTOS et al., 2002). Contudo, a urbanização acentuada juntamente ao controle da leishmaniose canina com coleiras a base de deltametrina, ocasionou o envolvimento de outras espécies domésticas na epidemiologia dessa enfermidade em focos endêmicos, entre elas o gato (DA SILVA et al., 2008).

Diversos métodos diagnósticos têm sido utilizados para determinação da LV em cães e humanos (GONTIJO, 2004). A hemocultura é um teste parasitológico que necessita a presença de parasitas em quantidade suficiente para sua visualização em microscópio óptico. Os exames parasitológicos permitem as visualizações de formas amastigotas do parasito, dentro dos macrófagos ou na forma livre (SIMÕES-MATTOS et al., 2005; GREENE, 2006). Exames sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) são outros métodos diagnósticos utilizados para a detecção de anticorpos para *Leishmania* spp. A PCR é um método sensível e altamente específico para a detecção do DNA do parasita, independentemente da imunocompetência e histórico clínico do paciente, fornecendo resultados seguros em poucas horas (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

Atualmente o Brasil é o detentor do maior número de casos de leishmaniose felina (LF) do mundo, mas sua distribuição no país permanece incerta, sendo relatada em diversos estados brasileiros. Apesar disso, o real papel do gato no ciclo epidemiológico da LV ainda é desconhecido. Portanto, faz-se necessária a realização de estudos que elucidem o verdadeiro papel do gato no ciclo zoonótico da LV por meio da associação de métodos sorológicos e moleculares para maior acuidade diagnóstica.

2- Revisão de Literatura

2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são causadas por várias espécies do protozoário *Leishmania* e transmitidas aos humanos e animais pela picada de flebotomídeos, dípteros da família *Psychodidae*, gênero *Lutzomya* e, no Brasil, as espécies *Lutzomya longipalpis* e *Lu. cruzi* são as mais encontradas. A *Lu. longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil e, a *Lu. cruzi*, a mais recente vetora incriminada no Mato Grosso do Sul. Esses insetos são popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui, tatuquiras entre outros e possuem atividade crepuscular e noturna. Verificou-se, no final da década de 80, a adaptação da *Lu. longipalpis* em ambientes urbanos, peri e intradomicílio, especialmente próxima a uma fonte de alimento (BRASIL, 2003).

As fêmeas do vetor alimentam-se de sangue de hospedeiros animais ou humanos infectados, ingerindo macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. que, após oito a vinte dias de repasto sanguíneo, evoluem para formas promastigotas no tubo digestivo dos insetos, tornando-se infectantes (BRASIL, 2003). As formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária e permanecem dentro de células do sistema monocítico fagocitário (SMF) de hospedeiros mamíferos (BRASIL, 2000). A capacidade de infectar os mosquitos é semelhante em portadores assintomáticos e cães que apresentem alguma sintomatologia (ZIVICNJAK et al., 2005).

Semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie, permitindo que alguns autores denominem de *L. infantum* o agente etiológico dessa enfermidade também nas Américas, apesar da discordância entre alguns pesquisadores (MAURÍCIO et al., 1999). A leishmaniose cutânea (LC) é causada pela *Leishmania major* e a leishmaniose mucocutânea, pela *Leishmania (mexicana) mexicana*, *Leishmania (brasiliensis) brasiliensis* ou pela *Leishmania (brasiliensis) peruviansis* (BRASIL, 2003). As diversas espécies de

Leishmania implicam diferentes manifestações nos hospedeiros, destacando-se as leishmanioses visceral (LV) e LC (BRASIL, 2006).

As espécies de *Leishmania* envolvidas na enfermidade em felinos descritas no Brasil são: *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania chagasi* (causadoras da LV) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (ambas causadoras da LC). Em outros países, existem as descrições de casos clínicos decorrentes da infecção em gatos por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006).

Com a disseminação da doença e número progressivo de casos, a LV tornou-se, para a Organização Mundial de Saúde, uma das prioridades dentre as doenças tropicais (GONTIJO & MELO, 2004).

2.2 Impacto das leishmanioses na saúde pública

As leishmanioses foram primeiramente encontradas no sudeste da Ásia, sul da África e Brasil. Em muitos países tropicais e subtropicais desenvolvidos esses protozoários são um dos agentes infecciosos mais comuns e representam graves consequências para o desenvolvimento sócio-econômico (WHO, 2001; ALVAR, 2006). A OMS considera a leishmaniose como uma das doenças parasitárias mais graves e a Assembléia Mundial da Saúde defendeu esforços para seu controle (WHO, 2007). As infecções humanas estão presentes em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal (WHO, 2010).

Na Europa e Ásia, a leishmaniose cutânea (LC) é observada de forma crescente em imigrantes, militares, voluntários de causas humanitárias, turistas e indivíduos provenientes de áreas endêmicas. Entretanto, a LC importada ainda é negligenciada pela maior parte dos médicos. Lesões cutâneas suspeitas devem ser analisadas com biopsias e citologias para um diagnóstico mais acurado (REITHINGER, 2007).

A LC é endêmica em 82 países e 10 milhões de pessoas são acometidas pela doença diariamente (WHO, 2007). De acordo com a OMS, uma pessoa se torna infectada pela LC a cada 20 segundos. Ao redor de um milhão de casos ocorrem anualmente e epidemias são frequentes. Oitenta e cinco por cento dos pacientes acometidos pela LC sofrem da forma não complicada da doença e 15% da forma grave e o tratamento dos casos complicados frequentemente é ineficaz. Pelo fato de apresentar baixos índices de mortalidade, a LC é negligenciada como um grande problema de saúde pública. A desfiguração, incapacidade funcional e estigma social e psicológico são consequências da doença. A situação atual da LC permanece incerta, uma vez que dados confiáveis não estão disponíveis (WHO, 2007).

No Brasil, de 2006 a 2009 foram notificados 60804 casos de LC, com 39541 curas. O estado com o maior número de casos notificados é o Pará (10978) com 6729 curas. Mato Grosso é o segundo estado com 8444 casos notificados e 5330 curas. A Bahia apresentou, nesse período, 8057 casos notificados de LC dos quais 4878 obtiveram cura (Tabelas 2 e 3) (BRASIL, 2010).

A LV atinge mais de 65 países, com 200 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco e com mais de 500.000 novos casos e 50.000 óbitos por ano (BRASIL, 2008). Os casos não tratados de LV podem apresentar taxa de letalidade de 100% em 2 anos (WHO, 2010).

No período de 1990 a 2005, a taxa de incidência de LV no Brasil variou entre um e três casos por 100 mil habitantes. Os valores são mais elevados para as regiões Norte e Nordeste, mas a doença encontra-se em expansão nas regiões Centro-Oeste e Sudeste.

Com relação ao número absoluto de casos, a região Nordeste contribuiu com quase 90% dos casos registrados até o ano de 2000. Essa participação tem se reduzido na década atual, chegando a 56% em 2005 (BRASIL, 2005b).

De 2007 a 2009 foram notificados 10216 casos de LV no Brasil, com um total de 572 óbitos. O estado do Ceará teve o maior número de casos notificados de LV nesse período, com 1499 casos e 72 óbitos. Minas Gerais apresentou 108 óbitos dos 1386 casos notificados. O terceiro estado brasileiro que obteve o maior número de casos notificados nesse período foi Tocantins, com 1283 casos e 52 óbitos (BRASIL, 2010).

No Brasil, a importância da LV reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (GONTIJO e MELO, 2004).

Em seres humanos portadores de vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) a LV, causada no Brasil pela *L. (L.) chagasi*, é considerada emergente, sendo uma das enfermidades mais importantes, principalmente em crianças desnutridas e indivíduos não tratados, ocasionando óbito em 90% dos casos (BRASIL, 2003).

Em 2007, o Centro de Controle de Zoonose do município de Birigui (SP) registrou 269 cães positivos e 34 casos humanos de leishmaniose, enquanto que, no ano anterior, foram observados números próximos dos de 2007 para leishmaniose canina e 18 casos positivos para essa mesma enfermidade em humanos (FOLHA DA REGIÃO, 2007).

Em Araçatuba, município localizado ao noroeste do estado de São Paulo, a 11 km de Birigui, a LV foi identificada pela primeira vez em 1998 em cães e em 1999, em humanos e, atualmente, é considerada endêmica nessa área (LUVIZOTTO et al., 1999). O município segue as recomendações da Secretaria do Estado da Saúde do Estado de São Paulo para o controle da LV, compreendendo diagnóstico precoce e tratamento apropriado em seres humanos, utilização de inseticidas de ação residual e medidas de saneamento do meio doméstica para diminuição da densidade vetorial e a identificação e eliminação do reservatório doméstico, que é a fonte de infecção para o vetor. Com essas medidas de controle da LV, a cidade de Araçatuba obteve apenas

uma pequena redução dos casos que contabilizaram 41.774 cães submetidos à eutanásia de 1999 a 2004 (ANDRADE et al., 2007). De 1999 a 2005, essa zoonose infectou 186 pessoas e 20 óbitos foram registrados (ANDRADE et al., 2008). Serrano et al. (2008) relataram o primeiro caso de LV em Araçatuba, em que o gato apresentava alopecia e descamação nas regiões auricular e temporal, além de dermatite crostosa úmida. Como métodos diagnósticos foram realizados RIFI, ELISA, PCR e parasitológico direto das lesões, com diagnóstico positivo para *Leishmania* spp. apenas pela PCR. Da Silva et al. (2008), determinam que os gatos domésticos devem ser incluídos em investigações sorológicas durante as campanhas de controle da LV realizadas em áreas endêmicas.

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), em 2009 e 2010 foram 23 e 20 casos notificados e confirmados de LV humana, respectivamente, no município de Araçatuba. Em Birigui, foi notificado e confirmado apenas um caso de LV humana em 2009 e em 2010 foram três casos (SINAN, 2011).

2.3 Leishmaniose visceral: aspectos epidemiológicos e diagnóstico

A leishmaniose visceral é uma enfermidade caracterizada por diversos fatores epidemiológicos. Entre os animais, os cães estão envolvidos na transmissão doméstica em seres humanos, principalmente em casos de infecção por *L. chagasi* (SIMÕES-MATTOS et al., 2002). O cão representa o principal reservatório animal uma vez que é essencialmente doméstico, completamente adaptado à vida junto ao homem se deslocando com ele nas migrações (WHO, 2010). Existem diversos estudos recentes indicando que o gato pode ser infectado em áreas endêmicas e pode atuar como reservatório doméstico para a infecção humana (FERREIRA, 2006). Porém, o papel do gato no ciclo epidemiológico da LV ainda não está claramente elucidado (WHO, 2010). Diversos métodos diagnósticos têm sido utilizados para determinação da LV em cães, dentre eles, a hemocultura, e testes sorológicos (GONTIJO e MELO, 2004). Exames sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e

a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) são outros métodos diagnósticos utilizados para a detecção de anticorpos para *Leishmania* spp. Porém, a RIFI pode falhar em estágios iniciais da doença quando anticorpos IgG ainda não são detectáveis e o ELISA apresenta baixa especificidade na determinação de casos subclínicos ou assintomáticos das leishmanioses (MANCIANTI e MECIANI, 1988; GONTIJO e MELO, 2004). Atualmente, a RIFI e o ELISA são os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) no Brasil para inquéritos populacionais da LV canina e humana, provavelmente devido à facilidade de execução e leitura (SUNDAR, 2002). As citologias aspirativas de lesões cutâneas na LC e em linfonodos e/ou medula óssea na LV, são exames parasitológicos diretos corados por Giemsa, que permitem a visualização de formas amastigotas do parasito, dentro dos macrófagos ou na forma livre (SIMÕES-MATTOS et al., 2005; GREENE, 2006).

Segundo Shaw et al. (2005) a vantagem na análise de DNA resulta de sua aplicação prática, examinando diretamente tecidos lesados ou os isolados de *Leishmania* spp.; sua sensibilidade para detecção de agentes; a velocidade com a qual pode identificar um organismo; o processamento de um grande número de espécimes com um ensaio automatizado; distinguir entre organismos que são morfologicamente similares; e permitir evidenciar organismos, mesmo os que não são viáveis ou cultiváveis.

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam como característica uma organela celular denominada cinetoplasto, composta, basicamente, por moléculas de DNA (kDNA) que representa a informação genética mitocondrial desses parasitos. A vantagem no uso do kDNA é que esta molécula ocorre como repetições múltiplas nos minicírculos, sendo que os *primers* utilizados para amplificar essas seqüências identificam 25 membros do gênero *Leishmania*, incluindo os do complexo *donovani* e diferenciam os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SHAW et al., 2005).

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é um método sensível e altamente específico para a detecção do DNA do parasita envolvido, independentemente da imunocompetência e histórico clínico do paciente,

fornecendo resultados seguros em poucas horas (IKONOMOPOULOS et al., 2003). Esse teste possibilita a identificação do DNA parasitário em tecidos e fluidos provenientes de humanos e cães infectados (MOREIRA et al., 2002).

Nos casos humanos de LV, o diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasita por métodos parasitológicos. O diagnóstico clínico é complexo uma vez que no homem a doença pode apresentar sinais e sintomas comuns a outras enfermidades presentes nas áreas onde incide a LV, como, por exemplo, Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifóide e Tuberculose (GONTIJO e MELO, 2004). Sintomas e sinais de co-infecções *Leishmania*/bactéria como pneumonia, diarreia ou tuberculose podem alterar a apresentação clínica no momento do diagnóstico inicial (CHAPPUIS, et al., 2007).

O diagnóstico precoce e o tratamento são importantes para o controle da doença. O resultado do tratamento é pior em pacientes debilitados. Os pacientes com LV não tratados podem atuar como reservatórios de *Leishmania* e, portanto, contribuir para a transmissão da doença (CHAPPUIS, et al., 2007).

Condições sócio-econômicas desfavoráveis com consequente migração massiva para áreas urbanas e suburbanas em que a presença de vetores, animais de estimação e condições sanitárias deficientes e desnutrição são comuns, são fatores que aumentam significativamente o risco da LV (WHO, 2010).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 85% da população do país vive em área urbana, o que cria condições favoráveis para a emergência e reemergência de doenças, entre elas o calazar (GONTIJO e MELO, 2004). Contudo, o aumento da densidade populacional nessas áreas com mínima infraestrutura e condições sanitárias insatisfatórias permitiu que o parasita entrasse em contato com um vasto número de hospedeiros não imunes e desnutridos, aumentando, assim, o risco da LV (WHO, 2010).

No Brasil, até o início dos anos 80, a LV restringia-se a bolsões de miséria, localizados majoritariamente no Nordeste. Atualmente é realidade em capitais como Teresina, São Luís, Campo Grande, Palmas e Belo Horizonte. Agora, aproxima-se de outras metrópoles como Brasília e São Paulo. Assim como nas formas cutâneas, a ocorrência da LV é cíclica. De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), mais de 70% dos casos ainda concentram-se no Nordeste. Em todo o país, entre cinco e dez mil indivíduos são atingidos anualmente, dos quais cerca de 10% não sobrevivem (FERREIRA, 2006). Certamente, a mortalidade não seria tão alta se a doença fosse diagnosticada e tratada mais precocemente.

Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, os dados disponíveis são baseados na detecção passiva de casos. O número de pessoas expostas à infecção ou infectadas sem sintomas é em algumas áreas muito maior do que o número de casos detectados (MORENO, 2002).

As medidas preventivas propostas pela SVS são: medidas de proteção individual à população humana, manejo ambiental do vetor, controle da população canina errante, realização de posse responsável de animais, utilização de telas em canis individuais ou coletivos e uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%. Para o controle da LV, o MS preconiza o diagnóstico rápido e tratamento precoce dos casos humanos, a redução da população flebotomínica por meio da realização de controle químico imediato ou programado e eutanásia de cães infectados (BRASIL, 2008). Porém, as medidas de controle da doença até agora implementadas foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias (GONTIJO e MELO, 2004).

A integração entre profissionais de saúde do sistema privado e público, o envolvimento dos meios de comunicação em um movimento de conscientização, em conjunto com campanhas de esclarecimento e a consequente colaboração da população são medidas que auxiliam na prevenção da LV (FERREIRA, 2006).

2.4 Leishmaniose felina

Apesar da leishmaniose felina (LF) ser considerada de ocorrência rara, nos últimos anos houve um aumento no número de casos relatados no mundo (SIMÕES-MATTOS et al., 2005). Desde os anos 90, a LF tem sido extensivamente investigada e, quando os primeiros casos foram relatados, alguns pesquisadores hipotetizaram a participação do gato doméstico (*Felis catus*) na epidemiologia dessa enfermidade (SIMÕES-MATTOS et al., 2004; MANCIANTI, 2004). Países europeus como Portugal, França, Espanha e Itália relataram casos clínicos de LF de 1996 a 2010 (MANCIANTI, 2004; MAIA et al., 2010). Desde a descrição do primeiro caso clínico até os dias de hoje mais de 45 casos de LF foram relatados na literatura científica mundial. Dentre eles, 24 (53,3%) ocorreram nas Américas e 21 (46,6%) na Europa, Ásia e África (COSTA et al., 2010). Contudo, ainda existem discordâncias na literatura com relação à suscetibilidade dos felídeos domésticos à infecção por *Leishmania* spp. Acredita-se que os gatos possuam certo grau de resistência natural a essa enfermidade provavelmente decorrente de fatores genéticos (VITA et al., 2005).

Os gatos com LF apresentam lesões cutâneas semelhantes às observadas em humanos e cães. Em 28 casos clínicos de LF, 92,8% exibiram manifestações cutâneas, sendo esse o único sinal em 57,7% desses casos e, 17,4% apresentaram, além das dermatopatias referidas, linfadenopatia e 4,3% visceromegalia (SIMÕES-MATTOS et al., 2002). Além disso, os gatos podem apresentar as lesões cutâneas associadas ou não às viscerais como alterações oculares, linfadenomegalia local ou difusa, emese, diarreia, desidratação, perda de peso, estomatite, anorexia e, até mesmo, depressão (DANTAS-TORRES, 2006). Porém, as prevalências da leishmaniose visceral felina observadas em inquéritos epidemiológicos no Egito nos anos de 1982 (3,7%), 1988 (3,6%) e 1994 (3,4%) foram menores que as encontradas na França nos anos 1994 (12,7%) e 1998 (12,4%); em Fortaleza, no Brasil, no ano de 2001 (10,7 e 13,0%) e muito menores que as observadas mais recentemente na Itália em 1999 (59%) e em 2000 (68,0%); na Espanha em 2002 (42,0%); no Rio de Janeiro, no Brasil, em 2002 (50,5%); nos Estados Unidos da América no

ano de 2004 (10,0%); na Espanha em 2006 (70,6%) (DANTAS-TORRRES et al., 2006) e em Araçatuba, no Brasil, em 2007 (6,5%) (ROSSI, 2007).

As manifestações oculares são comuns nas leishmanioses caninas, mas dois casos foram relatados em gatos (LARUELLE-MAGALON, 1996; PEÑA et al., 2000; HERVAS et al., 2001). Dessa forma, em áreas endêmicas, a LF deve ser incluída como diagnóstico diferencial de uveíte e úlceras corneanas (LEIVA et al., 2005). Os sinais clínicos da LF são inespecíficos e similares aos observados em outras enfermidades infecciosas comuns em gatos causadas por vírus (FIV e FeLV), bactérias, protozoários e fungos (histoplasmose, esporotricose e criptococose) (DE SOUSA, 2005). Portanto, a LF deve ser sistematicamente incluída no diagnóstico diferencial em gatos que apresentem lesões cutâneas compatíveis, realizando-se pesquisas sorológicas e histopatológicas apropriadas especialmente em áreas endêmicas de leishmaniose canina, uma vez que não há sinais patognomônicos dessa enfermidade (POLI, 2002; GREVOT, 2005; DA SILVA et al., 2008).

Segundo Simões-Mattos et al. (2005) devido ao crescente aumento na prevalência de LV canina no Brasil e sua correlação ao aumento do número de casos em humanos, surge a necessidade de identificar possíveis reservatórios domésticos, dentre eles os felinos. Apesar da existência de estudos recentes comprovando a infecção em gatos por *Leishmania* spp., ainda não está totalmente claro se as baixas prevalências de infecção e de sintomatologia em populações de felinos em áreas endêmicas são decorrentes à falha na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à *Leishmania* spp (POLI et al., 2002; MARTÍN-SANCHEZ et al., 2007).

Portanto, é extremamente importante a realização de pesquisas por meio de inquéritos epidemiológicos que elucidem o papel do gato no ciclo zoonótico da leishmaniose.

3-Objetivos

Geral

O presente estudo objetivou pesquisar a ocorrência de *Leishmania (L.) chagasi* em gatos do município de Birigui (SP) uma vez que essa é área endêmica para leishmaniose visceral canina e humana, determinar a importância real dos gatos como reservatórios desse agente e realizar inquérito epidemiológico.

Específicos

- Verificar a ocorrência de *Leishmania chagasi* em gatos;
- Determinar o seu verdadeiro papel no ciclo zoonótico desta enfermidade, pela utilização de métodos diagnósticos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Hemocultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania chagasi*; comparar os resultados desses métodos, quanto à especificidade e sensibilidade
- Realizar inquérito epidemiológico por meio de questionários respondidos pelos proprietários dos animais pesquisados, a fim de obter informações sobre o manejo sanitário desses animais.
- Analisar os fatores de risco para a infecção por *L. chagasi*.

4-Material e métodos

4.1 Autorização para realização do estudo

O presente estudo foi devidamente apresentado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, sendo aprovado em 21 de outubro de 2008, protocolo nº 198/2008-CEEA (Anexo 1, p.88).

As colheitas das amostras de sangue dos gatos foram autorizadas pelos respectivos proprietários por meio da assinatura do termo de consentimento (Anexo 2, p.89) imediatamente antes da realização desses procedimentos.

4.2 Locais de execução dos procedimentos laboratoriais

Todos os procedimentos laboratoriais utilizados para esse estudo foram realizados no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (HVSP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP-Botucatu-SP.

4.3 Animais

A partir de campanhas de vacinação anti-rábicas do município de Birigui (SP) em anos anteriores foram obtidas as fichas cadastrais dos animais conduzidos a esse evento. Com esses dados os proprietários de gatos desse município foram convidados, por telefone, a participar do projeto em questão e, com a permissão formal dos mesmos, as amostras de sangue dos gatos foram colhidas na própria residência.

4.4 Exame clínico e questionário epidemiológico (Anexos 3 e 4, pgs. 91,92)

Os 109 gatos de 14 residências foram submetidos a um exame clínico individual, antes da colheita do sangue, registrando-se as possíveis alterações clínicas como emagrecimento, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia, além de informações referentes ao manejo sanitário desses animais (vermifugação e vacinação). Questões relacionadas à zona de residência do animal, estado fisiológico, ambiente em que o animal vive, tipo de alimentação, hábitos

noturnos e possível contato direto ou indireto com outros animais foram respondidas pelos 14 proprietários entrevistados. Esses também foram questionados quanto à leishmaniose, os meios pelos quais obtiveram informações sobre a enfermidade e a forma de transmissão da mesma. Os nomes, números e respectivas casas dos animais avaliados nesse estudo podem ser observados no Apêndice 1.

4.5 Colheita das amostras de sangue

Foram colhidas por venopunção cefálica, de cinco a oito mililitros de sangue de 109 gatos domiciliados, sendo 46 machos e 63 fêmeas, de raças e idades variadas, mas com maior prevalência de adultos jovens (Figura 1). Esse material foi utilizado para a realização da hemocultura, RIFI e PCR. O sangue colhido foi dividido em frascos vacutainer com e sem EDTA, mantidos em condições de refrigeração até a chegada ao laboratório, onde, as amostras dos frascos sem EDTA, foram imediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos para obtenção de soro, que foi congelado a -20°C até o momento do processamento pela técnica de RIFI e, as amostras mantidas em frascos com EDTA, processadas para a hemocultura.

4.6 Hemocultura

Na hemocultura, foram separados três tubos contendo, em cada um, 5mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril (Anexo 5, p.92). A manipulação das amostras de sangue foi realizada em capela de fluxo laminar, limpa previamente com álcool 70° e mantida sob a ação de luz ultravioleta, no mínimo por 15 minutos. Com uma seringa estéril de 1ml, foi retirada a porção plasmática e transferida lentamente para o primeiro tubo. Esse procedimento foi repetido para a porção leucocitária (localizada entre o plasma e o sedimento de hemácias), que foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, a ser transferido para o terceiro tubo. Todos os tubos já estavam identificados com o respectivo número do animal antes da transferência do material. As culturas foram mantidas em estufa a 28-30°C, até quatro meses após a inoculação, quando então foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).



FIGURA 1 Colheita de sangue de gato proveniente de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.

4.6.1 Leitura das hemoculturas

Em capela de fluxo laminar, após dez dias da inoculação da amostra, foi realizada a primeira leitura, retirando-se cinco microlitros de cada tubo de cultura inoculado, colocando-se entre lâmina e lamínula, fazendo-se a leitura de pelo menos cinco lâminas por tubo. A observação foi feita em microscópio óptico no aumento de 1000X, com óleo de imersão. As culturas foram observadas quinzenalmente, durante quatro meses. As culturas positivas foram imediatamente processadas para a extração do DNA parasitário, assim como as culturas negativas, após o término dos quatro meses de acompanhamento das leituras.

4.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania (L.) chagasi*

4.7.1 Preparo do antígeno e lâminas de imunofluorescência

O antígeno utilizado foi preparado no NUPEZO, a partir de formas promastigotas de *Leishmania* spp., mantido em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), repicados semanalmente. Em capela de fluxo laminar, foi retirada uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes, repique da semana anterior, colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40X, para avaliação do crescimento das formas promastigotas. Do tubo que apresentava parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, foi repicado 0,5 mL para três

novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos foram mantidos em estufa a 25°C.

Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foram adicionados de 2 a 3 mL de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por mais três vezes. Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica, utilizando-se como antígeno quando se obteve de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, avaliando-se 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm. As lâminas foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se após um minuto, por aspiração, restando somente uma fina película em cada orifício. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso, por um período máximo de duas semanas.

4.7.2 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com CAMARGO (1966) em que foram utilizadas microplacas para a diluição dos soros, pipetando-se 190 µL de PBS 0,01M, pH 7,2 e 10 µL do soro a ser testado no primeiro orifício, homogeneizando-se, perfazendo a diluição 1:20. Foram distribuídos 100 µL de PBS 0,01M, pH 7,2 em outras 5 cavidades e a partir da primeira diluição, transferindo-se 100 µL para o orifício seguinte, homogeneizando-se, repetindo até a quinta cavidade, desprezando-se as últimas. Essas diluições forneceram títulos 20, 40, 80, 160, 320, 640 e assim sucessivamente. Da mesma maneira, foram diluídas amostras de soros controles positivo e negativo. A diluição inicial utilizada foi 1:40. Em lâminas fixadas com o antígeno de *Leishmania* spp., foram distribuídos 10 µL de cada diluição nos orifícios, incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. A seguir, foram lavadas em jarras de *coplin* com PBS 7,2 por 10 minutos, por duas vezes consecutivas e, a seguir, secas em estufa. O conjugado espécie-específico foi diluído, segundo seu título pré-estabelecido, em solução de Azul de Evans a 20 mg% a qual foi previamente diluída em PBS 0,01M, pH 7,2 na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10 µL

de conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Foi realizada uma nova lavagem em jarra de *coplin* com PBS 0,01M, pH 7,2 por 10 minutos, duas vezes consecutivas, secando-se em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula 24x60mm, examinando-se em microscópio de imunofluorescência, no aumento 40 vezes. Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorria fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.8.1 Preparo das amostras de sangue em meio LIT para extração do DNA de *Leishmania (L.) chagasi*

Segundo Pinto (2000), as culturas positivas e negativas foram lavadas em Solução Salina Tamponada (PBS) estéril com pH 7,2 (Anexo 6), centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sedimento armazenado em microtubos estéreis livres de DNases e RNases a -20° C, até o momento da extração do DNA.

4.8.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com a utilização de kit comercial **Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®)**, de acordo com as recomendações do fabricante, apresentadas no Anexo 7 (p. 93).

4.8.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *L. (L.) chagasi*

Foram utilizados 5 µL de tampão de PCR (50 mM KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 1,5mM MgCl₂) 0,2mM dNTP, 0,2 U de Taq *platinum* polimerase (Invitrogen), 20 pmol de cada oligonucleotídeo, água ultra pura (MIX-PCR) e 10 ng de DNA genômico da amostra a ser testada, em cada tubo de reação de 0,2 mL. Dessa forma, cada tubo continha 23 µL do MIX-PCR e 3 µL do produto de extração do DNA. As condições de amplificação em termociclador Mastercycler EP Gradient (Eppendorf), sendo a desnaturação inicial em um ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos e uma extensão final de 72°C durante 10

minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA de *L. (L.) chagasi*, foram utilizados os iniciadores:

LC14 (5' – CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3')

LC15 (5' –TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3')

Esses *primers* foram desenhados e testados no laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), por meio de análise nos programas Primer3 e PrimerBLAST, AF169138.1 disponível [GenBank]. Nessa reação, o produto resultante apresenta 190 pares de base (pb), que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *L. (L.) chagasi*.

4.8.4 Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para isso, alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5 µL de solução de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x (vezes). O gel para eletroforese foi preparado com 1,5g de agarose pura em 100 mL de tampão Tris-EDTA-Borato (TBE) 0,5x. A agarose foi dissolvida em TBE 0,5x previamente aquecido, para que se dissolva totalmente. O material foi distribuído uniformemente na cuba de eletroforese. A corrida foi realizada a 100 volts por 90 minutos. Ao final, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo durante uma hora e as bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300 nm. Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *L. chagasi*, e como negativos o TNE (Tris-NaCl EDTA) e o MIX-PCR. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder, 100pb.

5- Resultados

Os resultados obtidos pela hemocultura, RIFI e PCR para o diagnóstico da leishmaniose nos gatos avaliados encontram-se no Apêndice 2.

Os resultados obtidos pelas respostas dos 14 proprietários de cada residência podem ser observados no Apêndice 3.

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a que mais vem sendo utilizada em trabalhos visando o diagnóstico e monitoramento da leishmaniose (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; FRANCINO et al., 2006; GOMES et al., 2007). Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicas presentes no parasito, sendo um método altamente sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp. em ampla variedade de amostras clínicas do homem, cães, reservatórios silvestres e vetores (GOMES et al., 2008). Dessa forma, para avaliação da acuidade diagnóstica das técnicas aplicadas nesse estudo a PCR foi considerada como padrão-ouro.

5.1 Hemocultura

Foram consideradas positivas na hemocultura as amostras em que foram visualizadas ao menos uma estrutura flagelada semelhantes à tripanossomatídeo (Figura 2).

Das 109 amostras de sangue dos gatos submetidas à hemocultura, 52 (47,7%) foram positivas e 57 (52,3%) negativas. Das 52 amostras positivas na hemocultura, apenas uma foi reagente pela RIFI.

Os resultados obtidos pelas hemoculturas nas 109 amostras de sangue dos gatos avaliados considerando a PCR como padrão-ouro podem ser observados na Tabela 1.



FIGURA 2 Imagem de um tripanossomatídeo flagelado (*seta*) obtida por microscopia óptica. NUPEZO- Botucatu-SP, 2011.

TABELA 1 Resultados das hemoculturas de 109 gatos provenientes de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Hemocultura		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	15	2	17
Negativo	37	55	92
Total	52	57	109

P McNemar < 0,0001

Concordância Observada = 0,6422

Concordância Esperada = 0,5158

Conclusão de Replicabilidade = Fraca

Na tabela 1 está apresentada a comparação dos métodos de PCR e hemocultura. Das 17 amostras positivas pela PCR, a hemocultura confirmou 15 e de 92 amostras negativas na PCR também 55 foram negativas na hemocultura. A concordância observada foi fraca, com um valor de Kappa = 0,26 (Tabela 2). A análise estatística dos resultados discordantes revelou diferença entre as técnicas ($P < 0,0001$).

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa da hemocultura para *Leishmania* spp., considerando a PCR como padrão-ouro podem ser observados na Tabela 2.

TABELA 2 Valores em porcentagem (%) de Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo (VPP) e Negativo (VPN), Acurácia e Coeficiente Kappa, pela Hemocultura considerando a Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2011.

(nr/np/nt) ¹	Sensibilidade ²	Especificidade ³	VPP ⁴	VPN ⁵	Acurácia ⁶	Kappa ⁷	P ⁸
(52/17/109)	88,2	59,8	28,8	96,5	64,2	0,2611	0,0001

⁽¹⁾nr: Número de resultados positivos pela hemocultura ; np: Número de diagnósticos positivos para *Leishmania* spp. pela técnica de PCR; nt: Total de gatos;

⁽²⁾Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos de *Leishmania* spp.);

⁽³⁾Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos de *Leishmania* spp.);

⁽⁴⁾Estimativa do valor preditivo positivo (% de diagnósticos positivos pela hemocultura, dado que o diagnóstico foi positivo pela técnica de PCR);

⁽⁵⁾Estimativa do valor preditivo negativo (% de diagnósticos negativos pela hemocultura, dado que o diagnóstico foi negativo pela técnica de PCR);

⁽⁶⁾Estimativa da acurácia (% de diagnósticos corretos pela hemocultura);

⁽⁷⁾Estimativa do coeficiente de concordância kappa;

⁽⁸⁾Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-leishmania.

Três amostras de sangue (2,7%) dos 109 gatos avaliados foram reagentes pela técnica de RIFI para *Leishmania* spp. Todas as amostras apresentaram títulos iguais a 40. Das 3 amostras em que os soros

apresentavam anticorpos anti-leishmania pela RIFI apenas uma foi positiva na hemocultura.

Os resultados obtidos pela RIFI nas 109 amostras de sangue dos gatos avaliados considerando a PCR como padrão-ouro podem ser observados na Tabela 3.

TABELA 3 Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos de *Leishmania* spp. em amostras de soro de 109 gatos provenientes de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	RIFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2	15	17
Negativo	1	91	92
Total	3	106	109

P McNemar = 0,0005

Concordância Observada = 0,8532

Concordância Esperada = 0,8251

Conclusão de Replicabilidade = Fraca

Na tabela 3 está apresentada a comparação dos métodos de PCR e RIFI. Das 17 amostras positivas pela PCR, a RIFI confirmou apenas 2 e de 92 amostras negativas na PCR 91 foram negativas na RIFI. A concordância observada também foi fraca, com um valor de Kappa = 0,16 (Tabela 4). A análise estatística dos resultados discordantes também revelou diferença entre as técnicas ($P < 0,0005$).

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa da RIFI para *Leishmania* spp., considerando a PCR como padrão-ouro podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4 Valores em porcentagem (%) de Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivo (VPP) e Negativo (VPN), Acurácia e Coeficiente Kappa, pela Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) considerando a Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2011.

(nr/np/nt) ¹	Sensibilidade ²	Especificidade ³	VPP ⁴	VPN ⁵	Acurácia ⁶	Kappa ⁷	P ⁸
(3/17/109)	11,8	98,9	66,7	85,8	85,3	0,1607	0,0067

⁽¹⁾nr: Número de resultados positivos pela RIFI ; np: Número de diagnósticos positivos para *Leishmania* spp. pela técnica de PCR; nt: Total de gatos.

⁽²⁾Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos de *Leishmania* spp.);

⁽³⁾Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos de *Leishmania* spp.);

⁽⁴⁾Estimativa do valor preditivo positivo (% de diagnósticos positivos pela RIFI, dado que o diagnóstico foi positivo pela técnica de PCR);

⁽⁵⁾Estimativa do valor preditivo negativo (% de diagnósticos negativos pela RIFI, dado que o diagnóstico foi negativo pela técnica de PCR);

⁽⁶⁾Estimativa da acurácia (% de diagnósticos corretos pela RIFI);

⁽⁷⁾Estimativa do coeficiente de concordância kappa;

⁽⁸⁾Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

5.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *L. (L.) chagasi*.

Das amostras colhidas de 109 gatos avaliados, 17 (15,6%) foram positivas à presença de DNA de *L. (L.) chagasi* e 92 (84,4%) foram negativas quanto à presença de DNA desse mesmo agente (Figura 2).

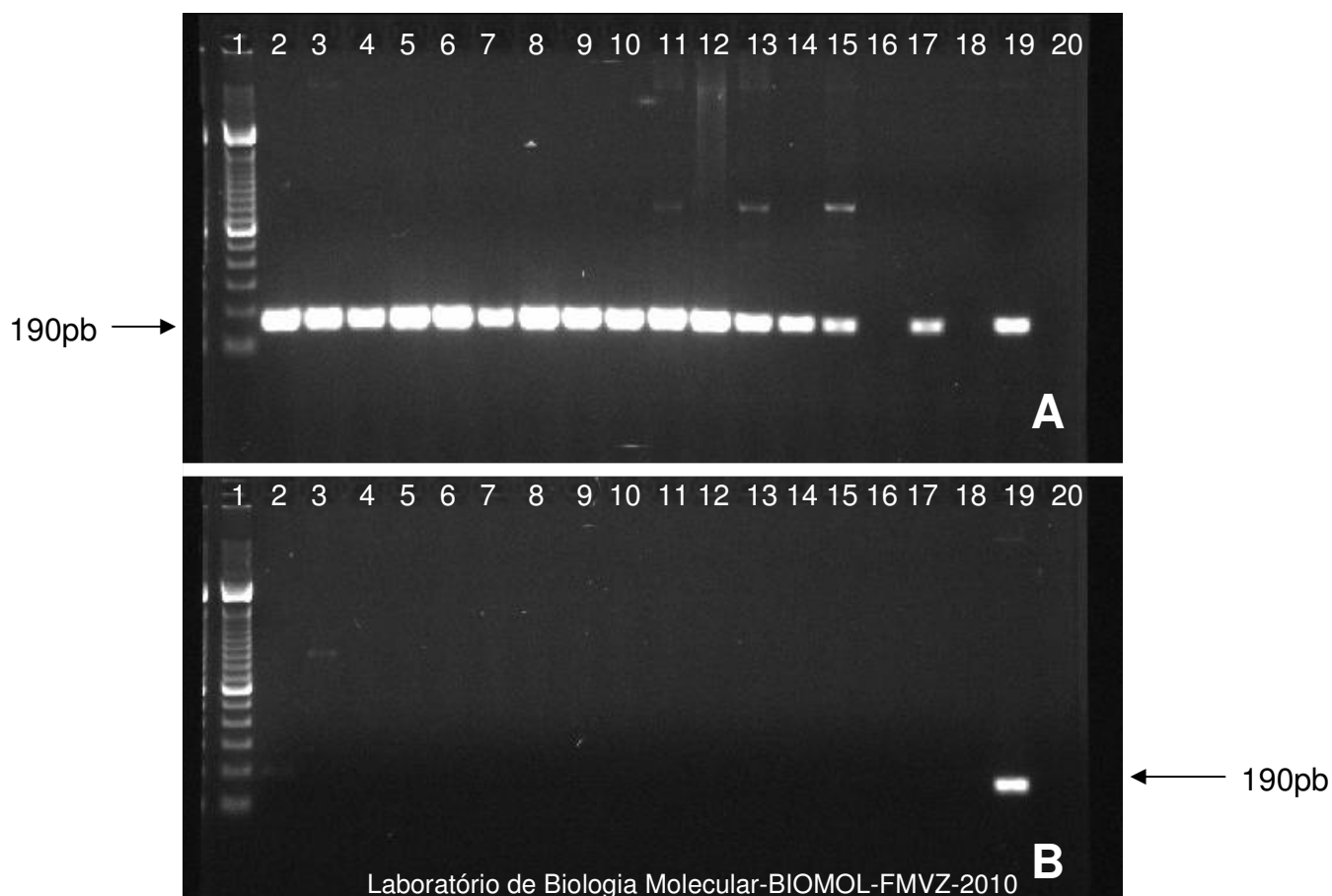


FIGURA 3 A e B: Produtos da amplificação dos fragmentos do minicírculo do kDNA de *Leishmania chagasi*, pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir das amostras de sangue de gatos de Birigui (SP). Amostras amplificadas utilizando os iniciadores Lc14 e Lc15. Gel em agarose 1,5%. Botucatu-SP, 2010. **A:** 1- Ladder 100 pb (Norgen); 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17- amostras positivas; 16,18-amostras negativas; 19-controle positivo; 20- controle negativo. **B:** 1- Ladder 100 pb (Norgen); 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18-amostras negativas; 19-controle positivo; 20- controle negativo.

Legenda: pb- pares de bases.

5.3.1 Limiar de detecção do DNA de *Leishmania chagasi* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O ensaio do limiar de detecção do parasito pela PCR foi realizado de acordo com a metodologia descrita no Anexo 8. Para isso, foi utilizada amostra de cepa de referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV de *L. (L.) chagasi* mantida em meio de cultura LIT e NNN, proveniente da Fiocruz-RJ (Figura 3).

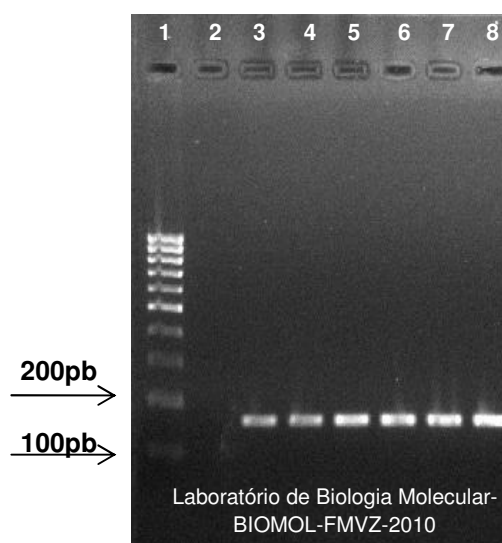


FIGURA 4 Visualização de banda de 190pb, em gel de agarose 1,5% mostrando os fragmentos de amplificação das diluições de *Leishmania chagasi* utilizando os *primers* Lc14 e Lc15 em água ultra-pura. Linhas 1) Ladder 100pb (Norgen), 2) Controle negativo, 3) DNA de *L.chagasi* (MHO/BR/2002/LPC-RPV) $1,0 \times 10^0$ parasitas/mL, 4) $1,0 \times 10^1$, 5) $1,0 \times 10^2$, 6) $1,0 \times 10^3$, 7) $1,0 \times 10^4$, 8) $1,0 \times 10^5$.

5.4 Exame clínico e questionário epidemiológico

Os resultados dos exames clínicos realizados em cada um dos 109 gatos avaliados bem como os resultados dos métodos diagnósticos empregados podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5 Estimativa da distribuição dos sinais clínicos segundo diagnóstico para *Leishmania chagasi* pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de 109 gatos provenientes de Birigui (SP). Botucatu – SP, 2011*.

Teste Utilizado	Assintomático	Linfoadenopatia	Emaciação	Alterações oculares	Hepato Esplenomegalia	Totais
PCR						
Positivo	14	0	3	0	0	17
Negativo	91	0	0	0	1	92
Totais	105	0	3	0	1	109
P	<0,0001	1,000	---	1,000	---	
RIFI						
Positivo	2	0	1	0	0	3
Negativo	102	0	3	0	1	106
Totais	104	0	4	0	1	109
P	<0,0001	1,000	0,3063	1,000	---	
Hemocultura						
Positivo	47	0	4	0	1	52
Negativo	57	0	0	0	0	57
Totais	104	0	4	0	1	109
P	0,3268	1,000	---	1,000	---	

*Teste qui-quadrado ($P < 0,05$) utilizando número de animais.

Não houve diferença estatística significativa entre os totais de animais positivos e negativos para Leishmaniose para os testes clínicos realizados quando utilizada as três técnicas de avaliação ($P > 0,05$), com exceção dos assintomáticos, que apresentaram diferença estatística entre o número de animais negativos e positivos ($P < 0,0001$) quando realizada a PCR e RIFI.

Os resultados do questionário referentes ao manejo sanitário como vacinação e vermifugação dos 109 gatos estudados encontram-se nos Quadros 2 e 3. Como o questionário foi preenchido pelo proprietário, alguns não responderam se o animal foi vermifugado e/ou vacinado mais de uma vez (questões 1 e 2 do questionário epidemiológico- Anexo 3). Portanto, as únicas respostas consideradas para essas avaliações de manejo sanitário são “sim” e “não”.

TABELA 6 Resultados da pergunta sobre a localização da área da casa que o gato habita respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Localização da área da casa	
	Zona Rural	Zona Urbana
Positiva	0	17
Negativa	0	92
P=1,0000		

A localidade da casa não influencia a positividade para leishmaniose ($P=1,0$). Dos gatos oriundos da Zona Urbana, houve uma maior quantidade de animais negativos do que positivos.



FIGURA 5 Imagem do corredor para acesso ao gatil da casa nº 11. Birigui (SP), 2009. Botucatu-SP, 2011.



BALDINI-PERUCA, L.C., Birigui, 2009.

FIGURA 6 Imagem do gatil da casa nº 11. Birigui (SP), 2009. Botucatu-SP, 2011.



BALDINI-PERUCA, L.C., Birigui, 2009.

FIGURA 7 Imagem do interior do gatil da casa nº 11. Birigui (SP), 2009. Notar a presença de um número elevado de animais em relação ao espaço físico (densidade populacional). Botucatu-SP, 2011.

TABELA 7 Resultados da pergunta quanto à esterilização do gato respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Castrado	
	Sim	Não
Positiva	1	16
Negativa	9	83
P=1,0000		

A castração não influenciou a positividade para leishmaniose (P=1,0). A incidência de animais negativos para leishmaniose foi maior do que animais positivos, independente da castração.

TABELA 8 Resultados da pergunta quanto ao ambiente que o gato habita respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Ambiente		
	Interno	Externo	Interno e externo
Positiva	11	2	4
Negativa	42	8	42
P=0,2366			

A localização de onde o gato vive não influenciou a positividade para leishmaniose (P=0,2366). A incidência de animais negativos para leishmaniose foi maior do que animais positivos, independente da localização.

TABELA 9 Resultados da pergunta quanto ao tipo de alimentação do gato respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Alimentação		
	Ração	Comida caseira	Ambas
Positiva	6	0	11
Negativa	45	0	47
P=0,5809			

A alimentação não influenciou a positividade para leishmaniose ($P=0,5809$). A incidência de animais negativos para leishmaniose foi maior do que animais positivos, independente da alimentação.

TABELA 10 Resultados da pergunta quanto ao hábito noturno do gato respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Sai à noite	
	Sim	Não
Positiva	10	7
Negativa	41	51
$P=0,2791$		

O fato de o gato sair à noite não influenciou a positividade para leishmaniose ($P=0,2791$). A incidência de animais negativos para leishmaniose foi maior do que animais positivos, independente de seus hábitos noturnos.

TABELA 11 Resultados da pergunta referente ao contato do gato com outro animal na mesma residência respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Outro animal	
	Sim	Não
Positiva	16	1
Negativa	76	16
$P=0,2295$		

A presença de outro animal não influenciou a positividade para leishmaniose ($P=0,2295$). A incidência de animais negativos para leishmaniose foi maior do que animais positivos.

TABELA 12 Resultados da pergunta quanto ao contato do gato com outro animal de residência vizinha respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP), segundo resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Botucatu-SP, 2011.

PCR	Contato com animal de outra casa	
	Sim	Não
Positiva	7	10
Negativa	18	74
P=0,0515		

O fato de o gato ter contato com animais de outras casas não influencia na positividade para leishmaniose ($P=0,0515$). A incidência de animais negativos para leishmaniose foi maior do que animais positivos, independente do contato com outros animais.

Os resultados do questionário referentes ao conhecimento do proprietário quanto à leishmaniose, os meios pelos quais obtiveram informações sobre a enfermidade e a forma de transmissão da mesma podem ser observados nas Figuras 13-17.

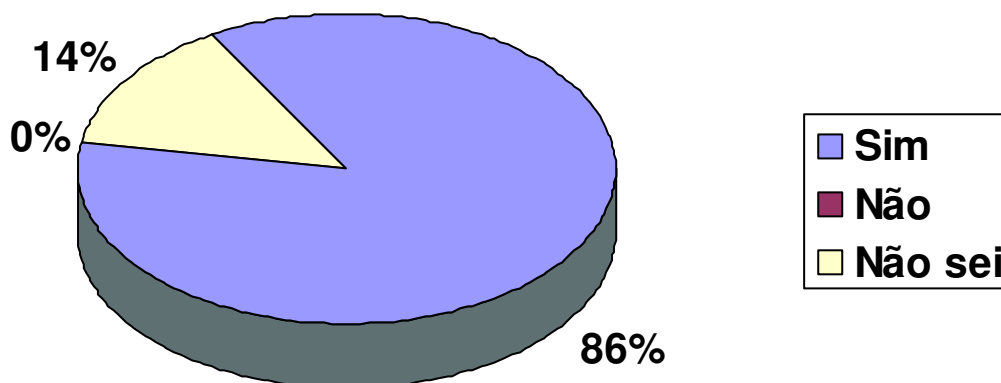


FIGURA 8 Resultado da questão “O Sr. acha que o cão pode pegar leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.

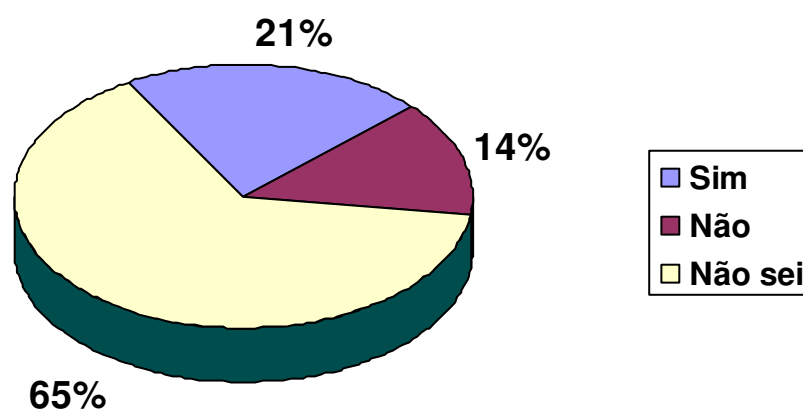


FIGURA 9 Resultado da questão “O Sr. acha que o gato pode pegar leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.

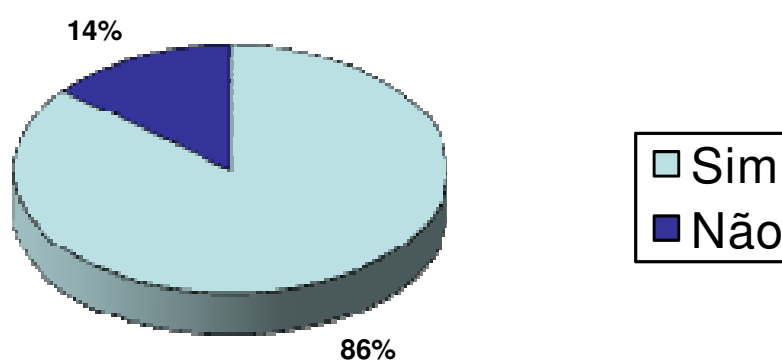


FIGURA 10 Resultado da questão “O Sr. sabe o que é leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.

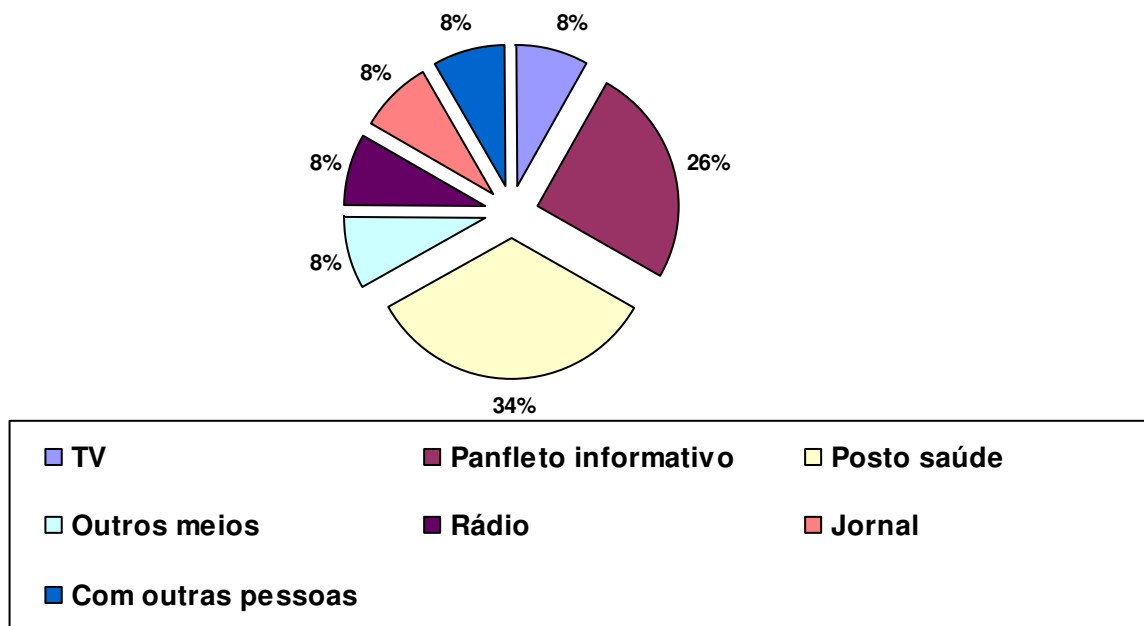


FIGURA 11 Resultado da questão “Por qual meio o Sr. ficou sabendo da leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.

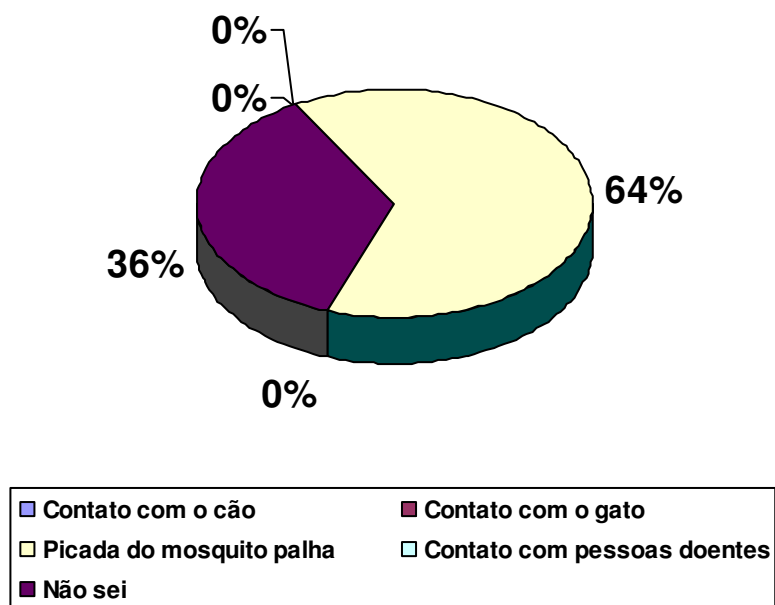


FIGURA 12 Resultado da questão “Como o Sr. acha que se pega leishmaniose?” respondida por proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011.

6. Discussão

6.1 Hemocultura

As hemoculturas são consideradas positivas quando, à microscopia óptica, visualiza-se a presença de parasitos flagelados que mantidos em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) podem ser caracterizados posteriormente por provas bioquímicas e/ou moleculares (AVELAR, 2008).

Apesar da hemocultura ter surgido como uma alternativa para melhorar a positividade dos métodos parasitológicos indiretos, Passos et al. (1996) não obtiveram sucesso na cultura em NNN de um fragmento de biopsia da lesão e, região interdigital de um gato. Em 2004, Savani et al. não detectaram parasitos em preparações de fragmentos de fígado e baço inoculados em ágar sangue com infusão cérebro coração. Contudo, Souza et al. (2005) observaram inúmeras formas promastigotas nos cultivos em NNN de aspirados de nódulos localizados na região nasal, orelhas e na região interdigital de um felino. O maior problema é a contaminação por bactérias e/ou fungos e, devido a isso, é uma técnica que requer condições assépticas para coleta e manuseio das amostras de sangue, além de possuir algumas outras limitações, como tempo prolongado para o resultado final (quatro meses) (JUNQUEIRA et al., 1996; CHIARI, 1999; DE CARLI, 2001).

Das 109 amostras de sangue dos gatos estudados, em 52 (47,7%) foi possível visualizar por meio de microscopia óptica estruturas flageladas semelhantes à *Leishmania*. Esse resultado é superior ao relatado por Braga (2009) que ao estudar 50 gatos provenientes de Botucatu (SP), observou 4% de positividade na hemocultura e 100% de negatividade pelo mesmo método em 50 gatos de Campo Grande (MS), áreas não-endêmica e endêmica para leishmaniose canina, respectivamente.

As formas flageladas observadas nas 37 amostras negativas à PCR e em 51 negativas à RIFI possivelmente são de outros tripanossomatídeos que não *Leishmania chagasi*. Isso devido à proximidade filogenética entre esses parasitos por pertencerem à mesma família (*Trypanosomatidae*), uma vez que diversos estudos demonstraram a reação cruzada existente em métodos

sorológicos além da apresentação morfológica ser semelhante em meios de cultivo. Além disso, a hemocultura possui baixa sensibilidade, sendo capaz de gerar resultados negativos ou falso-negativos, particularmente quando a parasitemia é baixa tornando a visualização dos parasitas por microscopia óptica dificultosa. Entretanto, no presente estudo a sensibilidade foi elevada. A sensibilidade e a especificidade da hemocultura observadas por Braga (2009), foram 69,4% e 71,4%, respectivamente, considerando também a PCR como padrão-ouro.

Das 57 hemoculturas negativas, 55 apresentaram resultados negativos equivalentes aos obtidos pela PCR, sendo que a técnica de hemocultura apresentou 59,8% de especificidade e 88,2% de sensibilidade, considerando a PCR como padrão-ouro.

Apenas dois gatos foram negativos à hemocultura e positivos à PCR, entretanto, apresentavam anticorpos anti-leishmania pela RIFI, com título 40. Ambos os resultados são provavelmente decorrentes da baixa carga parasitária no momento de colheita das amostras.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados da hemocultura e os obtidos pela PCR ($P < 0,05$) e a concordância indicada pelo índice Kappa foi fraca.

6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A soropositividade em 3 (2,7%) gatos com títulos iguais a 40 no presente estudo foi superior à relatada por Figueiredo et al. (2009) que avaliaram sorologicamente 43 gatos do município de Santa Rita de Cássia e não detectaram soropositividade em nenhum desses animais pela RIFI e à observada por Poli et al. (2002) em estudo realizado na Itália onde foi encontrada uma positividade de 0,9%, em 110 felinos avaliados pela RIFI.

Oliveira (2002) relatou soropositividade em 45 (50,5%) dos 89 gatos estudados no Brasil. Em Campo Grande (MS), Braga (2009) relatou soroprevalência de 30,0% pela RIFI em 50 amostras de sangue dos gatos avaliados, com títulos variando de 40 a 320. Da Silva et al. (2008) utilizando a RIFI para examinar oito amostras de soro de gatos, obtiveram duas (25,0%)

amostras positivas para *Leishmania* spp., com títulos entre 40 e 320. Maroli et al. (2007) detectaram soropositividade de 10,7 e 13,0% pela RIFI em amostras de sangue de gatos em dois estudos realizados em Fortaleza (CE). Na Europa, em 2007, na região sul da Espanha, Martín-Sanchez et al. relataram soroprevalência de 28,3% pela RIFI ao avaliarem amostras de sangue de 183 gatos. Maia et al. (2008) encontraram soropositividade de 17,3% em 23 gatos avaliados em Portugal. Na Espanha, Ayllon et al. (2008) detectaram anticorpos anti-*Leishmania* pela RIFI em amostras de sangue de 10 dos 233 gatos avaliados, com soroprevalência de 4,29%, superior à observada no presente estudo.

Das 3 amostras de sangue dos gatos estudados positivas pela RIFI, apenas duas (66,6%) foram positivas na PCR. Isso devido ao fato de provavelmente ter ocorrido reação cruzada com outro tripanossomatídeo que não *Leishmania* spp. Reações cruzadas entre *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. pela RIFI são relatadas em diversos estudos (SILVEIRA et al., 1996; BEARD et al., 2003; TRONCARELLI et al., 2008).

Cento e seis amostras foram não-reagentes pela RIFI para *Leishmania* spp., sendo que dessas, quinze (14,1%) apresentavam DNA do parasita *L. chagasi* detectado pela PCR. A sensibilidade e especificidade da RIFI foi de 11,8 e 98,9%, respectivamente, considerando a PCR como padrão-ouro. Braga (2009) ao avaliar 50 cães e 50 gatos em Campo Grande (MS) obteve especificidade de 78,6% e 70,0%, respectivamente. Costa et al. (2010) avaliaram 200 gatos em Araçatuba (SP), região endêmica para leishmaniose visceral canina e humana, e observaram uma prevalência de infecção em 11,5% desses pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) com valores de sensibilidade e especificidade de 25 e 89%, respectivamente, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Esses pesquisadores concluíram que a resposta imune à infecção por *Leishmania* spp. em gatos difere da observada em cães, cujos valores de sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos são maiores, o que possivelmente explica o pequeno número de gatos infectados e sintomáticos (COSTA et al., 2010). A sorologia de gatos infectados geralmente é menos específica que em cães, uma vez que a produção de anticorpos anti-leishmania spp é menor, podendo permanecer

soronegativos (POLI et al., 2002). Além disso, o surgimento de anticorpos leva um período variável após o estabelecimento da infecção. Contudo, tornam-se distintamente elevados após o desenvolvimento dos sinais clínicos ou a partir do momento em que é possível o isolamento do parasito. Há de se considerar também que uma parcela significativa da população nunca desenvolve altos títulos em resposta à infecção e não se torna clinicamente doente ou transmite o parasito (DYE et al.; 1993).

Houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados da RIFI e os obtidos pela PCR ($p < 0,05$) e a concordância indicada pelo índice Kappa foi fraca.

Apesar da sorologia validar o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, a detecção de anticorpos circulantes anti-leishmania em gatos não é igualmente observada nessa espécie e, portanto, não é o suficiente para determinar a infecção por *Leishmania* spp. em gatos (MAIA et al., 2010). Além disso, a baixa especificidade da RIFI observada no presente estudo sugere que essa técnica sem associação ao teste molecular, pode subestimar o número real de gatos infectados facilitando, dessa forma, a transmissão do agente. Inquéritos sorológicos realizados por diferentes técnicas demonstraram que a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. nos gatos examinados ao redor do mundo variou de zero a 68,0% (POLI et al., 2002). Estudos em gatos que determinem valores de sensibilidade e especificidade da RIFI são escassos. Dessa forma, torna-se necessário o aumento de pesquisas que objetivem a associação dos métodos diagnósticos sorológicos e moleculares a fim de elucidar valores de sensibilidade e especificidade das técnicas para a espécie felina.

6.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

No presente estudo foi detectado DNA de *L. (L.) chagasi* em 17 (15,6%) das 109 amostras de sangue dos gatos avaliados. Esse resultado é acentuadamente inferior ao encontrados por Maia et al. (2008) em que observaram a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 30,4% das amostras de sangue de 23 gatos estudados. Por outro lado, está próximo do relatado por Maia et al. (2010) ao detectarem DNA de *Leishmania infantum* em 28 (20,3%) dos 138 gatos avaliados em Lisboa. Ayllon et al. (2008) detectaram DNA de *Leishmania infantum* em apenas um gato (0,43%) dos 233 estudados.

Dos 92 gatos negativos pela PCR apenas um (1,1%) foi positivo pela RIFI e 37 (40,2%) pela hemocultura. Isso pode ocorrer devido a alguns fatores como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do agente e às reações cruzadas com outros tripanossomatídeos que possibilitam resultados falso-positivos.

Em 17 amostras de sangue dos 109 gatos avaliados foram detectados DNA de *Leishmania chagasi*, sendo que dessas, 15 (88,2%) foram positivas na hemocultura e duas (11,8%) apresentaram anticorpos anti-leishmania. Coelho et al. (2010) relataram o primeiro caso de leishmaniose felina de Andradina (SP), área endêmica para leishmaniose visceral canina e humana, em que detectaram DNA de *L. (L.) chagasi* a partir de citologia aspirativa de linfonodo poplíteo. Apesar da detecção do DNA do parasita pela PCR, a RIFI foi negativa para *Leishmania* spp. A dificuldade de visualização do parasita em microscopia óptica proveniente de amostras de sangue cultivadas e a provável resistência dos gatos em relação ao agente justificam os resultados observados nesse estudo.

A PCR para *Leishmania* spp. a fim de amplificar um número diferente de alvos de DNA usando sangue periférico como amostra clínica mostrou ser uma alternativa não invasiva altamente eficiente para o diagnóstico da infecção, mostrando sensibilidades de 82% a 100% e especificidade de 100% (Singh et al., 1999; Lachaud et al., 2000; Xiao-Su et al., 2000; Fisa et al., 2002).

Em 2004, Savani et al. relataram um caso clínico de um gato com lesão nodular na região nasal diagnosticado com leishmaniose visceral apresentando título 80 para *Leishmania* spp. e DNA de *L. chagasi* pela PCR.

A presença de DNA de *L. chagasi* no sangue periférico de gatos sugere que esses animais que vivem em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina e humana são frequentemente expostos ou infectados por esse parasita (MAIA et al., 2010).

6.4 Exame clínico e questionário epidemiológico

Dos 109 gatos avaliados clinicamente, oito (7,4%) apresentaram emaciação, apenas um (0,9%) hepato/esplenomegalia e 100 (91,7%) não apresentavam qualquer alteração clínica. Dos oito gatos com emaciação, em três (37,5%) foram detectados DNA de *L. chagasi*, um (12,5%) apresentou soropositividade pela RIFI e quatro (50,0%) foram positivos na hemocultura. Quatorze (82,4%) gatos positivos pela PCR, 2 (66,7%) positivos pela RIFI e 57 (90,4%) positivos pela hemocultura eram assintomáticos. Costa et al. (2010) encontraram alterações clínicas em 25,0% dos gatos soropositivos para *Leishmania* spp. Porém, segundo Portús et al. (2002) o número de gatos infectados e sintomáticos é pequeno. Portanto, assim como no cão, uma grande parte dos gatos positivos em pelo menos um dos testes diagnósticos avaliados nesse estudo é assintomática.

Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os resultados dos animais assintomáticos e os obtidos pela RIFI e PCR.

Quanto aos resultados da vacinação, vermifugação, localização da área da casa, esterilização, ambiente em que o gato vive, tipo de alimentação, hábito noturno e contato direto e/ou indireto com outro animal não houve diferença estatisticamente significativa confrontando-se com os resultados da positividade para leishmaniose pela PCR.

Quando questionados sobre conhecimentos gerais de leishmaniose, dos 14 proprietários, 86,0% acreditam que o cão pode contrair leishmaniose, 65,0% acreditam que o gato pode contrair leishmaniose, 86,0% sabem o que é leishmaniose e 64,0% acreditam que a forma de contágio da leishmaniose é

pela picada do mosquito palha. Dos 86,0% dos proprietários que sabem o que é leishmaniose, 34,0% obtiveram essa informação via postos de saúde, 26,0% por meio de panfletos informativos, 8,0% por rádio, 8,0% por TV, 8,0% por jornal, 8,0% por outros meios e 8,0% por meio de outras pessoas. A maior parte dos proprietários está ciente quanto à existência da leishmaniose principalmente canina e humana e o meio de informação que se mostrou mais eficiente foi o posto de saúde.

7- Conclusões

- A *Leishmania chagasi* está presente em gatos de Birigui (SP), área endêmica para leishmaniose canina e humana, destacando-se que gatos provenientes de áreas endêmicas para leishmaniose canina e humana são frequentemente expostos ao agente, podendo se infectar, desenvolver sintomatologia clínica e parasitemia e serem considerados reservatórios para *Leishmania chagasi*.
- É necessária a associação de diferentes métodos diagnósticos, para aumentar a acuidade diagnóstica com maiores especificidade e sensibilidade.
- Os resultados do questionário epidemiológico revelam que grande parte dos proprietários avaliados está ciente sobre a leishmaniose canina e humana e obtiveram informações sobre a enfermidade principalmente em postos de saúde e por meio de panfletos informativos.
- As avaliações quanto à vacinação, vermifugação, localização da área da casa, esterilização, ambiente em que o gato vive, tipo de alimentação, hábito noturno e contato direto e/ou indireto com outro animal não revelaram qualquer diferença estatisticamente significativa.

8- Bibliografia

ALVAR, J., YACTAYO, S., BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**.22(12):552–7, 2006.

ANDRADE, A.M.; QUEIROZ, L.H.; NUNES, G.R.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Reposição de cães em áreas endêmicas para leishmaniose visceral. Ver **Soc Br Med Trop**, v.40. n.5, p.594-595, 2007.

ANDRADE, A.M.; QUEIROZ, L.H.; PERRI, S.H.V.; NUNES, C.M. Estudo descritivo da estrutura populacional canina da área urbana de Araçatuba, São Paulo, Brasil, no período de 1994 a 2004. **Cad. Saúde Pública**, v.24. n.4, 2008.

AVELAR, J.B. **Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas**. 2008. 69p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

AYLLON, T., TESOURO, M.A., AMUSATEGUI, I., VILLAESCUSA, A., RODRIGUES-FRANCO, F., SAINZ, A. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. **Ann N Y Acad Sci**. 1149:361-4, 2008.

BEARD, C.B, PYE, G., STEURER, F.J., RODRIGUEZ, R., CAMPMAN, R., PETERSON, A.T., RAMSEY, J., WIRTZ, R.A., ROBINSON, L.E. Chagas Disease in a domestic transmission cycle, southern Texas, USA. **Emerg. Infect. Dis**. v.9, n.1, 2003.

BRAGA, A.R.C. Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose. Botucatu, 2009, 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Informação e documentação – Referências – Elaboração*: NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS preview database*. Philadelphia, 1996. 468p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília; 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p.9-18, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. *In*: Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 186-7, 2005.

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Vigilância e Controle das Leishmanioses. Brasília; 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leish.pdf>. Acessado em: 20/04/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 2010. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Acessado em: 18/04/2011.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJA, S., PEELING, R.W., ALVAR, J., BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews**. 5, 873-82, 2007.

CHIARI, E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.299-300, 1999.

COELHO, W.M.D., LIMA, V.M.F., SOUTELO, R.V.G, AMARANTE, A.F.T, GENNARI, S.M., MEIRELES, M.V., APOLINÁRIO, J.C., BRESCIANI, K.D.S. Ocorrência de anticorpos contra *Leishmania* spp. em gatos domésticos do município de Andradina-SP-Brasil. **Vet e Zootec**, v.15, n.2, p.75, 2008.

COELHO, W.M.D., LIMA, V.M.F., AMARANTE, A.F.T, DO AMARANTE, A.F.T., LANGONI, H., PEREIRA, V.B.R., ABDELNOUR, A., BRESCIANI, K.D.S. Ocorrência de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em gato doméstico (*Felis catus*) em Andradina-SP-Brasil: relato de caso. **Vet e Zootec**, v.19, n.4, p.256-58, 2010.

COSTA, T.A.C., ROSSI, C.N., LAURENTI, M.D., GOMES, A.A.D., VIDES, J.P., SOBRINHO, L.S.V., MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de áreas endêmicas para leishmaniose visceral. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.47, n.3, 2010.

DA SILVA, A. V. M.; CÂNDIDO, C. D. S.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. 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.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATOS, L.; BRITO, F.L.C.; FIGGUEREDO, L.A.; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose Felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, ano XI, n. 61, p.32-39, 2006.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico de Parasitoses Humanas**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ, 2001,810p,

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiol. Infect.**, v.103, p.647-656, 1993.

FEITOSA, M.M. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente infectados. In: FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, I, Jaboticabal, SP, 2006. **Anais...** p.8-13.

FERREIRA, P. Leishmaniose. Glossário de doenças-IOC-Fiocruz. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6&tpl=printerview>. Acessado em: 27/07/2010, 2006.

FIGUEIREDO, F.B., BONNA, I.C., NASCIMENTO, L.D., COSTA, T., BAPTISTA, C., PACHECO, T.M., AMENDOEIRA, M.R. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. Ver. **Soc. Bras. Med. Trop.** 42(2):141-5, 2009.

FISA, R.; RIEIRA, C.; GÁLLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Vet Parasitol**, v.99, n.2, p. 105-111, 2001.

FOLHA DA REGIÃO (2007). Birigui registra 269 casos de leishmaniose em cachorros. Disponível em <http://espanholi.blogspot.com/2008/05/birigi-registra-269-casos-de.html>

FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANOGALLEGU, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SANCHEZ, A., ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v.137, p. 214-221, 2006.

GOMES, A. H.S.; FERREIRA, I. M.R.; LIMA, M. L.S.R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 144, p. 234–241, 2007.

GOMES, Y.M., CAVALCANTI, M.P., LIRA, R.A., ABATH, F.G.C., ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, p.338-349, 2004.

GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3 ed. Canadá: Saunders/Elsevier, p.1387, 2006.

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 scamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v.12, n.3, p.271-275, 2005.

HERVÁS, J.; CHACON, M.; DE LARA, F. Granulomatous (psuedotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniasis in a cat. **Veterinary Record**, v.149, p.624-625, 2001.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V.G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in Dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Vet. Parasitol.**, v.113, p.99-103, 2003.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of North-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90 p. 129-132, 1996.

LACHAUD, L., DEREURE, J., CHABBERT, E., MAUBOUSSIN, J.M., OZIOL, E., DEDET, J.P., BASTIEN, P. Optimised PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J. Clin. Microbiol.** 38, 236-240, 2000.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p.210-215, 2002.

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

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

LUVIZOTTO, M.C.R.; BIAZZONO, L.; EUGENIO, F.R.; ANDRADE, A.L.; MOREIRA, M.A.B. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 2., Águas de Lindóia, SP. Anais..., Águas de Lindóia, 1999, p.24.

MAIA, C., GOMES, J., CRISTÓVÃO, J., NUNES, M., MARTINS, A., REBÊLO, E., CAMPINO, L. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Vet. Parasitol.** 15, 174(3-4):336-40, 2010.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 2008.

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

MANCIANTI, F., MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterelectrophoresis. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, p.1409-1411, 1988.

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

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

MAURÍCIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, pt.3, p.236-246, 1999.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.39, p.103-106, 2002.

MORENO, E., MELO, M.N., ANTUNES, C.M.F., LAMBERTUCCI, J.R., SERUFO, J.C., ANDRADE-RIBEIRO, A.S. et al. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. Informe Epidemiológico do SUS. 11: 37-9, 2002.

NUNES, V.L.B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Vet Parasitol** v.128, p.41-45, 2005.

OLIVEIRA, A.L.L., PANIAGO, A.M.M., DORVAL, M.C.E., OSHIRO, E.T., LEAL CR, SANCHES, M. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 39:446-450, 2002.

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). **Veterinary Ophthalmology**, v.3, p.35-41, 2000.

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

PORTÚS, M.; GÁLLEGO, M.; RIERA, C.; AISA, M.; FISA, R.; CASTILLEJO, S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). **Revista Iberica de Parasitologia**, v. 62, p. 72, 2002.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J.C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*. 7(9):581–96, 2007.

ROSSI, C.N. Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba-SP-Brasil. 2007, 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Encontro da *Lutzomyia edwardsi* infectada na região da Grande São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v.39, n.1, 2005.

SERRANO A. C. M.; NUNES C. M.; DE LIMA V. M. F.; BONELLO F.L.; SAVANI E.S.M. M.; D'AURIA S. R. N.; VASCONCELOS, R. O.; BRESCIANI K. D. S. Primeiro relato de leishmaniose em felino da região endêmica de Araçatuba, SP. **Rev Clin Vet**, 2008.

SHAW, J; GRIMALDI, G.; CUPOLILLO, E. Identificação de *Leishmania*. In: COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, v. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 733-737.

SILVEIRA, T.G.V., TEODORO, U., LONARDONI, M.V.C, TOLEDO, M.J.D., BERTOLINI, D.A., ARRAES, S.M.A.A., FILHO, D.V. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v.12, n.1, p.89-93, 1996.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; BEVILAQUA, C.M.L.; PRATA-JÚNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.; BASTOS, K.M.S.; COELHO, Z.C.B.; COELHO, I.C.B.; BARRAL, A.; POMPEU, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 127, p. 199-208, 2005.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M. J., COSTA, D. C., PRATA-JR., J. R.C.; BEVILAQUA, C.M.L., SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Vet. Parasitol.** v. 103, p. 207-216, 2002.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Leishmaniose visceral-casos notificados confirmados no Sinan. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acessado em: 05/08/2011.

SINGH, N., CURRAN, M.D., RASTOGIL, A.K., MIDDLETON, D., SUNDAR, S. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. **Trop. Med. Int. Health** 4, 448-453, 1999.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.N.; MARIN, G.R.B.; SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.9, p.951-958, 2002.

TRONCARELLI, M.Z., MACHADO, J.G., CAMARGO, L.B., HOFFMANN, J.L., CAMOSSO, L., GRECA, H., FACCIOLI, P.Y., LANGONI, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Rev. Vet. Zoot.**, v.15, n.1, p.40-47, 2008.

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

WHO, 2001. World Health Organization (WHO). Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. <http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsrir2001.html/Leishmaniasis/Leishmaniasis.htm>.
issue date last accessed: 26/07/2010, 2001.

WHO, 2004 Word Health Organization (WHO), 2004. Division of control of tropical disease. Disponível URL
<http://www.who.int/emc/disease/leish/leisgeo1.html>.

WHO, 2007. World Health Organization (WHO). Cutaneous leishmaniasis: Why are you neglecting me? Neglected Tropical Disease. Available in: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>, Accessed in: 25/07/2010.

WHO, 2010. Word Health Organization (WHO). Leishmaniasis: background information. Available on line: URL <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, issue date last accessed: 27/07/2010, 2010.

XIAO-SU, H., WEN-TIAN, Y., HONG-GANG, L., HE-PING, Y., JIAN-PING, C., YING, M., BAO-QIAN, J., TAO, Z. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. **J. Parasitol.** 86, 822-826, 2000.

ZIVICNJAK, T.; MARTINKOVIC, F.; MARINCULIC, A.; MRLJAK, V.; KUCER, N.; MATIJATKO, V.; MIHALJEVIC, Z.; BARIC-RAFAJ, R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. **Vet. Parasitol.**, v.131, p.35-43, 2005.

Anexo 1 Atestado de aprovação do projeto de pesquisa pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FMVZ - UNESP/Botucatu.



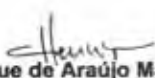
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins, que o Projeto "**Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de áreas endêmicas para Leishmaniose visceral**", Protocolo nº 198/2008-CEEA, de **Luciana Cristina Baldini Peruca**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 21 de outubro de 2008.


Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu



FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br



Anexo 2 Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido assinado por 14 proprietários de 109 gatos provenientes de Birigui (SP). Borucatu-SP, 2011.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIO EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 196/96 –CNS-MS)

Eu, _____, concordo e estou ciente de que as informações contidas no projeto “Infecção por *Leishmania chagasi* em gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral” objetiva o levantamento de dados sobre os cuidados dispensados aos animais e da possibilidade da transmissão de doenças adquiridas pelo convívio e pela alimentação.

Estas informações trarão um retorno de medidas de auxílio na prevenção e controle destas doenças.

Autorizo também numa fase posterior a coleta de materiais dos animais para análise de toxoplasmose, leishmaniose e leptospirose, entre outros, para detecção de risco de contaminação entre animais e humanos.

_____	_____
<i>Responsável pela família</i>	<i>Entrevistador membro do projeto</i>

Birigui, _____ de _____ de 2009.

Anexo 3 Questionário epidemiológico aplicado aos 14 proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011. Parte 1: Informações gerais.

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA OS PROPRIETÁRIOS DOS GATOS ESTUDADOS N° casa _____

PARTE 1: Informações Gerais

1. Em que área sua casa está localizada?
☐ 1- zona rural ☐ 2- zona urbana
2. Seu gato é proveniente de qual município?
☐ 1-Araçatuba ☐ 2-Birigui ☐ 3- Outros
3. Seu gato é castrado?
☐ 1-não ☐ 2-sim
4. Como vive seu gato?
☐ 1-dentro de casa ☐ 2- fora de casa ☐ 3- dentro E fora de casa
5. Qual a alimentação de seu gato?
☐ 1-ração ☐ 2- comida caseira ☐ 3-os dois
6. Seu gato sai de casa à noite?
☐ 1-não ☐ 2-sim
7. Além do gato, o Sr. possui outro animal dentro ou próximo de sua casa?
☐ 1-sim: ☐ cão ☐ gato ☐ cavalo ☐ porco ☐ aves ☐ outros
☐ 2-não
8. Seu gato tem contato com outros animais de outras casas?
☐ 1-sim: ☐ cão ☐ gato ☐ cavalo ☐ porco ☐ aves ☐ outros
☐ 2-não
9. O Sr. sabe o que é leishmaniose? Como o Sr. ficou sabendo?
☐ 1- sim: ☐ a- TV ☐ b- panfleto informativo ☐ c-rádio ☐ d-posto de saúde/hospital
☐ 2-não ☐ e- jornal ☐ f- com outras pessoas ☐ g-outros meios
10. O Sr.acha que o cão pode pegar leishmaniose?
☐ 1- não ☐ 2-sim
☐ 3- não sabe
11. O Sr. acha que o gato pode pegar leishmaniose?
☐ 1-não ☐ 2-sim ☐ 3- não sabe
12. Como o Sr. acha que se pega leishmaniose?
☐ 1- pelo contato com o cão ☐ 2-pela picada do flebótomo (mosquito palha ou birigui ou cangalinha)
☐ 3- pelo contato com o gato ☐ 4- pelo contato com pessoas doentes ☐ 5- não sabe

Anexo 4 Questionário epidemiológico aplicado aos 14 proprietários de 109 gatos de Birigui (SP). Botucatu-SP, 2011. Parte 2: Informações específicas.

PARTE 2. Informações Específicas Nº Casa: _____ RG _____

Nome Animal: _____ Sexo: _____ Idade: _____

1. O animal foi vacinado?

☐ 1-sim

☐ 2-não

2. O animal foi vermifugado?

☐ 1-sim

☐ 2-não

3. Apresenta lesões de pele e/ou alterações clínicas visíveis?

☐ 1-sim: ☐ L-linfadenopatia ☐ E-emaciação ☐ AO-alterações oculares ☐ H/E-hepato/esplenomegalia

☐ 2-não

Anexo 5 Meio líquido: Liver Infusion Tryptose (LIT)

Para 250mL:

- 1- Descongelar o soro fetal bovino e calibrar o pHmetro;
- 2- Dissolver em 100mL de água MILI-Q em Kitassato de 500 mL;
 - a. Na_2HPO_4 : 2 g
 - b. NaCl: 1g
 - c. KCl: 0,1g
- 3- Adicionar mais 44,5 mL de água MILI-Q ao kitassato;
- 4- Montagem do filtro: Colocar a membrana milipore sobre a camada interna do filtro respeitando posição dela no suporte onde está guardada. Colocar a aureola de plástico sobre a membrana. Fechar o filtro com a parte superior e rosquear até encontrar resistência. Acoplar ao kitassato, cobrir com papel alumínio de modo que nenhuma abertura fique exposta e vedar com papel rosado e fita adesiva.
- 5- Autoclavar, por 15 minutos à 121°C , a suspensão de sais, duas pipetas de 20 mL e oito a doze tubos de LIT (30 X 2,6 cm);
- 6- Em outro erlenmeyer de 250 mL , dissolver 0,75g de infusão de fígado, em 100 mL de água MILI-Q aquecida (30 segundos no micro-ondas). Esta água aquecida deve estar a uma temperatura que o dorso da mão suporte;
- 7- Adicionar a esta suspensão:
 - a. Dextrose: 0,5g
 - b. Tryptose: 1,25g e ajustar o pH 7,4;
- 8- Quando a temperatura do kitassato diminuir de modo que o dorso da mão suporte, pode-se abrir, cuidadosamente, a parte superior do kitassato. Deve-se acoplar a mangueira da bomba de vácuo na extremidade lateral do kitassato, para auxiliar no processo de filtração do líquido. Além disso, deve-se envolver o local onde a mangueira de bomba de vácuo e a extremidade lateral do kitassato se unem, com um algodão embebido de álcool-iodado;
- 9- Ligar a bomba de vácuo, a uma pressão de 200-300 mmHg;
- 10- Filtrar a suspensão de infusão de fígado e carboidratos;

11-Após a filtração da suspensão anterior adicionar 5,5 mL de hemoglobina 2,2%;

12-Ao término da filtração, deve-se fechar a extremidade superior do filtro e vedar com algodão embebido em álcool-iodado;

13-Colocar duas pipetas de 10 mL, dois tubos de BHI (controle de esterilidade), o soro fetal bovino, 8-12 tubos de LIT, duas seringas de 5 mL, duas agulhas 30X7 mm, todos previamente autoclavados, dentro da câmara de fluxo laminar e deixar sob a ação da luz UV por 15 minutos. Deve-se submeter o kitassato e um frasco de Gentamicina (Gentocin® – 20mg ou 40 mg) a ação da luz UV, juntamente com os materiais mencionados acima.

14-Após estes 15 minutos, adicionar ao kitassato:

a. Soro fetal bovino: 30 mL

b. Gentamicina: 20 mg:1mL/40mg:0,5mL

15-Homogeinizar bem o meio. Pipetar de 1-2 mL de LIT para o primeiro tubo de BHI, 30 ml em cada tubo de LIT e ao final, 1-2 mL para o segundo tubo de BHI;

16-Manter sob controle de esterilidade por 48 horas em estufa 37°C.

Anexo 6 Solução Salina Tamponada (PBS) estéril / pH 7,2

Quantidades de reagentes para 1 litro:

NaCl _____ 8,183g

Na₂HPO₄ _____ 1,0516g

Na₂HPO₄.H₂O _____ 0,358g

NaH₂PO₄ _____ 0.3105g

Autoclavar quinze minutos a 121 °C.

Anexo 7 Extração de DNA das hemoculturas utilizando o kit comercial Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®)

- ❖ Pipetar 900 µL de tampão RBC (lysis) em microtubo de 1,5mL, livre de RNases e DNases.
- ❖ Adicionar 300 µL da amostra
- ❖ Homogeneizar por inversão dos tubos.
- ❖ Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- ❖ Centrifugar à 12.000 rpm por 20 segundos ou 1000 rpm por dois segundos.
- ❖ Remover o sobrenadante.
- ❖ Deixar cerca de 50 µL e adicionar 20 µL de proteinase K
- ❖ Homogeneizar os tubos em vórtex rapidamente.
- ❖ Adicionar 500 µL de tampão extração (lysis buffer – “extraction solution”) para suspender as células brancas e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.
- ❖ Permanecer em temperatura ambiente por 10 minutos.
- ❖ Colocar coluna no tubo coletor.
- ❖ Pré-aquecer à 70°C o “elution buffer”.
- ❖ Transferir o incubado para coluna.
- ❖ Centrifugar à 8.000 rpm por dois minutos ou 1200 rpm por um minuto.
- ❖ Descartar o sobrenadante e voltar o tubo coletor a coluna GFX.
- ❖ Adicionar 500 µL de “wash solution” à coluna GFX.
- ❖ Centrifugar à 12500 rpm por três minutos.
- ❖ Desprezar tubo coletor e colocar coluna GFX em microtubo de 1,5mL livre de RNases e DNases.
- ❖ Adicionar 200 µL de “elution buffer” à 70°C diretamente na matriz coluna GFX.
- ❖ Permanecer um minuto à temperatura ambiente.
- ❖ Centrifugar à 12000 rpm por um minuto.
- ❖ Estocar à -20°C.

Anexo 8 Limiar de Detecção da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi utilizada a amostra de *Leishmania chagasi* proveniente de repique em meio de cultura LIT e NNN, utilizada na rotina do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP Botucatu – SP a partir de amostra de cepa de referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV de *Leishmania chagasi* proveniente da Fiocruz (RJ). Foram pipetados 5 ml de meio LIT com formas promastigotas viáveis de dois diferentes tubos de cultura em tubo Falcon de 15 ml. O tubo permaneceu 15 minutos em banho maria a 56 °C para que as promastigotas permanecessem imóveis durante o procedimento de contagem. A amostra foi homogeneizada e parte dela utilizada para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Foram procedidas seis contagens de cinco dos quadrantes menores, de maneira bem distribuída por toda câmara. A média obtida nos cinco quadrantes foi de 127 formas promastigotas. Para obtenção do número de parasitos por mL de meio de cultura foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de promastigotas contadas} / 0,1 \text{ mm}^3 \cdot 10,2 = n^{\circ} \text{ promastigotas/mL}$$

Sendo: 0,1 a altura da câmara de Neubauer
 1 a diluição utilizada na contagem, ou seja, meio de cultura puro
 0,2 o número de campos contados dividido pelo número total de campos (5/25)

Então: $127/0,02 = 6.350$ promastigotas/mL ou seja **$6,35 \times 10^3$ /mL**

Para se obter valores em potências de 10, realizou-se regra de três para obtenção do volume de meio de cultura que possui 1000 formas promastigotas (10^3):

$$\begin{array}{ll} 1 \text{ mL} & \text{-----} 6.350 \\ X \text{ mL} & \text{-----} 1.000 \end{array} \quad x = 0,1575 \text{ ml ou } \mathbf{157,5 \mu L}$$

Em seguida, utilizaram-se 157,5 μ L de meio de cultura em 842,5 μ L de água destilada totalizando 1 mL de amostra, ou seja, 10^3 parasitos por mL de solução.

As diluições seguintes foram realizadas de maneira que as soluções resultantes nos novos tubos ficassem 10 vezes mais diluídas que no tubo anterior, produzindo concentrações 10^2 , 10^1 e 10^0 formas promastigotas por mL de solução.

As soluções resultantes foram utilizadas para extração do DNA, utilizando o mesmo protocolo de extração das amostras. O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores LIN R4 e LIN 19, para que se pudesse obter a concentração mínima de parasitos por mL de amostra detectável nas provas.

Apêndice 1

Nomes, números e respectivas casas dos 109 gatos de Birigui (SP).
Botucatu-SP, 2011.

Nome gato	Nº projeto	Nº casa
Samanta	1	1
Pimpolho	2	1
Rico	3	1
Tifu	4	1
Topázio	5	1
Diamante	6	1
Oncinha	7	1
Menina	8	1
Bina	9	1
Mia	10	1
Preta	11	2
Berilo	12	2
Jelly	13	2
Joko	14	2
Chico	15	2
Mailon	16	2
Kiko	17	2
Tiago	18	2
poposa	19	2
Esquila	20	3
Menina	21	3
Vesga	22	3
Bilu	23	3
Mamadinho	24	3
Negão	25	3
Obama	26	4
Fix	27	4
Totó	28	4
Piqui	29	4
Branco	30	4
Negão	31	4
Pretinho	32	4
Buguinha	33	5
Corinthiano	34	5
Pimpolho	35	5
Neguinha	36	5
Nego	37	5
Suzi	38	5
Rajadinha	39	5
Menino	40	5

Branca e cinza	41	5
Branco dos olhos verdes	42	6
Siamesa	43	7
Lili	44	7
Baby	45	8
Vanderlita	46	9
Léo	47	9
Tica	48	10
Tricolor	49	10
Gordinha	50	10
Meg	51	11
Gabi	52	11
Ceginho	53	11
Rajado	54	11
Nego	55	11
Buiu	56	11
Branco	57	11
Rafael	58	11
Branquinho	59	11
Tom	60	11
Chiquito	61	11
Zé Bonitinho	62	11
Siamês	63	11
Amarelo	64	11
Preto	65	11
Corinthiana	66	11
Branca	67	11
Buiuzinha	68	11
Rajada	69	11
Pretinha	70	11
Preta	71	11
Pintada	72	11
Preta e branca	73	11
Moeda	74	11
Tartaruga	75	11
Zizi	76	11
Toco	77	11
Lilica	78	11
Cabeluda	79	11
Grandona	80	11
Rajadinha	81	11
Pretinha brava	82	11
Preta calma	83	11
Doidinha	84	11
Cinzenta	85	11
Menina	86	11
Brinquedo	87	11
Kelinha	88	11
Pimenta	89	11
Kelly Key	90	11
Amarelinho	91	11

Loirinho	92	12
Amarelão	93	12
Nina	94	12
Branca	95	12
Ana	96	12
Moça	97	12
Thuthuca	98	12
Kinuti	99	12
Chumbinha	100	12
Fofa	101	13
Miucha	102	13
Assucena	103	13
Malhado	104	13
Keter	105	13
Jader	106	13
Natacha	107	13
Fofão	108	14
Sombrinha	109	14

Apêndice 2

Número de identificação dos 109 gatos provenientes de Birigui (SP) e os respectivos resultados da PCR, RIFI e Hemocultura.

Nº	PCR		RIFI			Hemocultura	
	Positivo	Negativo	Positivo	Título	Negativo	Positivo	Negativo
1		X			X	X	
2	X		X	40			X
3		X			X	X	
4		X			X	X	
5	X				X	X	
6		X			X		X
7		X			X		X
8		X			X	X	
9		X			X	X	
10		X			X		X
11		X			X	X	
12		X			X		X
13		X			X	X	
14		X			X	X	
15		X			X		X
16		X			X	X	
17		X			X		X
18		X			X	X	
19		X			X		X
20		X			X		X
21		X			X		X
22		X			X		X
23		X			X	X	
24		X			X		X
25		X			X		X
26		X			X		X
27		X			X	X	
28		X			X	X	
29		X			X		X
30		X			X	X	
31		X			X	X	
32		X			X	X	
33		X			X	X	
34		X			X		X
35		X			X		X
36	X				X	X	
37		X			X		X
38		X			X	X	
39		X			X		X
40	X		X	40		X	
41		X			X		X

42		X			X		X
43	X				X	X	
44	X				X	X	
45	X				X	X	
46		X			X		X
47		X			X		X
48		X			X		X
49	X				X	X	
50		X			X	X	
51	X				X	X	
52		X			X	X	
53		X	X	40			X
54		X			X	X	
55		X			X		X
56	X				X	X	
57	X				X	X	
58		X			X	X	
59		X			X	X	
60	X				X	X	
61		X			X	X	
62		X			X		X
63	X				X	X	
64	X				X		X
65		X			X		X
66		X			X	X	
67		X			X	X	
68		X			X	X	
69		X			X		X
70		X			X	X	
71		X			X		X
72		X			X	X	
73		X			X	X	
74		X			X		X
75	X				X	X	
76		X			X		X
77		X			X	X	
78		X			X		X
79		X			X		X
80		X			X		X
81	X				X	X	
82		X			X	X	
83		X			X		X
84		X			X		X
85		X			X		X
86		X			X	X	
87		X			X		X
88		X			X	X	
89		X			X		X
90		X			X		X
91		X			X	X	
92		X			X		X

93		X			X		X
94		X			X		X
95		X			X		X
96		X			X		X
97		X			X		X
98		X			X		X
99		X			X		X
100	X				X	X	
101		X			X		X
102		X			X		X
103		X			X	X	
104		X			X		X
105		X			X		X
106		X			X		X
107		X			X		X
108		X			X		X
109		X			X	X	

Número de identificação dos 109 gatos provenientes de 14 residências distintas de Birigui (SP) e respectivos resultados do questionário epidemiológico, manejo sanitário e exame clínico.

Parte 1 Informações Gerais														Parte 2 Informações específicas																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
Nº GATO	Nº CASA	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9			P10		P11			P12			Sexo		Ioad a	P1		P2		P3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
		1	2	1	2	3	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	M		F	A	F	1	2	1	2	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
		R1		a		b		c		d		e		f		g																								A H/ L E O E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
1	1	X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X

[illegible]

[illegible]

1 TRABALHO CIENTÍFICO A SER ENVIADO PARA A REVISTA

2 VETERINARY PARASITOLOGY

3
4 **Infection by *Leishmania chagasi* in cats from an endemic area for leishmaniasis**
5 **in dogs and in human beings.**

6
7
8 **L.C. Baldini-Peruca^{a,*}, H. Langoni^a, S.B. Lucheis^b**

9 ^a*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista,*
10 *Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P.560, Brasil*

11 ^b*Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios-APTA-Pólo Centro Oeste, Av.*
12 *Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil*

13
14
15
16
17
18 *Corresponding author. Tel +55 14 38116270

19 e-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br (Hélio Langoni)

22 **Abstract**

23 The visceral leishmaniasis is a disease of great impact in the public health and of world
24 significance. It affects man and wild and domestic animals, such as dogs and cats. The
25 transmission occurs by the sting of phlebotomine vectors of the *Lutzomyia* gender. This
26 work was aimed to study the occurrence of *Leishmania (L.) chagasi* in cats from an
27 endemic area for canine and man leishmaniasis using Indirect Immunofluorescence
28 Reaction (IFA), hemoculture and Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Leishmania*
29 (*L.*) *chagasi* diagnostic methods, compare the results of these methods as for the
30 specificity and sensibility, and make an epidemiologic search through a questionnaire
31 answered by the owners of the cats assessed. Blood samples were collected from 109
32 cats from Birigui (SP), an endemic region for canine and man visceral leishmaniasis.
33 From 109 blood samples, 52 (47,7%) were positive in hemocultures, three (2,7%) in
34 the IFA and 17 (15,6%) in the PCR. According to the results found one can conclude
35 that cats from endemic areas for canine and man leishmaniasis are frequently exposed
36 to the agent, they can infect themselves, develop a clinical symptomatology and
37 parasitemia, therefore being considered *Leishmania chagasi* reservoirs. It is also
38 required an association of serological and molecular techniques to increase the
39 diagnostic accuracy and, consequently, elucidate the true role of a cat in the
40 epidemiological cycle of the visceral leishmaniasis.

41

42 **Keywords:** *Leishmania (L.) chagasi*, cat, Indirect Immunofluorescence Reaction,
43 hemoculture, Polymerase Chain Reaction.

44

45

46

47 **Introduction**

48 The leishmaniasis are groups of diseases of great impact in the public health
49 and of a worldwide importance. They are endemic in 88 countries affecting man, wild
50 and domestic animals such as dogs and cats (Who, 2004). Among the domestic
51 animals, dogs are involved in the domestic transmission in human beings, mailing in
52 cases of infection by *Leishmania (L.) chagasi* (Simões-Mattos et al., 2002). However,
53 the market urbanization along with the canine leishmaniasis control with deltametrina-
54 based collars, led to the involvement of other domestic species in the epidemiology of
55 these disease in endemic spots, such as cats (Da Silva et al., 2008).

56 Several diagnostic methods have been used for identification of leishmaniasis in
57 dogs and human beings (Gontijo, 2004). Hemoculture is a parasitological test that
58 requires the presence of parasite in an amount sufficient for their visualization in an
59 optical microscope. Parasitological examinations allow the view of amastigote form
60 inside the macrophage or in the free form (Simões-Mattos et al., 2005; Greene, 2006).
61 Serological examinations such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and
62 indirect fluorescent antibody test (IFAT) are other diagnostic methods used for the
63 detection of *Leishmania* spp. Antibodies. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a
64 sensitive and highly specific method for the detection of parasite DNA, despite of the
65 patient's immunocompetence and clinical history, showing safe results in few hours
66 (Ikonomopoulos et al., 2003).

67 According to Information System on Diseases of Compulsory Declaration
68 (Sinan), in 2009 and 2010 were 23 and 20 notified and confirmed cases of human
69 visceral leishmaniasis (VL), respectively, in Araçatuba city located 11 Km from Birigui
70 city, both cities of São Paulo state, Brazil, endemic areas for canine and human
71 visceral leishmaniasis. In Birigui it was reported and confirmed only one case of human
72 VL in 2009, and in 2010 there were three cases (SINAN, 2011).

73 Currently, Brazil presents the highest number of feline leishmaniasis (FL) cases
74 in the world, but its distribution in the country remains uncertain, being reported in
75 several Brazilian states. Despite of this, the true role of the cat in the VL
76 epidemiological cycle is still unknown.

77 Consequently, the accomplishment of studies that may elucidate the true role of
78 the cat in the LV zoonotic cycle by means of the association of serological and
79 molecular methods for better diagnostic accuracy is highly necessary.

80 **Material and methods**

81 **Animals and samples**

82 Five to eight mL of blood from 109 domestic cats (46 males and 63 females) of
83 mixed breed and ages, but with a bigger prevalence of young adults were collected.
84 This material was used for hemoculture, IFAT and PCR. The blood collected was
85 divided in vacuntainer tubes with and without EDTA. In the lab the samples of the tubes
86 without EDTA were promptly centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes in order to obtain
87 the serum which was frozen at -20°C until they were submitted to IFAT. The samples
88 kept in tubes with EDTA were submitted to hemoculture.

89 The 109 cats from 14 homes were submitted to an individual clinical exam
90 before the blood collection. Lose of weight, lymphadenopathy, splenomegaly,
91 hepatomegaly and information about sanitary management of these animals, such as
92 vermifugation and vaccination were reported. Issues related to the residential area of
93 the animal, physiological state, environment where the animal lives, nutrition, night
94 habits and possible direct or indirect contact with other animals were answered by the
95 owners. Information about the owners' knowledge related to leishmaniasis was
96 obtained.

97

98 **Hemoculture**

99 Plasmatic, leucocitary and red blood cell sediment portions of each blood
100 sample with EDTA were separated. Each portion was inoculated in a tube with 5,0 mL
101 of Liver Infusion Tryptose (LIT). The cultures were kept at 28-30°C for four months and
102 further submitted to PCR.

103 The first examination was done after ten days from the inoculation under an
104 optical microscope at a 1,000X magnification. The further examinations were observed
105 every 15 days for four months. Both positive and negative cultures were immediately
106 processed for the DNA extraction after the four months.

107 **Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)**

108 The *Leishmania* spp antigen kept by the Zoonoses Research Nucleus
109 (NUPEZO) at FMVZ-UNESP/Botucatu-SP was used in the IFAT for anti-*Leishmania*
110 spp. antibodies. The entire *Leishmania* organism (promastigote) was fixed on the
111 slides. Serum samples, as well as positive and negative controls were diluted in PBS,
112 pH 7.2, starting from 1:40. Samples were considered positive when titers were 40 or
113 higher.

114 **Polymerase chain reaction (PCR)**

115 **DNA extraction**

116 From hemoculture the DNA extraction was performed by means of Blood
117 Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®) commercial kit, according to the
118 manufacturer's instruction.

119 **PCR for the analysis of *Leishmania (L.) chagasi* DNA**

120 PCR procedures were carried out at the Laboratory of Applied Molecular
121 Biology for Zoonosis Diagnosis (FMVZ-UNESP/Botucatu-SP). The PCR mixture was

122 composed of 5 μ L of 10X PCR buffer minus Mg / 1 mL (50 mmol KCl, 10 mmol Tris-
 123 HCl), 8 μ L dNTPs [25 mM (250 μ L) 1:20] , 1.5 μ L magnesium chloride (50mM / 1mL),
 124 0.3 μ L *Platinum Taq*-polymerase [500 U (5 U/ μ L)], 5 μ L of LIN R4 primer (10 pmol;
 125 MW= 6,317.1 ; 28.7 nmol = 0.18 mg) and 5 μ L of LIN 19 primer (10 pmol; MW=
 126 5,085.3 ; 80.6 nmol = 0.41 mg) , 15.2 μ L ultrapure water and 10 μ L of the test sample
 127 [DNA extraction product (100 μ g/mL)]. The mixture was placed in 0.2 mL reaction tubes
 128 to produce a final volume of 50 μ L. The amplification conditions in the thermocycler
 129 (GeneAmp PCR System 9600) were as follows: initial denaturation in one cycle at 95°C
 130 for 3 minutes, followed by 32 cycles at 95°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds and
 131 72°C for one minute, and a final extension at 72°C for seven minutes (Ikonomopoulos et
 132 al., 2003). For the amplification of the fragments in kDNA minicircles, the primers used
 133 were LC14 (5' – CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG-3') and LC15 (5' –
 134 TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA-3').

135 These primers were designed and tested at Laboratory of Applied Molecular
 136 Biology for Zoonosis Diagnosis (FMVZ-UNESP/Botucatu-SP) using the analyses of
 137 Primer3 and PrimerBLAST programs. In this reaction the final product presents 190
 138 base pairs (bp) corresponding to the amplification of the segment that contains specific
 139 region of *L. (L.) chagasi* kDNA minicircles.

140 Aliquots of 10 μ L of amplified samples were stained with 2 μ L of bromophenol blue
 141 and submitted to 2% agarose gel horizontal electrophoresis with Tris-borate-EDTA (TBE)
 142 buffer 0.5X and stained with 2 μ L ethidium bromide. Electrophoresis was carried out at
 143 100V for 60 minutes. Amplified products were observed in an ultraviolet transilluminator
 144 with a 300 nm wavelength. Gels were photographed using a Kodak Digital Science
 145 DC40[®] camera.

146 Positive control was the *L. (L.) chagasi* strain (obtained from culture stock in Liver
 147 Infusion Tryptose medium). Promastigotes were transferred to a 1.5 mL microtube and

148 killed in water bath at 60° C during 60 minutes. *Leishmania* DNA was extracted using the
149 commercial kit and the extraction product was added to the mix-PCR.

150 Negative controls were: 1) ultrapure water (DNA extraction negative control) that
151 was added to the mix-PCR; 2) mix-PCR (PCR negative control). The molecular weight
152 standard was provided by DNA Ladder® (Invitrogen).

153 **Results**

154 **Hemoculture**

155 Flagellar structures were found in 47.7% (52/109) samples and 53.2% (57/109)
156 samples resulted negative (Figure 1). Sensitivity and specificity values were 88.2% and
157 59.8%, respectively, considering the PCR to be the gold standard, with Kappa
158 coefficient 0.2611. Statistically, there was significant difference in the sensitivity or
159 specificity values from hemoculture, according to McNemar's test (Mackinnon, 2000).

160 **IFAT**

161 IFAT was able to detect antibodies against *Leishmania* spp. in 2.7% (03/200).
162 All samples present title equal 40. Sensitivity and specificity values were 11.8% and
163 98.9%, respectively, considering the PCR to be the gold standard, with Kappa
164 coefficient 0.16. Statistically, there was significant difference in the sensitivity or
165 specificity values from IFAT, according to McNemar's test using $P<0.0005$ (Mackinnon,
166 2000).

167 **PCR for *Leishmania (L.) chagasi***

168 Positive PCR for *L. (L.) chagasi* DNA was identified only in 15.6% (17/109) of
169 the studied animals. Two cats that showed antibodies against *Leishmania* spp. in IFAT
170 were positive by PCR. From the 17 samples which showed *L. (L.) chagasi* DNA, 15
171 were positive in hemoculture too.

172 Figure 2 showed the results of the fragments amplification of *L. (L.) chagasi*
 173 kDNA minicircles in PCR using LC14 and LC15 primers.

174 **Epidemiological interview**

175 Vaccination, vermifugation, residential area of the animal, physiological state,
 176 environment where the animal lives, nutrition, night habits and possible direct or
 177 indirect contact with other animals did not influence the presence of leishmaniasis.

178 Eighty six per cent and 65.0% of owners think that dogs and cats may be
 179 infected by *Leishmania* spp., respectively, 86.0% of them have some knowledge about
 180 leishmaniasis and 64.0% believe transmission was due to sand fly. From the 86.0% of
 181 the owners aware of leishmaniasis, 34.0% got some information via health care posts,
 182 26.0% by means of informative leaf lefts, 8.0% by radio, 8.0% by TV, 8.0% by
 183 newspaper, 8.0% by other means and 8.0% through other people.

184 **Discussion**

185 Passos et al (1996) did not obtain success in NNN culture of the lesion biopsy
 186 fragment from interdigital region of the cat, despite of the hemoculture being a tentative
 187 of enhancing the positivity of the methods. In 2004, Savani et al detected no parasite in
 188 spleen and liver fragments inoculated in blood agar with heart-brain infusion. However,
 189 Souza et al (2005) reported several promastigote forms in NNN culture of the nodes
 190 aspirated in nasal region and hears of the cat. The major problem has been the
 191 contamination by bacteria and/or fungi. This technique requires aseptic conditions and
 192 limitations such as high time for the final result (four months) (Junqueira et al., 1996;
 193 Chiari, 1999; De Carli, 2001).

194 From 109 samples in 47.7% (52/109) flagellar structures were viewed by optical
 195 microscopy similar to *Leishmania* spp. This result is higher than that reported by Braga
 196 (2009) who has studied 50 cats from Botucatu, São Paulo, Brazil and has obtained

197 4.0% of hemoculture positivity and 100% of negativity in this method in 50 cats from
 198 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil non endemic and endemic areas for
 199 canine leishmaniasis, respectively.

200 The promastigotes observed in 37 negative samples to PCR, and in 51 negative
 201 samples to IFAT are likely to be other organisms rather than *L. chagasi*. Hemoculture is
 202 a low sensibility method, creating negative results, mainly when the parasite load is low
 203 with makes the visualization hard. However, this study showed high sensibility values.
 204 Hemoculture sensibility and specificity obtained by Braga (2009) were 69.4% and
 205 71.4%, respectively, considering the PCR to be the gold standard.

206 Only two cats were negative to hemoculture and positive to PCR, probably
 207 because in two samples it hasn't been found flagellar structures, rather it hasn't been
 208 detected antibodies anti-*Leishmania* by IFAT. Both results were due to a low parasite
 209 load in collection time.

210 Only three cats resulted positive by IFAT in this study while Figueiredo et al
 211 (2009) obtained no positive result in evaluation of 43 cats in Santa Rita de Cássia, São
 212 Paulo, Brazil. Poli et al (2002) observed 0.9% of positivity by IFAT in 110 felines in
 213 Italy.

214 Oliveira (2002) reported seropositivity in 50.5% (45/89) studied in Brazil. In
 215 Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, Braga (2009) reported seroprevalence of
 216 30.0% by IFAT in 50 blood samples of cats and titles ranging from 40 to 320. Da Silva
 217 et al (2008) using IFAT for the examination of eight serum samples of cats obtained
 218 two (25.0%) positive for *Leishmania* spp. with titles ranging from 40 to 320. Maroli et al
 219 (2007) detected seropositivity ranging from 10.7% and 13.0% by IFAT in blood
 220 samples of cats in two studies performed in Fortaleza, Ceará, Brazil. In Europe, 2007,
 221 Martín-Sanchez et al (2007) reported seroprevalence of 28.3% by IFAT when they
 222 studied blood samples of 183 cats. In Portugal, Maia et al (2008) found seropositivity

223 17.3% in 23 cats. Ayllon et al (2008) detected antibodies anti-*Leishmania* by IFAT in
224 blood samples of 10 out of 233 cats studied, with seroprevalence 4.29%.

225 The cross-reaction between *Leishmania* spp. and *Trypanossoma cruzi* are
226 common and possibly explains only one positive sample by IFAT and negative by PCR
227 (Silveira et al, 1996; Beard et al, 2003; Troncarelli et al, 2008).

228 One hundred and six samples were non-reaction by IFAT for *Leishmania* spp.
229 and 14.1% (15/106) present *L. chagasi* DNA detected by PCR. Sensibility and
230 specificity of IFAT were 11.8% and 98.9%, respectively, considering the PCR to be the
231 gold standard. Braga (2009) obtained a lower specificity value (70.0%) when evaluating
232 50 cats of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil and sensibility of 80.6% and
233 specificity of 78.6% by IFAT in 50 dogs of the same region. Costa et al (2010) studied
234 200 cats in Araçatuba, São Paulo, Brazil, an endemic area for human and canine
235 visceral leishmaniasis and observed prevalence of infection in 11.5% by ELISA with
236 sensibility and specificity values of 25.0% and 89.0%, respectively, considering the
237 direct parasitological exam to be the gold standard. They concluded that the immune
238 answer to infection by *Leishmania* spp. in cats is different when compared with dogs.
239 This specie presents higher sensibility and specificity values of serological methods
240 (Costa et al, 2010). Serological results of infected cats in general are less specific than
241 that in dogs, because the antibodies output against *Leishmania* spp. is lower keeping
242 them seronegatives (Poli et al, 2002). Besides, the arising of antibodies leads to a
243 variable period after the onset of the infection. Of major importance is the consideration
244 that a meaningful amount of the population has never developed high titles as an
245 answer to infection and it doesn't show clinical signs or transmit the parasite (Dye et al,
246 1993).

247 Despite the validation of the diagnostic for canine visceral leishmaniasis by
248 serology, the detection of circulating antibodies anti-*Leishmania* in cats is not equally

249 observed in this specie and, thus, it's not enough to determine an infection by
250 *Leishmania* spp. in cats (Maia et al, 2010). In addition, the low specificity of IFAT
251 observed in the present study suggest that this technique without association to the
252 molecular test can underestimated the real number of infected cats making a parasite
253 transmission easier. Serological investigations performed by different techniques
254 showed that the prevalence of antibodies for *Leishmania* spp. in cats examined all
255 around the world ranged from zero to 68.0% (Poli et al., 2002). Studies in cats that
256 determine sensibility and specificity values of IFAT are poor. Thus, the increasing of
257 researches which aim to an association of serological and molecular diagnostic
258 methods in other to elucidate sensibility and specificity values of these techniques for
259 felines is required.

260 In the current study it has been detected *L. chagasi* DNA in 15.6% (17/109) of
261 the cats assessed. This result is markedly lower to those by Maia et al (2008) where
262 the presence of *Leishmania* spp. DNA was observed in 30.4% of the blood samples of
263 23 cats studied. On the other hand, it is close to that reported by Maia et al (2010)
264 where they detected *Leishmania infantum* DNA in 20.3% (28/138) of the evaluated cats
265 in Lisbon. Ayllon et al (2008) detected *Leishmania infantum* DNA in only one (0.43%)
266 out of 233 cats studied.

267 From 92 negative cats by PCR only one (1.0%) resulted positive by IFAT and
268 37 (40.2%) by hemoculture. This can happen due to some factors such as the
269 presence of circulating antibodies in the peripheral blood even after the elimination of
270 the agent and to the cross-reactions with other flagellar structures that can lead to
271 false-positive results.

272 Coelho et al. (2010) reported the first case of feline leishmaniasis in Andradina
273 (SP), an endemic area for canine and human visceral leishmaniasis. They detected
274 *Leishmania chagasi* DNA from the aspiration cytology of popliteal lymph nodes.

275 Despite the detection of the parasite DNA by PCR, IFAT showed to be non reactive for
276 *Leishmania* spp. The difficulty of visualization of the parasite from cultivated blood
277 samples through optical microscope and the possible resistance of cats concerning the
278 agent support the results observed in this study.

279 The PCR for *Leishmania* spp. in order to widen de different number of targets of
280 DNA using peripheral blood as a clinical sample showed to be a non invasive
281 alternative, highly efficient for the infection diagnosis, showing sensibilities from 82.0%
282 to 100.0% and specificities of 100.0% (Singh et al., 1999; Lachaud et al., 2000; Xiao-
283 Su et al., 2000; Fisa et al., 2002).

284 In 2004, Savani et al. reported a clinical case of a cat with a nodular lesion on
285 the nose diagnosed as a visceral leishmaniasis with title 80 for *Leishmania* spp. and *L.*
286 *chagasi* by PCR.

287 The presence of *L. chagasi* DNA in the peripheral blood of cats suggests that
288 these animals that live in endemic areas for canine and human visceral leishmaniasis
289 are frequently exposed or infected by that parasite (Maia et al., 2010).

290 From 109 clinically assessed cats, eight (7.4%) showed emaciation, only one
291 (0.9%) hepatomegaly and splenomegaly and 100 (91.7%) did not show any clinical
292 change. Fro eight cats with emaciation, *L. (L.) chagasi* DNA was detected in three
293 (37.5%), one (12.5%) showed seropositivity by IFAT and four (50.0%) were positive in
294 hemoculture. Fourteen (82.4%) cats positive by PCR, two (66.7%) positive by IFAT and
295 57 (90.4%) positive by hemoculture presented asymptomatic. Costa et al (2010) found
296 clinical changes in 25.0% of the seropositive cats for *Leishmania* spp. However,
297 according to Portús et al. (2002) the number of infected and symptomatic cats is small.
298 Thus, like in the dog, a great amount of positive cats in at least one of the diagnostic
299 tests assessed in this study is asymptomatic.

300 The absence of significant statistic difference relating to the vaccination,
301 vermifugation, residential area of the animal, physiological state, environment where
302 the animal lives, nutrition, night habits and possible direct or indirect contact with other
303 animals and leishmaniasis suggests low interference between environment, life stile
304 and nutrition of the cat with the agent susceptibility.

305 The great majority of owners is aware of the existence of leishmaniasis mainly
306 canine and human, and the means of the information which showed to be more
307 efficient was the health post.

308 **Conclusions**

309 The results obtained indicate the occurrence of *L. (L.) chagasi* in cats form
310 Birigui, São Paulo, Brazil, an endemic area for canine and human visceral
311 leishmaniasis. The association of the three diagnostic methods used: hemoculture,
312 IFAT and PCR showed to be of major importance for better diagnostic accuracy of
313 leishmaniasis in the cats studied. As for dogs, most cats assessed in this study showed
314 to be asymptomatic. It is suggested a greater number of researches aiming to help the
315 determination of the real role of the cat in the epidemiological cycle of visceral
316 leishmaniasis.

317 **Ethics Committee Approval**

318 The present study was approved by the Ethics Committee for Animal
319 Experimentation of FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, protocol # 198/2008-CEEA, on
320 October 21th, 2008.

321 **Acknowledgements**

322 We would like to thank the Research and Development National Council
323 (CNPq) for the Masters degree grant, and the technical staff at the Zoonosis Control
324 Center (ZCC) in Birigui for authorizing this study and for the help with the animals.

325 **References**

- 326 Avelar, J.B. Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de
327 mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas. 2008. 69p. Dissertação
328 (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- 329 Ayllon, T., Tesouro, M.A., Amusategui, I., Villaescusa, A., Rodrigues-Franco, F., Sainz,
330 A. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central
331 Spain. Ann N Y Acad Sci. 1149:361-4, 2008.
- 332 Beard, C.B, Pye, G., Steurer, F.J., Rodriguez, R., Campman, R., Peterson, A.T.,
333 Ramsey, J., Wirtz, R.A., Robinson, L.E. Chagas Disease in a domestic transmission
334 cycle, southern Texas, USA. Emerg. Infect. Dis. v.9, n.1, 2003.
- 335 Braga, A.R.C. Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação
336 em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de
337 área endêmica e não endêmica para leishmaniose. Botucatu, 2009, 100p. Dissertação
338 (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu,
339 Universidade Estadual Paulista.
- 340 Chiari, E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture
341 and Serologic Methods. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.94, p.299-300, 1999.
- 342 Coelho, W.M.D., Lima, V.M.F., Soutelo, R.V.G, Amarante, A.F.T, Gennari, S.M.,
343 Meireles, M.V., Apolinário, J.C., Bresciani, K.D.S. Ocorrência de anticorpos contra
344 *Leishmania* spp. em gatos domésticos do município de Andradina-SP-Brasil. Vet e
345 Zootec, v.15, n.2, p.75, 2008.
- 346 Costa, T.A.C., Rossi, C.N., Laurenti, M.D., Gomes, A.A.D., Vides, J.P., Sobrinho,
347 L.S.V., Marcondes, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de áreas endêmicas para
348 leishmaniose visceral. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.47, n.3, 2010.

- 349 Da Silva, A. V. M.; Cândido, C. D. S.; Pereira, D. P.; Brazil, R. P.; Carreira, J. C. A. The
350 first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro,
351 Brazil. *Acta Tropica*, v.105 p. 92-94, 2008.
- 352 De Carli, G. A. *Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório*
353 *para o Diagnóstico de Parasitoses Humanas*. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ,
354 2001,810p.
- 355 Dye, C.; Vidor, E.; Dereure, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting
356 infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.*, v.103, p.647-656, 1993.
- 357 Figueiredo, F.B., Bonna, I.C., Nascimento, L.D., Costa, T., Baptista, C., Pacheco, T.M.,
358 Amendoeira, M.R. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in
359 dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa,
360 State of Rio de Janeiro. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(2):141-5, 2009.
- 361 Fisa, R.; Rieira, C.; Gállego, M.; Manubens, J.; Portus, M. Nested PCR for diagnosis of
362 canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates.
363 *Veterinary Parasitology*, v.99, n.2, p. 105-111, 2001.
- 364 Gontijo, C.M.F.; Melo, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e
365 perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, p.338-349, 2004.
- 366 Greene, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3 ed. Canadá: Sauders/Elsevier,
367 p.1387, 2006.
- 368 Ikononopoulos, J.; Kokotas, S.; gazouli, M.; Zavras, A.; Stoitsiou, M.; Gorgoulis, V.G.
369 Molecular diagnosis of leishmaniosis in Dogs. Comparative application of traditional
370 diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.*, v.113,
371 p.99-103, 2003.

- 373 Junqueira, A.C.V.; Chiari, E.; Wincker, P. Comparison of the polymerase chain reaction
374 with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an
375 endemic region of North-eastern Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical
376 Medicine and Hygiene, v.90 p. 129-132, 1996.
- 377 Lachaud, L.; Marchergui-Hammami, S.; Chabbert, E.; Dereure, J.; Dedet, J.P.; Bastien,
378 P. Comparision of six PCR methods using pri'heral blood for detection of canine
379 visceral leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, v.40, n.1, p.210-215, 2002.
- 380 Mackinnon, D.P. Introduction to statistical mediation analysis. New York: Routledge
381 Academic, 2000. 488p.
- 382 Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L.
383 Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. Vet.
384 Parasitol. 15, 174(3-4):336-40, 2010.
- 385 Maia, C.; Nunes, M.; Campino, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in
386 Portugal. Vector Borne Zoonotic Dis., 2008.
- 387 Maroli, M.; Penissi, M. G.; Muccio,T.; Khoury C.; Gradoni, L.; Gramiccia, M. Infection of
388 sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology
389 v.145, p. 357-360, 2007.
- 390 Martín-Sanchez, J.; Acedo, C., Muñoz-Pérez, M.; Pesson, B.; Marchal, O.; Morillas-
391 Márquez, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain.
392 Veterinary Parasitology v.145, p. 267-273, 2007.
- 393 Oliveira, A.L.L., Paniago, A.M.M., Dorval, M.C.E., Oshiro, E.T., Leal CR, Sanches, M.
394 Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. Rev. Soc.
395 Bras. Med. Trop. 39:446-450, 2002.

- 396 Poli, A.; Abramo, F.; Barsotti, P.; Leva, S.; Gramiccia, M.; Ludovisi, A., Mancianti, F.
 397 Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. Veterinary Parasitology, v.
 398 106, p. 181-191, 2002.
- 399 Portús, M.; Gállego, M.; Riera, C.; Aisa, M.; Fisa, R.; Castillejo, S. Wild and domestic
 400 mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature
 401 review and studies performed in Catalonia (Spain). Revista Iberica de Parasitologia, v.
 402 62, p. 72, 2002.
- 403 Silveira, T.G.V., Teodoro, U., Lonardoni, M.V.C, Toledo, M.J.D., Bertolini, D.A., Arraes,
 404 S.M.A.A., Filho, D.V. Investigação sorológica em cães de área endêmica de
 405 leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, Sul do Brasil. Cad. Saúde Públ., v.12,
 406 n.1, p.89-93, 1996.
- 407 Simões-Mattos, L.; Mattos, M.R.F.; Teixeira, M.J.; Oliveira-Lima, J.W.;Bevilaqua,
 408 C.M.L.; Prata-Júnior, R.C.; Holanda, C.M.; Rondon, F.C.M.;Bastos, K.M.S.; Coêlho,
 409 Z.C.B.; Coêlho, I.C.B.; Barral, A.; Pompeu, M.M.L. The susceptibility of domestic cats
 410 (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. Vet. Parasitol., v.
 411 127, p. 199-208, 2005.
- 412 Simões-Mattos, L.; Teixeira, M. J., Costa, D. C., Prata-JR., J. R.C.; Bevilaqua, C.M.L.,
 413 Sidrim, J.J.C.; Rocha, M. F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania*
 414 *chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). Vet. Parasitol. v. 103, p. 207-216,
 415 2002.
- 416 Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Leishmaniose visceral-
 417 casos notificados confirmados no Sinan. Available in:
 418 [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def)
 419 [def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def). Assessed in: 05/08/2011.

420 Singh, N., Curran, M.D., Rastogil, A.K., Middleton, D., Sundar, S. Diagnostic PCR with
421 *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of
422 kinetoplast minicircle DNA. Trop. Med. Int. Health 4, 448-453,1999.

423 Souza, A.I.; Barros, E.M.S.; Ishikawa, E.; Ilha, I.M.N.; Marin, G.R.B.; Sundar, S.; RAI,
424 M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diag. Lab. Immunol., v.9,
425 p.951-958, 2002.

426 Troncarelli, M.Z., Machado, J.G., Camargo, L.B., Hoffmann, J.L., Camossi, L., Greca,
427 H., Faccioli, P.Y., Langoni, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico
428 da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência
429 indireta. Rev. Vet. Zoot., v.15, n.1, p.40-47, 2008.

430 Vita, S.; Aguzzi, I.; Petrotta, E.; Luciani, A. Feline leishmaniasis and erlichiosis:
431 serological investigation in Abruzzo region. Vet Research Communications, v. 29, p.
432 319-321, 2005.

433 Who, 2004 World Health Organization (WHO), 2004. Division of control of tropical
434 disease. Disponível URL <http://www.who.int/emc/disease/leish/leisgeo1.html>.

435 Xiao-Su, H., Wen-Tian, Y., Hong-Gang, L., He-Ping, Y., Jian-Ping, C., Ying, M., Bao-
436 Qian,J., TAO, Z. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania*
437 *donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in
438 bone marrow and blood samples. J. Parasitol. 86, 822-826,2000.

439

440

441

442

443



FIGURE 1 View of a flagellar structure (*arrow*) obtained by optical microscopy. NUPEZO- Botucatu-SP, 2011.

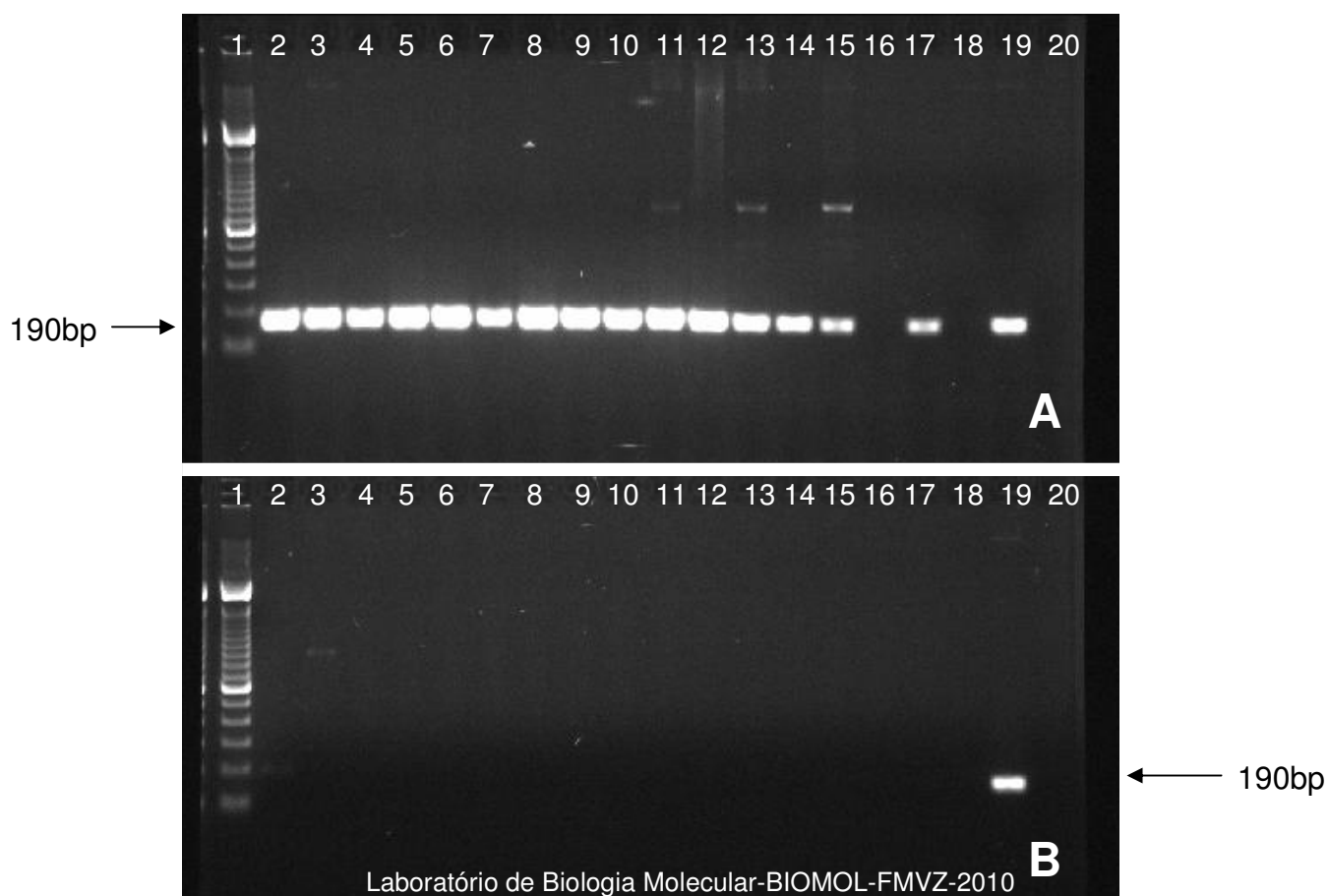


FIGURE 2 A e B: Products from fragment amplification of the kDNA minicircle of *Leishmania (L.) chagasi*, by Polymerase Chain Reaction (PCR), from blood samples of cats in Birigui, São Paulo, Brazil. Amplified samples using the primers Lc14 e Lc15. Botucatu, São Paulo, Brazil-2010. **A:** 1- Ladder 100 pb (Norgen); 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,17- positive samples; 16,18- negative samples; 19-positive control; 20- negative control. **B:** 1- Ladder 100 pb (Norgen); 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18-negative samples; 19-positive control; 20- negative control.

Legend: bp- base of pair