

**MAURÍCIO FRANCO ZANETTE**

**Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência  
indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da  
leishmaniose visceral canina**

**ARAÇATUBA  
2006**

**MAURÍCIO FRANCO ZANETTE**

**Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Mary Marcondes Feitosa

**ARAÇATUBA  
2006**

*“Sempre haverá tempo para aprender  
Sempre nos serão dadas novas oportunidades  
Para tudo existe solução  
O que hoje parece impossível,  
amanhã poderá ser realizado  
Tudo se transforma, tudo se modifica  
É a lei da vida  
Não desesperar jamais!  
Não atrair pensamentos negativos,  
mas acreditar que sempre nos serão dadas oportunidades  
de recomeçar e reconstruir.”*

(Mensagem psicografada)

## DEDICATÓRIA

Aos meu pais Nivaldo e Leda,

por terem proporcionado a mim a possibilidade de chegar tão longe. O carinho de vocês foi fundamental para eu concluir este projeto, principalmente nesta fase final.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha orientadora,

Profa. Ass. Dra. Mary Marcondes Feitosa,  
pela oportunidade oferecida na orientação deste projeto de  
dissertação, por acompanhar passo a passo cada etapa deste  
trabalho, sempre otimista e confiante, contagiando a todos ao seu  
redor e, principalmente, pela compreensão e apoio oferecidos  
durante meus momentos de dificuldades, demonstrando ser, além  
de uma excelente orientadora, uma amiga.

À você, minha eterna admiração.

Muito obrigado!

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de mestrado.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Profa. Sílvia Helena Perri Venturolli, pela paciência e dedicação na realização da análise estatística.

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

Aos graduandos e bolsistas de iniciação científica Fernando, Juliana, Daniel, Ludmila e Denis, pelo bom-humor e eficiência no auxílio da colheita e processamento de materiais.

À funcionária Thaise, do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50), pelo auxílio técnico na realização da reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose visceral.

Aos pós-graduandos Cláudio Nazaretian Rossi e Fabiana Augusta Ikeda Garcia pela cumplicidade e apoio recebido nestes dois anos de convivência intensa.

Ao Cláudio, novamente, pela ajuda na colheita e transporte das minhas amostras.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, pela permissão da colheita de materiais.

À Profa. Dra. Caris Maroni Nunes e à Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz, membros da banca do meu exame geral de qualificação, pelas sugestões para a redação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho pelo fornecimento das amostras de soros de cães portadores de doença de Chagas.

À Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, pelo fornecimento das amostra de soros de cães infectados por *Ehrlichia sp.* e *Babesia canis*.

À Profa. Dra. Solange Maria Gennari, pelo fornecimento de amostras de soros de cães infectados por *T. gondii* e *N. caninum* e pela realização da reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de toxoplasmose e neosporose.

À Profa. Dra. Márcia Dallastra Laurenti, pela orientação na realização da reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina e por ter cedido o Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) para a realização deste método.

À Profa. Dra. Rosângela Machado Zacarias, pela realização da reação de imunofluorescência indireta para diagnóstico de babesiose canina.

À Profa. Dra. Eufrosina Umezawa, pela realização da técnica de ELISA para o diagnóstico de doença de Chagas

À Profa. Dra. Valéria Marçal Félix Lima, pela orientação na realização do método de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina e por ter cedido o Laboratório de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária –UNESP-Araçatuba, para realização deste método.

À Maria Ângela Valente Sanches que, pacientemente, indicou-me os caminhos para superar as dificuldades encontradas durante este período da minha vida.

Às minhas queridas amigas de república Lilian e Juliana pelos anos de agradável convivência e pelas palavras de estímulo quando o desânimo teimava em aparecer.

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



ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

### RESUMO

A importância do diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil reside no fato de que, dentre as estratégias de controle da doença indicadas pela Fundação Nacional de Saúde, encontra-se a eliminação do cão doméstico sorologicamente positivo. Desta forma, torna-se necessário o conhecimento da sensibilidade e da especificidade das provas sorológicas utilizadas para a correta identificação destes animais. Para avaliar o desempenho dos métodos sorológicos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, foram determinadas e comparadas as características dos métodos de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia, adotando-se como padrão o método parasitológico. Para tanto, foram utilizados 50 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e 45 cães sadios provenientes de área não endêmica para a doença. A RIFI revelou sensibilidade de 98% e especificidade de 91,1%, além de ótima concordância com o método parasitológico ( $Kappa = 0,893$ ). Os métodos de ELISA e de imunocromatografia apresentaram boa concordância com o método parasitológico (coeficientes Kappa de 0,788 e 0,769, respectivamente) e valores de sensibilidade de 94% e 86% e especificidade de 84,4% e 91,1%, respectivamente. Com relação à ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose visceral, das 14 amostras de soro positivas para doença de Chagas, nove (64,3%) foram consideradas positivas pela técnica de ELISA e seis (42,9%) pela RIFI, não se observando resultados positivos por imunocromatografia. Das 13 amostras de soros de animais portadores de erliquiose, uma (7,7%) apresentou resultado positivo por meio dos métodos de ELISA e de imunocromatografia. Das seis amostras de soro de cães apresentando co-infecção por erliquiose e babesiose, cinco (83,3%) foram classificadas como positivas pela técnica de ELISA e três (50%) por imunocromatografia, não se observando resultados positivos pela RIFI. Das 10 amostras de soro de cães com

toxoplasmose, cinco (50%) foram positivas pela RIFI e uma (10%) por imunocromatografia, não ocorrendo reação cruzada pela técnica de ELISA. Somente uma (12,5%) das oito amostras de soro de cães com neosporose obteve resultado positivo pela técnica de imunocromatografia, e das 13 amostras de soro de cães com co-infecção por toxoplasmose e neosporose, três (23%) foram positivas por meio da técnica de imunocromatografia. Das 12 amostras de soros de cães com babesiose nenhuma apresentou reação positiva pelos três testes empregados. Em função dos resultados obtidos, a escolha do melhor método sorológico para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina depende não somente de sua sensibilidade e especificidade, mas também do conhecimento de ocorrência de reações cruzadas com outros agentes etiológicos e da situação epidemiológica da doença na região.

**Palavras-chaves ou unitermos:** leishmaniose visceral, cão, ELISA, reação de imunofluorescência indireta, imunocromatografia.

ZANETTE, M. F. **Comparison among enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence assay and immunochromatography for the diagnosis of canine leishmaniasis.** 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

### ABSTRACT

The importance of canine visceral leishmaniasis diagnosis in Brazil is based on the fact that, according to the Ministry of Health, a seropositive dog must be culled. Thus, it's important to know the sensitivity and specificity values of the methods employed for the diagnosis of the disease. To evaluate the performance of the available serological tests for the diagnosis of canine leishmaniasis it was determined and compared the sensitivity and specificity of ELISA, indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and immunochromatographic test using the parasitological test as the gold standard. For this purpose, the study was carried out with a group of 50 naturally infected dogs from an endemic area and 45 healthy dogs from a non endemic area for visceral leishmaniasis. The IFAT was 98% sensitive and 91,1% specific, and showed a very good concordance with the parasitological test ( $k = 0,893$ ). The ELISA showed a sensitivity of 94% and specificity of 84,4% and when kappa index was analysed, a good concordance was observed ( $k = 0,788$ ). The immunochromatographic test was 86% sensitive and 91,1% specific and showed a good concordance with the parasitological test ( $k = 0,769$ ). About the occurrence of cross reaction with visceral leishmaniasis, nine (64,3%) out of 14 positive samples for Chagas' disease were positive by ELISA and six (42,9%) out of 14 were positive by IFAT, while the immunochromatographic test didn't yield any positive result. One (7,7%), out of 13 positive samples for ehrlichiosis, was positive by ELISA and immunochromatographic test. Five (83,3%) out of six positive samples for ehrlichiosis and babesiosis were positive by ELISA and three (50%) by immunochromatography, while IFAT didn't yield any positive result. Five (50%) out of 10 positive samples for toxoplasmosis were positive by IFAT and one (10%) by immunochromatography. Only one (12,5%) out of eight positive samples for

neosporosis was positive by immunocromatography. Three (23%) out of 13 positive samples for toxoplasmosis and neosporosis were positive by immunocromatography. None of the 12 positive samples for babesiosis yielded a positive result by any method. Based on the results of this survey, the best option for a serological method for visceral leishmaniasis diagnosis depends not only on the sensitivity or specificity values, but also on the knowledge of occurrence of cross reaction among pathogens and the epidemiological situation of the area.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, dog, ELISA, indirect immunofluorescent antibody test, immunochromatographic test.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

pag.

Tabela 1 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA, em número absoluto e percentagem, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).....29

Tabela 2- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).....30

Tabela 3– Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia, em número absoluto e percentagem, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).....30

Tabela 4- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA, em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral (Araçatuba-SP, 2006).....31

Tabela 5- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2006).....31

Tabela 6- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia, em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2006).....31

- Tabela 7- Valores de sensibilidade e especificidade relativas para as técnicas de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia empregadas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006).....32
- Tabela 8- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 14 cães portadores de doença de Chagas. (Araçatuba-SP, 2006).....32
- Tabela 9- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 13 cães portadores de erliquiose. (Araçatuba-SP, 2006).....33
- Tabela 10- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 12 cães portadores de babesiose. (Araçatuba-SP, 2006).....34
- Tabela 11- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de seis cães com co-infecção por erliquiose e babesiose. (Araçatuba-SP, 2006)....35
- Tabela 12- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 10 cães portadores de toxoplasmose. (Araçatuba-SP, 2006).....35
- Tabela 13- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de oito cães portadores de neosporose. (Araçatuba-SP, 2006).....36
- Tabela 14- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, RIFI e imunocromatografia em amostras de soro de 13 cães com co-infecção por toxoplasmose e neosporose. (Araçatuba-SP, 2006).....37

Tabela 15- Resultados da sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose em amostras de soro de 50 cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006).....	39
Tabela 16- Resultados da sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose em amostras de soro de 45 cães sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2006).....	41
Quadro 1- Densidades ópticas médias (DO), por meio da técnica de ELISA para leishmaniose visceral canina, de 50 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba- SP. (Araçatuba-SP, 2006).....	61
Quadro 2- Títulos de anticorpos anti- <i>Leishmania sp.</i> obtidos por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral, do soro de 49 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba- SP. (Araçatuba-SP, 2006).....	62
Quadro 3- Resultados da técnica de imunocromatografia para leishmaniose visceral, classificadas em escores, variando de fraco positivo (1/2+) à forte positivo (3+), do soro de 50 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006) .....	63
Quadro 4- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA para leishmaniose visceral canina, do soro de 45 cães provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2006).....	64
Quadro 5- Títulos de anticorpos anti- <i>Leishmania chagasi</i> obtidos por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral, do soro de 45 cães provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2006).....	65

Quadro 6- Resultados da técnica de imunocromatografia para leishmaniose visceral, classificadas em escores, variando de fraco positivo (1/2+) à forte positivo (3+), do soro de 45 cães provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2006).....66

Quadro 7- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 14 cães portadores de doença de Chagas. (Araçatuba-SP, 2006).....67

Quadro 8- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 13 cães portadores de erliquiose. (Araçatuba-SP, 2006).....68

Quadro 9- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 12 cães portadores de babesiose. (Araçatuba-SP, 2006).....68

Quadro 10- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de seis cães com co-infecção por erliquiose e babesiose. (Araçatuba-SP, 2006).....69

Quadro 11- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 10 cães portadores de toxoplasmose. (Araçatuba-SP, 2006).....69



Quadro 12- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de oito cães portadores de neosporose. (Araçatuba-SP, 2006).....70

Quadro 13- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 13 cães com co-infecção por toxoplasmose e neosporose. (Araçatuba-SP, 2006).....70

## LISTA DE FIGURAS

pag

FIGURA 1 - Percentual da ocorrência de reação cruzada entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas (C), toxoplasmose (T), neosporose (N), co-infecção por toxoplasmose e neosporose (T/N), erliquiose (E), babesiose (B) e co-infecção por erliquiose e babesiose (E/B), submetidas à técnica ELISA para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. (Araçatuba –SP, 2006) .....38

FIGURA 2 - Percentual da ocorrência de reação cruzada entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas (C), toxoplasmose (T), neosporose (N), co-infecção por toxoplasmose e neosporose (T/N), erliquiose (E), babesiose (B) e co-infecção por erliquiose e babesiose (E/B), submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006).....38

FIGURA 3 - Percentual da ocorrência de reação cruzada entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas (C), toxoplasmose (T), neosporose (N), co-infecção por toxoplasmose e neosporose (T/N), erliquiose (E), babesiose (B) e co-infecção por erliquiose e babesiose (E/B), submetidas à técnica de imunocromatografia para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006).....39

**SUMÁRIO**

	pag.
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Leishmaniose Visceral Canina.....	1
1.2 Doença de Chagas.....	10
1.3 Erliquiose Canina.....	12
1.4 Babesiose Canina.....	14
1.5 Toxoplasmose.....	16
1.6 Neosporose.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4 RESULTADOS.....	29
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES.....	50
7 REFERÊNCIAS .....	51
ANEXOS .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose Visceral Canina

#### Etiologia e epidemiologia

A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é uma antropozoonose causada por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania* que infectam o cão e uma ampla variedade de vertebrados, incluindo o homem, com larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (ALENCAR et al., 1991; KONTOS; KOUTINAS, 1993). A leishmaniose pode ser tegumentar ou visceral. A espécie envolvida com a infecção na leishmaniose visceral depende da região geográfica, sendo a *Leishmania donovani* o agente etiológico na Ásia e África; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África, e a *Leishmania chagasi* nas Américas (SÃO PAULO, 2003). Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie, permitindo que alguns autores denominem de *L. infantum* o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999).

A doença é endêmica em 87 países, incluindo 21 no Novo Mundo e 66 no Velho Mundo e, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 90% dos casos notificados ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh e Brasil (BORJA-CABRERA et al., 2002).

No Brasil, a leishmaniose visceral humana já foi identificada em 19 dos 27 estados da Federação e casos autóctones foram descritos em aproximadamente 1600 municípios (MELO, 2004; SÃO PAULO, 2003). No estado de São Paulo, a doença canina foi identificada pela primeira vez no município de Araçatuba no ano de 1998 e, desde então, já foi descrita em 41 municípios, difundindo-se para outras regiões do estado, inclusive com casos autóctones identificados na região metropolitana da cidade de São Paulo a partir do ano de 2005 (REICHMAN, 2006; SÃO PAULO, 2003). No município de Araçatuba, de uma população canina estimada em 47.000 cães quando do início da epidemia, cerca de 34.000 cães acometidos pela doença foram submetidos à

eutanásia no período compreendido entre 2002 a 2005 <sup>1</sup>.

No passado a leishmaniose visceral era descrita como uma doença de ambientes silvestres ou rurais, entretanto, as transformações ambientais provocadas pelo intenso processo migratório e o processo de urbanização crescente levaram a uma expansão das áreas endêmicas, com o aparecimento de novos focos, apontando a enfermidade como uma doença reemergente (ALVES; BEVILACQUA, 2004; CASTRO, 1996; MELO, 2004).

A doença já foi identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores (BANETH, 2006; CASTRO, 1996; GENARO, 1993; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Os cães, considerados os principais reservatórios domésticos, são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (MELO, 2004). Essa importância baseia-se no fato da leishmaniose visceral ser mais prevalente na população canina que na humana, pela constatação de que os casos humanos normalmente são precedidos por casos caninos e, pelo fato dos cães apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele do que o homem, o que favorece a infecção dos vetores (BANETH, 2006; CASTRO, 1996; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SCOTT et al.; 2001).

As leishmanias são protozoários pleomórficos que completam seus ciclos de vida em dois hospedeiros, sendo um vertebrado (canídeos, roedores ou humanos) e um invertebrado (KONTOS; KOUTINAS, 1993). Elas apresentam duas formas; uma aflagelada ou amastigota, intracelular obrigatória, encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados e, outra, flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório dos insetos vetores (SÃO PAULO, 2003; SLAPPENDEL, 1988). Estes últimos são flebotomíneos pertencentes a várias espécies do gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente no Brasil como mosquito palha, birigui ou tatuquiras (FEITOSA et al., 2000).

---

<sup>1</sup> MORGADO, A.A. Chefe do Serviço de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba- SP. Dados obtidos oralmente, 2006

## Patogênese

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado o flebotomíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania sp.*, as quais sofrem divisão binária, multiplicação e diferenciação em formas paramastigotas. Estas colonizam o tubo digestório do vetor e diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo biológico completa-se com a picada do flebótomo infectado e subsequente inoculação de formas promastigotas do parasita na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, as quais diferenciam-se em formas amastigotas no interior de macrófagos. Ocorre então a disseminação linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A infecção dissemina-se para linfonodos, baço e medula óssea dentro das primeiras horas (BANETH, 2006; KONTOS; KOUTINAS, 1993).

Em camundongos demonstrou-se que os macrófagos, as células dendríticas e as células de Langerhans, infectadas por parasitas, atuam como células apresentadoras de antígenos ativando linfócitos (CD4+) Ta1 ou Ta2. Se forem ativadas preferencialmente as células Ta1 ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos, podendo haver controle do parasitismo com a eliminação da infecção. Em contraste, quando a infecção está associada com a indução de linfócitos Ta2, ocorre a produção de citocinas anti-inflamatórias, proliferação de células B com subsequente produção de imunoglobulinas e desenvolvimento da infecção (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; FERRER, 2002a; PINELLI et al., 1994). Um perigo potencial da regulação de linfócitos T prejudicada e da atividade exuberante de linfócitos B é a geração de uma grande quantidade de imunocomplexos circulantes, causando danos em vários órgãos (BANETH, 2006; CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; FERRER et al., 1995; KONTOS; KOUTINAS, 1993; NOLI, 1999). Na enfermidade natural, estão ativados tanto os subtipos Ta1 quanto Ta2, sendo que a variedade dos sintomas e a gravidade da doença dependem do equilíbrio entre esses dois sistemas (FEITOSA et al., 2000; PINELLI et al., 1994).

### **Achados clínicos**

Os sintomas da leishmaniose visceral canina variam em decorrência dos mecanismos imunológicos ativados pelo hospedeiro bem como dos órgãos acometidos. As manifestações clínicas da doença no cão e no homem são semelhantes e, freqüentemente, incluem alterações inespecíficas tais como apatia, emagrecimento progressivo, hiporexia ou anorexia, linfadenomegalia,, hepatoesplenomegalia e hipertermia (FEITOSA et al., 2000).

Linfadenomegalia generalizada e esplenomegalia são alterações bastante comuns causadas por uma proliferação intensa de linfócitos B, histiócitos e macrófagos em resposta à presença do parasita (CIARAMELLA; CORONA, 2003; KONTOS; KOUTINAS, 1993). A perda de peso está freqüentemente relacionada ao envolvimento visceral, podendo ocorrer mesmo em cães com normorexia (FEITOSA et al., 2000). Os cães podem ainda apresentar uma atrofia muscular proeminente, particularmente em musculatura facial e temporal (KONTOS; KOUTINAS, 1993). É comum a ocorrência de hipertermia intermitente, com valores de temperatura variando entre 40,5°C e 41°C (FEITOSA et al., 2000).

As alterações dermatológicas são bastante freqüentes em animais com leishmaniose visceral. O cão pode apresentar tanto um pelame seco como uma seborréia oleosa, acompanhada ou não de prurido e, muitas vezes, com contaminação bacteriana secundária. Muitos animais apresentam uma excessiva descamação cutânea que pode, eventualmente, tornar-se disseminada por todo o corpo. É comum a observação de áreas de rarefação pilosa e alopecia, associadas ou não à ocorrência de exulcerações ou úlceras cutâneas (FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001; SLAPPENDEL, 1988). Em locais correspondentes a saliências ósseas pode-se observar tanto áreas de hiperqueratose e lignificação como áreas ulceradas, as quais estão, freqüentemente, relacionadas a uma ação direta do parasita ou a uma vasculite necrotizante causada pela deposição de imunecomplexos (CIARAMELLA et al., 1997). Alguns cães apresentam despigmentação cutânea, principalmente no plano nasal. A onicogribose é um achado relativamente comum e é causada pela presença do parasita estimulando a matriz ungueal (FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001; SLAPPENDEL, 1988).

As alterações oftálmicas acometem preferencialmente o segmento anterior do globo ocular, sendo mais comum a blefarite associada à dermatite facial, embora não seja raro observar ceratoconjuntivite seca (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999). A uveíte, geralmente bilateral, pode ser observada em associação com edema de córnea e formação de sinéquias devido à presença de *Leishmania sp.* ou como consequência da deposição de imunocomplexos na íris e corpo ciliar (FEITOSA, 2006).

Muitos cães com leishmaniose visceral apresentam epistaxe, normalmente unilateral, moderada e intermitente. A provável causa é uma combinação de lesões ulcerativas e inflamatórias na mucosa nasal (CIARAMELLA; CORONA, 2003; KONTOS; KOUTINAS, 1993). É possível observar animais com quadro de diarreia crônica devido à presença de ulcerações de mucosa gástrica e intestinal, resultando em fezes aquosas acompanhadas de hematoquezia ou melena (CIARAMELLA; CORONA, 2003). A deposição de imunocomplexos nos rins eventualmente resulta em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite tubulointersticial, podendo evoluir para uma insuficiência renal crônica (FERRER, 2002b; KONTOS; KOUTINAS, 1993).

Dentre os sintomas neurológicos já observados em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral destacam-se as convulsões, as alterações em pares de nervos cranianos (estrabismo, ptose facial e disfagia), alterações de locomoção tais como andar compulsivo e em círculos, lesões vestibulares evidenciadas por ataxia e nistagmo e, alterações cerebelares com ocorrência de tremor de intenção. Tais sintomas podem ser decorrentes da deposição de imunocomplexos ou por infecções oportunistas no sistema nervoso central (CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA et al., 2005).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença. Os achados clínicos não são patognomônicos da doença e podem sugerir outras enfermidades, tornando o diagnóstico imunológico ou parasitológico necessários para a confirmação da suspeita (FEITOSA et al., 2000; FEITOSA, 2006; SINGH et al., 2003). Por outro lado, enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a mais de 50%, a prevalência da doença varia



entre três e 10%, demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sintomas, dificultando mais ainda o diagnóstico (FERRER, 2002a). Esses animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sintomas após períodos que variam de três meses a alguns anos (FERRER et al., 1995).

Os achados do hemograma, da urinálise ou de determinações bioquímicas são inespecíficos (GRADONI, 2002). A alteração hematológica mais freqüente na leishmaniose visceral canina é a anemia, que pode variar de leve a grave e apresentar caráter regenerativo ou arregenerativo. Uma leucocitose por neutrofilia, quando presentes, estão normalmente associados a um quadro de infecção bacteriana secundária. As alterações em linfócitos são pouco freqüentes, porém a presença de monocitose é comum, muitas vezes acompanhada de grandes monócitos ativados. A presença de formas amastigotas nos esfregaços sangüíneos é um achado raro (IKEDA et al., 2003). Nas fases finais da doença observa-se também trombocitopenia, no entanto a contagem plaquetária pode ser normal (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000). As alterações da urinálise ou de avaliações bioquímicas refletem, normalmente, um comprometimento renal ou hepático em decorrência da doença. Muitos animais portadores de leishmaniose visceral apresentam hiperglobulinemia, consequência do aumento das frações beta e gama, associada à hipoalbuminemia (BANETH, 2006; CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA et al., 2000).

A confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral pode se basear em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da doença (DYE et al., 1993; LEONTIDES et al., 2002; SINGH et al., 2003). Podem ser observadas formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sangüíneos corados com corantes de rotina, tais como Giemsa, Wright e Panótico. As formas amastigotas são reconhecidas pela sua forma esférica a ovóide, medindo 2-5  $\mu\text{m}$  e contendo um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996). Na dependência do tempo dispendido procurando o parasita, a sensibilidade passa a ser de, no máximo, 80% em cães sintomáticos e menor em cães assintomáticos. A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina (WOLSCHRIJN et al., 1996). Em

alguns pacientes a visualização de parasitas é muito laboriosa e os resultados negativos não são incomuns, especialmente nos casos crônicos (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; SLAPPENDEL, 1988).

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* circulantes utilizando técnicas sorodiagnostics constitui-se no instrumento mais utilizado para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania sp.* A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, cães que nunca farão soroconversão e cães soropositivos que se convertem em soronegativos mas ainda permanecem infectados (FERRER, 2002a; FERRER et al., 1995; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006; LEONTIDES et al., 2002). Animais com menos de três meses de idade não devem ser avaliados através de métodos sorológicos pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (BRAGA et al., 1998).

Muitos testes sorológicos podem ser utilizados tais como fixação de complemento, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, ELISA, imunoprecipitação em gel e western blot (ALVES; BEVILACQUA, 2004; CIARAMELLA; CORONA, 2003; FERRER et al., 1995; SCALONE et al., 2002; VERCAMMEN et al., 1997). As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino são a imunofluorescência indireta e o ELISA. Na reação de imunofluorescência indireta, o ponto de corte situa-se no título igual a 1:40 e, no ELISA, o ponto de corte é determinado a partir da densidade óptica média acrescida de três desvios-padrões de um grupo controle negativo (BRASIL, 2003; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Para a determinação do ponto de corte da reação de ELISA, a média das densidades ópticas de animais sadios podem ser acrescidas de dois e cinco desvios (EVANS et al., 1990; MANCIANTI et al., 1995; RAJASEKARIAH et al., 2001). As alterações dos valores do ponto de corte podem, conseqüentemente, alterar a sensibilidade e especificidade do método de ELISA (FERRER, 1995).

A RIFI tem sido a técnica sorológica mais utilizada no diagnóstico da leishmaniose

visceral canina, particularmente em inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2003), entretanto, possui a desvantagem de que, quando da análise de um grande número de amostras, o tempo dispendido pelo profissional para a leitura das lâminas é muito grande (RACHAMIN et al., 1991). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) demonstra sensibilidade que varia entre 90 e 100% e especificidade entre 80 e 100% (ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER et al., 2005). De acordo com Mancianti et al. (1995), esta reação pode determinar valores de sensibilidade e especificidade de 98,4% e 100%, respectivamente. A especificidade desta prova é prejudicada devido à ocorrência de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanosomatídeos, tais como o agente causador da doença de Chagas. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados como indicadores de infecção leishmaniótica específica, particularmente em áreas onde a doença de Chagas é endêmica (ALVES; BEVILACQUA, 2004; COSTA et al., 1991). Existem, na literatura, inúmeros relatos da ocorrência de reação sorológica cruzada entre os membros da família *Trypanosomatidae*, envolvendo, principalmente, os protozoários *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma. cruzi*, os quais possuem uma relação filogenética muito estreita. No entanto, a ocorrência de reação cruzada entre leishmaniose visceral canina e outros agentes etiológicos por meio dos métodos sorológicos ainda é motivo de discordâncias na medicina veterinária. Antígenos de superfície e antígenos dos microtúbulos do citoesqueleto do protozoário são comuns a todos os tripanosomatídeos o que justifica a ocorrência de reação cruzada entre eles (BADARÓ et al., 1986). Já, com relação à ocorrência de reação cruzada com outras enfermidades, Vercammen et al. (1997), utilizando amostras de soro de três cães infectados por *Babesia sp.* e de um cão infectado por *Ehrlichia sp.*, não observaram resultados positivos quando da realização da RIFI para leishmaniose visceral.

O teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania sp.* apresenta, dependendo do antígeno empregado, uma sensibilidade que varia entre 95% e 99,5% e uma especificidade entre 97,1% a 100% (LAURENTI et al., 2005; MANCIANTI et al., 1995). Há, contudo, discordâncias entre alguns autores, os quais descreveram valores de sensibilidade e especificidade de 80 e 81%, respectivamente (ASHFORD et al., 1995) e outros que observaram valores de 100% para ambos os índices (VERCAMMEN et al., 1997). A sensibilidade e especificidade deste método dependem do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e de mudanças no protocolo

experimental padrão (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas) (REINTHINGER et al., 2002). As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, mas também com organismos filogeneticamente distantes (MELO, 2004; RACHAMIN et al., 1991). Enquanto alguns trabalhos apontam para a ocorrência de reação cruzada entre leishmaniose visceral e babesiose canina ou doença de Chagas por meio da técnica de ELISA (ROSÁRIO et al., 2005), outros afirmam não existir reação cruzada com erliquiose e babesiose (LIMA et al., 2005; VERCAMMEN et al., 1997), toxoplasmose (LIMA et al., 2005) e doença de Chagas (VERCAMMEN et al., 1997).

Com o objetivo de tentar elevar a sensibilidade e a especificidade das provas sorológicas, têm sido utilizados antígenos purificados como as glicoproteínas de membrana gp63, gp72, gp70 específicas do gênero *Leishmania*, entretanto, ainda assim podem ocorrer reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (ALVES; BEVILACQUA, 2004; BADARÓ et al., 1986; SCALONE et al., 2002; VEXENAT et al., 1996). Alguns antígenos recombinantes, como o rK39, o rK9 e o rK26, foram geneticamente desenvolvidos e parecem conferir grande sensibilidade quando da realização da sorologia (BHATIA et al., 1999; ROSATI et al., 2003).

Além das provas sorológicas de rotina existem testes comerciais de imunocromatografia utilizados tanto em humanos quanto em animais (BERN et al., 2000; CARVALHO et al., 2003; GRADONI, 2002; REITHINGER et al., 2002; SUNDAR et al., 2002). A maioria destes consiste de métodos que empregam anticorpos monoclonais anti-IgG de cão e antígenos de *Leishmania* de diferentes fontes. Eles são atrativos devido à simplicidade de uso e à rápida resposta (cerca de 10 minutos) (GRADONI, 2002). A sensibilidade e a especificidade destes testes, utilizando o antígeno recombinante rK39 para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana variam, de acordo com a literatura, de 90 a 100% e de 93 a 100%, respectivamente (BERN et al., 2000; CARVALHO et al., 2003; SUNDAR et al., 2002). Já na avaliação do teste de imunocromatografia para detecção de leishmaniose visceral canina, enquanto alguns autores descreveram valores de sensibilidade entre 84 e 92,1% e de especificidade entre 99 e 100% (LAURENTI et al., 2005; MELO, 2004), outros observaram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 75%

(REITHINGER et al., 2002). Apesar dos relatos de que os testes de imunocromatografia podem levar a uma grande proporção de diagnósticos falso positivos, existem discordâncias quanto à ocorrência de reação cruzada do antígeno rK39 com *Leishmania braziliensis* ou *T. cruzi* (REITHINGER et al., 2002).

O método do PCR (reação em cadeia da polimerase) através do qual é possível identificar e amplificar seletivamente o DNA do parasita (BANETH, 2006; NOLI, 1999), constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da leishmaniose visceral pois apresenta sensibilidade e especificidade muito elevadas, próximas a 100% (ASHFORD et al., 1995; ROURA et al., 1999). A principal desvantagem das técnicas moleculares é que elas requerem laboratórios bem equipados (BRASIL, 2003).

A importância do diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil reside no fato de que dentre as estratégias de controle da doença indicadas pela Fundação Nacional de Saúde encontra-se a eliminação do cão doméstico infectado (CASTRO, 1996; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; SÃO PAULO, 2003). As limitações associadas ao exame parasitológico, tais como a dificuldade de punção de medula óssea em animais obesos, dificuldade de obtenção de material quando da punção de linfonodos de tamanhos reduzidos e, muitas vezes, a falta de experiência do profissional na identificação do parasita, fazem, do método sorológico uma ferramenta útil no diagnóstico da leishmaniose visceral por se tratar de uma técnica pouco invasiva, acessível para a maioria dos clínicos veterinários e que demonstra uma sensibilidade superior aos métodos parasitológicos. Em se tratando de um programa de controle de doença baseado na eliminação do reservatório, é de extrema importância o conhecimento da sensibilidade e da especificidade das provas sorológicas utilizadas para a correta identificação de fontes de infecção, evitando-se as taxas de positividade equivocadas.

Nesse contexto, um ponto a ser considerado é a possibilidade de reações cruzadas entre leishmaniose visceral, doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose; enfermidades comumente observadas numa mesma região geográfica e, cujo diagnóstico diferencial torna-se muitas vezes dificultado pela semelhança entre alguns sintomas e entre alterações laboratoriais.

Em áreas endêmicas para leishmaniose visceral os métodos sorológicos são rotineiramente utilizados como exame de triagem para descartar a possibilidade de infecção

por *L. chagasi* em cães com alterações clínicas compatíveis com a doença, antes mesmo de se investigar outros possíveis diagnósticos diferenciais. Quando a sorologia é utilizada como único método de diagnóstico da leishmaniose visceral canina a ocorrência de reação cruzada pode implicar na eutanásia de um animal acometido por outro agente passível de tratamento. Como não existem métodos sorológicos perfeitos, o profissional deve optar pelo método que reúna as qualidades desejadas para cada tipo de situação. No entanto, a literatura diverge sobre qual o teste mais preciso para o diagnóstico de doença, assim como diverge quanto à sensibilidade e especificidade das técnicas sorológicas, havendo a necessidade de mais estudos acerca destes indicadores para a escolha de um método apropriado, simples, sensível e específico.

## 1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é uma importante zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Trypanosoma*, com distribuição exclusivamente no continente americano, onde estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas (APT et al., 1998; DEDET; PRATLONG, 2000; PASSOS et al., 1997). Mais da metade destes casos encontram-se nos países do cone sul, como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Os cães, além de serem importantes reservatórios domésticos do *T. cruzi* na maioria destes países, são também vítimas da doença, desenvolvendo alterações clínicas que se assemelham às observadas em humanos (MONTENEGRO et al., 2002).

A transmissão do *T. cruzi* se dá pelas fezes que o triatomíneo infectado deposita sobre a pele enquanto suga o sangue do hospedeiro vertebrado. Geralmente a picada provoca prurido e o ato de coçar facilita a penetração do tripanossomo pelo local da picada. O *T. cruzi*, contido nas fezes do barbeiro, pode também penetrar por membranas mucosas dos olhos, narinas e cavidade oral ou através de feridas ou cortes recentes existentes na pele (BARR, 2006; MAYWALD et al., 1996).

Após a infecção as tripomastigotas penetram nas células do hospedeiro,

multiplicam-se e são transportadas através do organismo principalmente no interior de macrófagos. A parasitemia desenvolve-se dentro de poucos dias, com pico entre duas e quatro semanas pós inoculação, coincidindo com a fase aguda da doença. (ALVES, 2003; BARR, 2006). Esta ocorre principalmente em cães com menos de um ano de idade (BARR, 2006; LANA et al., 1992; MEURS et al., 1998). A patogênese desta fase resulta de dano celular à medida que as tripomastigotas rompem células do hospedeiro, especialmente miócitos cardíacos e, em alguns casos, células do tecido nervoso (BARR, 2006; BERGER et al., 1988). Durante a fase aguda pode-se observar uma linfadenomegalia generalizada e hipertermia (ALVES, 2003). Sintomas decorrentes de uma miocardite aguda, tais como colapso ou morte súbita em cães jovens, têm sido freqüentemente descritos. É comum a observação de membranas mucosas pálidas, pulso fraco, taquiarritmias e dispnéia. Cães infectados que sobrevivem a esta fase podem desenvolver ascite, hepato e esplenomegalia decorrentes de insuficiência cardíaca congestiva direita. Anorexia e diarreia também podem ser observados na fase aguda. Alterações neurológicas incluem paresia e ataxia de membros pélvicos (ANDRADE et al., 1997; BARR, 2006). Animais que sobrevivem à miocardite aguda desenvolvem uma miocardiopatia crônica, com aumento cardíaco global, principalmente de câmara ventricular direita (ALVES, 2003).

O diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado por meio de exames parasitológicos ou sorológicos, na dependência da fase da doença. Na fase aguda as formas tripomastigotas do *T. cruzi* são facilmente detectáveis por meio do exame microscópico direto de sangue do animal infectado (BRENIERE et al., 1985). Após o intenso parasitismo sanguíneo inicia-se a fase crônica assintomática ou latente, em que o grau de parasitemia sofre uma queda considerável em virtude da mobilização da defesa específica do hospedeiro, o que torna difícil o encontro das formas tripomastigotas (ALVES, 2003). Nesse estágio da doença, quando as formas do parasita são pobremente identificadas na circulação sanguínea, o diagnóstico deve ser baseado na identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* circulantes (BRENIERE et al., 1985, ALVES, 2003).

Reações cruzadas entre *T. cruzi* e *Leishmania sp.* por meio de métodos sorológicos, tais como RIFI e ELISA, podem induzir a dados epidemiológicos distorcidos, particularmente em áreas onde as duas enfermidades co-existem, além de promover

dificuldades no diagnóstico e tratamento dos animais (LEMESRE et al., 1986). Pacientes infectados por *T. cruzi* na fase crônica assintomática podem ser falsamente diagnosticados como portadores de leishmaniose visceral quando estes apresentam lesões cutâneas causadas por outros agentes, que não pelos tripanosomatídeos. Por outro lado, um indivíduo previamente infectado por *Leishmania sp.* apresentando problemas cardíacos pode ser falsamente diagnosticado como portador de doença de Chagas (PASSOS et al., 1997).

### 1.3 Erliquiose canina

A erliquiose é uma enfermidade causada por bactérias intracitoplasmáticas, gram negativas, transmitidos por carrapatos, que infectam leucócitos e plaquetas de várias espécies de animais domésticos (MACHADO, 2004; MORAES et al., 2004). A doença é transmitida por meio da picada do carrapato, *Rhipicephalus sanguineus*, e tem distribuição mundial (BULLA et al., 2004), de ocorrência comum no Brasil. De acordo com uma avaliação sorológica realizada no estado de São Paulo, aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias apresentaram anticorpos contra *E. canis* (MACHADO, 2004; MORAES et al., 2004). Em um estudo soroepidemiológico realizado na região sul do país, em Londrina – PR, envolvendo 381 cães selecionados aleatoriamente, foi demonstrada uma soroprevalência de 23% para *E. canis*, empregando-se a técnica de ELISA (TRAAP et al., 2006).

Por apresentar curso clínico extremamente variável, a erliquiose torna-se um importante diagnóstico diferencial para muitas doenças (TROY et al., 1980) incluindo a leishmaniose visceral, devido à semelhança das alterações clínicas manifestadas pelas duas enfermidades (NOLI, 1999).

Durante o período de incubação de oito a 20 dias os organismos multiplicam-se, por meio de fissão binária, em macrófagos do sistema mononuclear fagocitário, disseminando-se por todo o organismo. O subsequente curso da doença divide-se em três fases, quais sejam; aguda, subclínica e crônica. A fase aguda persiste por duas a quatro semanas, durante as quais observam-se sintomas tais como anorexia, hipertemia, corrimento nasal, depressão, mucosas hipocoradas, linfadenomegalia, esplenomegalia,



petéquias e equimoses (NEER; HARRUS, 2006). É comum a ocorrência de uveíte anterior e alterações do segmento posterior do globo ocular tais como corioretinite, papiledema e hemorragia retiniana, que podem resultar em cegueira aguda. Cães com erlichiose também podem desenvolver claudicação secundária a uma poliartrópata por deposição de imunocomplexos (GOULD et al., 2000). Animais não tratados ou submetidos a tratamento de forma incorreta podem evoluir para uma fase subclínica, durante a qual ocorre ganho de peso do animal e resolução da hipertermia. Cães imunocompetentes podem eliminar a *Ehrlichia sp.* ou tornar-se reservatórios para toda a vida e, eventualmente, desenvolver a fase crônica da doença. A fase crônica, em sua forma severa, caracteriza-se por produção prejudicada de elementos sanguíneos pela medula óssea, levando a um quadro de pancitopenia. Nesta fase os cães geralmente morrem de infecções secundárias e hemorragias incontroláveis (NEER; HARRUS, 2006). Apesar do sangramento poder ocorrer em qualquer superfície mucosa a epistaxe é mais freqüentemente observada. Os sinais neurológicos, apesar de pouco comuns, são resultado de um quadro de meningite devido a um processo inflamatório ou à hemorragias. Pode-se observar convulsões, estupor, ataxia, disfunção cerebelar ou vestibular, anisocoria, tremor de intenção e hiperestesia localizada ou generalizada (MARETZKI et al., 1994).

Os níveis de IgG começam a se elevar 15 dias pós infecção, geralmente com hipergamaglobulinemia policlonal, apesar de poder ocorrer gamopatia monoclonal em alguns animais. Os altos títulos de anticorpos não fornecem proteção, pelo contrário, podem levar a uma piora na progressão da doença devido a seus efeitos imunopatológicos, uma vez que muitas das manifestações clínicas da doença são imunomediadas (NEER; HARRUS, 2006).

A alteração hematológica mais comum é a trombocitopenia, presente em qualquer fase da doença em aproximadamente 84% dos casos. Esta pode ser resultante de destruição imunomediada, diminuição na produção, aumento no consumo de plaquetas, diminuição da meia-vida ou seqüestro esplênico de plaquetas. Anemia de caráter arregenerativo e leucopenia também são observadas na maioria dos casos (BULLA et al., 2004; MACHADO, 2004). Em áreas endêmicas para as duas enfermidades a erliquiose associada a um quadro de leishmaniose pode complicar os sintomas da última e, particularmente, contribuir para suas anormalidades hematológicas (NOLI, 1999).

O diagnóstico definitivo da doença pode ser baseado na identificação de mórulas da *Ehrlichia sp.* em leucócitos de esfregaços sanguíneos, principalmente na fase aguda da doença, ou de punções biópsias aspirativas de fígado, pulmão, linfonodos e medula óssea. O achado de mórulas é difícil e consome muito tempo, mas pode ser otimizado realizando-se esfregaços sanguíneos de um leito capilar periférico, como por exemplo da margem da orelha. O diagnóstico de erliquiose também pode-se basear em resultados sorológicos positivos por meio da reação de imunofluorescência indireta (MYLONAKIS et al., 2003). Estes testes detectam anticorpos séricos tão precocemente quanto sete dias pós infecção, apesar de que alguns cães tornam-se soropositivos somente após 28 dias. Devido à persistência de títulos pós-tratamento ou recuperação clínica, um título positivo não significa necessariamente que o quadro clínico do animal seja resultante de erliquiose, especialmente em áreas endêmicas onde cães assintomáticos possuem títulos sorológicos para *E. canis* (NEER; HARRUS, 2006).

#### **1.4 Babesiose canina**

A babesiose canina é uma doença de distribuição mundial causada por diferentes espécies de *Babesia sp.* (FURTANELLO et al., 2005; TABOADA; LOBETTI, 2006; TABOADA; MERCHANT, 1991), hemoprotozoários que infectam os eritrócitos promovendo um quadro hemolítico manifestado clinicamente por anemia e icterícia de intensidades variáveis. O cão, hospedeiro doméstico mais importante, pode ser parasitado por duas espécies diferentes: *Babesia canis*, mais freqüente nos países tropicais, incluindo o Brasil, e *Babesia gibsoni*, encontrada principalmente no norte e oeste da África, sudeste asiático e, de forma endêmica, no sudoeste dos Estados Unidos da América (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002).

Os principais vetores envolvidos na transmissão da *Babesia canis* são carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato vermelho do cão. Entretanto, outras espécies, como *Dermacentor ssp.*, *Hyaloma plumbeum* e *Haemaphysalis leachi* também podem transmitir o agente (BRANDÃO; HAGIWARA, 2002; TABOADA; MERCHANT, 1991).

A babesiose pode, clinicamente, seguir cursos hiperagudos, agudos, crônicos ou

subclínicos. A apresentação hiperaguda caracteriza-se pelo desenvolvimento de choque hipotensivo, hipóxia e dano tecidual extenso, sendo observada geralmente em filhotes com elevado grau de parasitemia e histórico de ixodidiose acentuada (TABOADA; LOBETTI, 2006; TABOADA; MERCHANT, 1991). Sintomas da forma hiperaguda, algumas vezes referida como babesiose cerebral, tais como ataxia e convulsões, podem demonstrar um comprometimento neurológico provavelmente decorrente da estase de eritrócitos parasitados no interior dos capilares do sistema nervoso central. Grande parte dos cães que desenvolve esta forma da doença vem a óbito mesmo com o tratamento (ABDULLAHI et al., 1990; TABOADA; MERCHANT, 1991).

Já a forma aguda, síndrome clínica mais comumente observada, caracteriza-se por febre, letargia, anemia hemolítica, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia e êmese (ABDULLAHI et al., 1990 e TABOADA; LOBETTI, 2006). Complicações observadas em casos de intensa parasitemia incluem distúrbios dos sistemas respiratório, gastrointestinal, vascular e musculoesquelético. Manifestações respiratórias de vias aéreas superiores são ocasionalmente observadas, sendo geralmente brandas e auto-limitantes, prontamente responsivas ao tratamento. As manifestações gastrointestinais incluem êmese e eventualmente diarreia. Raramente ocorrem hemorragias, que variam de petéquias à equimoses secundariamente à trombocitopenia ou à coagulação intravascular disseminada. Além desses sintomas, em muitos animais infectados observa-se uma glomerulonefrite membranoproliferativa de caráter imunemediado que pode culminar em insuficiência renal aguda. A icterícia em casos de babesiose pode ser causada por hemólise e, principalmente, por disfunções hepáticas (TABOADA; LOBETTI, 2006; TABOADA; MERCHANT, 1991).

As anormalidades hematológicas mais comumente encontradas na babesiose canina são anemia e trombocitopenia. A reticulocitose é proporcional à severidade da anemia (FURTANELLO et al., 2005). As anormalidades leucocitárias incluem leucocitose, leucopenia, neutrofilia ou neutropenia, linfocitose e eosinofilia (FURTANELLO et al., 2005). A discordância das informações relativas ao leucograma na babesiose canina pode estar relacionada ao momento em que a avaliação é feita (HAGIWARA; HOLZCHUH, 1987). A trombocitopenia isolada é observada em muitos casos de babesiose e pode estar relacionada ao consumo imune ou coagulatório de plaquetas por injúrias hemolíticas ou

vasculares (TABOADA; LOBETTI, 2006).

O diagnóstico da babesiose pode ser realizado por meio da visualização do protozoário em esfregaços de sangue, porém, devido à dificuldade de identificação do parasita em pacientes crônicos os métodos sorológicos podem ser empregados para identificação de anticorpos anti-*Babesia sp.* nos animais infectados, sendo a RIFI o teste mais comumente utilizado. O método de ELISA também tem sido utilizado para detecção de anticorpos anti-*Babesia sp.*, com resultados mais sensíveis e menos específicos do que aqueles da reação de imunofluorescência indireta. Testes sorológicos utilizando antígenos totais podem levar a resultados falso positivos para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (TABOADA; LOBETTI, 2006).

### 1.5 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose com ampla distribuição mundial causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório que pode acometer qualquer mamífero e tem como único hospedeiro definitivo os felídeos (HIGA et al., 2000; AZEVEDO et al., 2004). O ciclo biológico do parasito compreende três estágios infectantes: (1) os taquizoítos, formas que se multiplicam rapidamente; (2) os bradizoítos, formas de lenta multiplicação, encontrados nos cistos teciduais e (3) os esporozoítos encontrados em oocistos. Enquanto os taquizoítos e bradizoítos ocorrem nos tecidos de todos os animais infectados, os oocistos são excretados somente nas fezes dos gatos (DUBEY; LAPIN, 2006; IKEDA et al., 2005).

Os principais meios de transmissão são a infecção congênita, ingestão de tecidos infectados e ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos. A toxoplasmose e a sororeatividade ao *T. gondii* são mais prevalentes em animais mais velhos devido ao aumento de exposição com a idade, e em animais de zonas rurais que possuem o hábito de caçar pequenos mamíferos (DUBEY; LAPPIN, 2006).

Levantamentos sorológicos utilizando a reação de imunofluorescência indireta, realizados em diferentes cidades do país, demonstraram valores positivos em 91% dos 657 cães testados na cidade de Campinas; 63,8% em 1256 amostras obtidas no Centro de Controle de Zoonoses da Cidade de São Paulo e 47,3% em 243 animais de Belo Horizonte

(BRITO et al., 2002).

Os sintomas da toxoplasmose em cães são variáveis e dependem da idade, da presença de infecções concomitantes, da severidade da infecção e dos órgãos afetados (PAIXÃO; SANTOS, 2004). Os sintomas podem estar associados aos sistemas respiratório, neuromuscular ou gastrointestinal e são manifestados por anorexia, hipertermia, letargia, diarreia intermitente, secreção nasal e ocular, tosse e convulsões. A toxoplasmose generalizada é observada principalmente em cães jovens com menos de um ano de idade e caracteriza-se por febre, tonsilite, dispnéia, diarreia e vômito. Pode-se observar icterícia decorrente de necrose hepática extensa. Os sintomas mais observados em cães mais velhos tem sido associados com o sistema nervoso e muscular. Os sinais neurológicos dependem da localização da lesão no encéfalo ou medula espinhal e incluem convulsões, alterações de nervos cranianos, tremores, ataxia, paresia e paralisia. Cães com miosite também podem apresentar alterações locomotoras. Lesões oculares associadas à toxoplasmose em cães incluem retinite, uveíte anterior e neurite óptica (DUBEY; LAPPIN, 2006; PAIXÃO; SANTOS, 2004).

Aproximadamente por volta da terceira semana pós-infecção os taquizoítos começam a desaparecer dos tecidos transformando-se em cistos teciduais contendo bradizoítos. Esta fase está associada com uma resposta imune sistêmica que inibe a parasitemia. Estes cistos podem persistir no hospedeiro por toda a vida e podem, eventualmente, sofrer ruptura liberando bradizoítos que iniciam uma recidiva clínica durante um período de imunossupressão. Casos de toxoplasmose têm sido descritos em associação à cinomose e outras doenças imunossupressoras tais como erliquiose e leishmaniose visceral (DUBEY; LAPPIN, 2006, IKEDA et al., 2005).

Múltiplos testes sorológicos têm sido utilizados para detecção de anticorpos no diagnóstico da toxoplasmose, entretanto, a confirmação do diagnóstico deve-se basear na elevação do título em amostras pareadas (DOMINGUES et al., 1998; DUBEY; LAPPIN, 2006).

## **1.6 Neosporose canina**

*Neospora caninum* é um protozoário intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa,

que apresenta estreita semelhança estrutural e biológica com o *T. gondii*. Devido às similaridades morfológicas, o *N. caninum* era erroneamente identificado como *T. gondii* até 1988, quando foi identificado pela primeira vez. A doença acomete várias espécies de herbívoros porém, os canídeos são considerados os hospedeiros definitivos do protozoário. Em cães, as principais vias de infecção são a ingestão de cistos teciduais e a via transplacentária (DUBEY; LAPPIN, 2006).

O ciclo de vida do *N. caninum* é semelhante ao do *T. gondii*. Após a ingestão de cistos ocorre a liberação de bradizoítos que se diferenciam em taquizoítos e disseminam-se sistemicamente, podendo multiplicar-se em vários tipos celulares. Com o desenvolvimento de imunidade contra o protozoário ocorre a formação de cistos teciduais que são demonstrados apenas no sistema nervoso central e tecido muscular (BARBER et al., 1996; DUBEY; LAPPIN, 2006; PAIXÃO; SANTOS, 2004).

A neosporose pode ser fatal em cães de qualquer idade, mas tende a ser mais grave em filhotes infectados congenitamente. Cães com até seis meses de idade normalmente apresentam paralisia flácida de membros pélvicos, que ascende progressivamente para os anteriores sem, no entanto, demonstrar alteração de consciência. Estes sintomas podem estar associados à atrofia e contratura muscular gradativa dos membros acometidos. Alguns filhotes podem, ainda, apresentar deformações articulares, ventroflexão cervical, disfagia e megaeosôfago (DUBEY; LAPPIN, 2006; PAIXÃO; SANTOS, 2004).

Os cães adultos e idosos normalmente desenvolvem a doença devido a uma agudização de uma doença crônica assintomática. Quando acometidos, os cães apresentam envolvimento multifocal do sistema nervoso central, associado ou não à polimiosite. As alterações clínicas incluem paraparesia que pode evoluir para tetraparesia, distúrbios vestibulares, convulsões, alterações comportamentais, hiperestesia difusa e hipotonia muscular. Outras complicações menos frequentes incluem a ocorrência de uma miocardite e pneumonia (BARBER; TREES, 1996). Uma forma cutânea da enfermidade tem sido observada em cães apresentando doença imunossupressora concomitante (ORDEIX et al., 2002). Em casos de envolvimento neurológico pode ocorrer morte de animais de qualquer idade (DUBEY; LAPPIN, 2006).

O diagnóstico de neosporose é realizado por meio da demonstração de taquizoítos de *N. caninum* ou de cistos teciduais nos tecidos nervosos infectados, ou pela identificação

de anticorpos específicos por meio das técnicas de RIFI, ELISA e imunoprecipitação. Títulos da RIFI superiores a 1:50 são considerados positivos, porém, animais infectados normalmente apresentam valores acima de 1:800. Animais cronicamente infectados, assintomáticos, podem apresentar altos títulos de anticorpos durante anos (DUBEY; LAPPIN, 2006).

O relato do primeiro caso de neosporose no Brasil ocorreu em 2001 e, a partir de então, vários estudos soropidemiológicos vem sendo realizados, revelando uma elevada prevalência no país (CAÑON-FRANCO et al., 2003; GENNARI et al., 2002; SOUSA et al., 2002).

Estudos conduzidos por Tarantino et al. (2001), Cringoli et al. (2002) e Gennari et al. (no prelo), demonstraram uma alta frequência de co-infecção entre neosporose e leishmaniose visceral em cães. A causa mais provável para a alta prevalência de *N. caninum* em cães soropositivos para *Leishmania* é a imunossupressão decorrente desta.

---

---

GENNARI, S. M.; CANÓN-FRANCO, W. A.; FEITOSA, M. M. F.; IKEDA, F. A.LIMA, V. M. F.; AMAKU, M. Presence of anti-*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs infected with visceral leishmaniasis from the region of Araçatuba , São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**..(no Prelo)

## 2 OBJETIVOS

Em vista do que foi exposto anteriormente, o presente projeto de pesquisa teve por objetivos:

- Determinar e comparar a sensibilidade e a especificidade dos métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina,
- Determinar a ocorrência de possíveis reações cruzadas entre antígenos de *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* com *Leishmania chagasi*, por meio dos métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais Utilizados**

Foram utilizados nove grupos de animais. O primeiro grupo foi constituído por amostras de soro de 50 cães parasitologicamente positivos para leishmaniose visceral, sintomáticos, de ambos os sexos e com idade variando entre um e oito anos, encaminhados ao Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba e ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba - SP. O segundo grupo foi constituído por amostras de soro de 45 cães clinicamente saudáveis, de ambos os sexos e com idade variando entre um e oito anos, provenientes das cidades de Santos – SP, área considerada não endêmica para leishmaniose visceral ou tegumentar. O terceiro grupo, constituído por amostras de soro de 14 cães portadores de doença de Chagas fornecidas pelo Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. O quarto, quinto e sexto grupos constituídos por amostras de soro de 15 cães portadores de erliquiose canina, 14 cães portadores de babesiose canina e seis cães com co-infecção por erliquiose e babesiose, todos experimentalmente infectados e sorologicamente positivos, fornecidos pela Profa. Dra. Mítika Kuribayashi Hagiwara, do Departamento de Clínica Médica de Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O sétimo, oitavo e nono grupos constituídos por amostras de soro de 11 cães portadores de toxoplasmose, oito cães portadores de neosporose e 13 cães com co-infecção por

toxoplasmose e neosporose, todos experimentalmente infectados e sorologicamente positivos, fornecidos pela Profa. Dra. Solange Maria Gennari, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para a formação do grupo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral foram realizados esfregaços de medula óssea e linfonodo de 130 animais, dos quais selecionaram-se apenas os que demonstraram formas amastigotas de *Leishmania sp.* Foram, também, realizados esfregaços sanguíneos de ponta de orelha destes cães e, aqueles que demonstraram presença de hemoparasitas à microscopia, foram excluídos do grupo, utilizando-se um total de 50 cães com diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral.

### **3.2 Delineamento Experimental**

Os soros dos animais dos grupos 1 e 2 (cães naturalmente infectados por *Leishmania sp* e cães sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral) foram submetidos aos métodos de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia para o diagnóstico de leishmaniose visceral, com o objetivo de se determinar a especificidade e sensibilidade de cada um dos testes mencionados. Essas amostras também foram avaliadas para presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Babesia canis*, anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* com o objetivo de verificar a ocorrência de co-infecções ou possíveis reações cruzadas entre os antígenos.

As amostras de soro dos animais com doença de Chagas, erliquiose, babesiose, co-infecção por erliquiose e babesiose, toxoplasmose, neosporose e co-infecção por toxoplasmose e neosporose foram submetidas aos três métodos sorológicos para o diagnóstico de leishmaniose visceral, com o objetivo de avaliar a ocorrência de possíveis reações cruzadas entre os antígenos.

### **3.3 Punção Biópsia Aspirativa de Medula Óssea**

A colheita de medula óssea foi realizada com agulha hipodérmica 40x16mm, acoplada à seringa de 10 ml, mediante punção na crista íliaca, com os animais contidos em decúbito lateral. Após a anti-sepsia local, a agulha foi posicionada sobre a crista íliaca e, por meio de movimentos rotatórios, exerceu-se uma pressão até que a mesma atingisse a cavidade medular. A agulha foi, então, conectada a uma seringa descartável de polietileno de 10 ml, onde foi exercido vácuo para a aspiração do material medular. Os esfregaços do material colhido foram realizados imediatamente após a colheita, secos ao ar e corados com corante hematológico<sup>1</sup>, para posterior observação ao microscópio óptico em objetiva de 100x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* e hemoparasitas.

---

<sup>1</sup>Panótico Rápido® - Laborclin

De um total de 130 amostras pesquisadas, foram selecionados 50 animais nos quais foi possível a visualização de formas amastigotas típicas de *Leishmania sp.*

### **3.4 Punção Biópsia Aspirativa de Linfonodos**

A punção biópsia aspirativa foi realizada nos linfonodos poplíteos e pré-escapulares, na dependência de aumento de volume dos mesmos e da facilidade de punção de acordo com o animal, com uma agulha hipodérmica 25x7mm acoplada a uma seringa de 10ml. Com o material colhido foram realizados esfregaços que, posteriormente, foram corados com corante hematológico<sup>1</sup> e observados ao microscópio óptico em objetiva de 100x, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.*

### **3.5 Pesquisa de hemoparasitas**

Nos cães dos grupos 1 e 2 realizou-se a colheita de sangue periférico em região de pavilhão auricular para a confecção de esfregaços que, posteriormente, foram corados com corante hematológico<sup>1</sup> e observados ao microscópio óptico em objetiva de 100x, para a

pesquisa de hemoparasitas. Os animais que apresentavam mórulas de *Ehrlichia sp.* ou *Babesia sp.* no esfregaço foram descartados.

### 3.6 Colheita de Sangue Total

A colheita de sangue foi realizada, após anti-sepsia local, por punção da veia jugular. O sangue, num volume total de 20 ml, foi mantido à temperatura ambiente até a coagulação e retração visível do coágulo. Em seguida, sofreu centrifugação a 3.000 r.p.m., durante cinco minutos, para melhor separação do soro. Este, por sua vez, foi transferido para ependorfes com o auxílio de pipeta automática e congelado imediatamente a -20° C, até o momento do seu processamento.

---

<sup>1</sup>Panótico Rápido® - Laborclin

### 3.7 ELISA para Leishmaniose Visceral

A presença de IgG anti-*Leishmania sp.* no soro, foi determinada por meio da técnica de ELISA, como descrita por Lima et al (2003). As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/74/PP75, numa concentração de 20µg/ml em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS-tween por três vezes, as placas foram bloqueadas com 200 µl de BSF 10% em PBS e incubadas à temperatura ambiente, durante duas horas. Após nova lavagem com PBS-tween por três vezes, 100 µl do soro controle positivo, do soro controle negativo e das amostras de soros dos animais dos nove grupos experimentais, diluídas 1:400 em PBS contendo 0,05% de Tween® 20 e 10% de BSF, foram adicionadas a cada poço e incubadas por três horas à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com PBS-tween 20, adicionou-se à placa 100 µl de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com peroxidase<sup>1</sup>, previamente titulado. Após a incubação por uma hora em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada quatro vezes com PBS-Tween® 20 e foram adicionados 100 µl de uma solução contendo substrato OPD (0,4 mg/ml) em diluente apropriado. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e, a densidade óptica (D.O.)

foi avaliada a 492nm, utilizando-se um leitor de ELISA<sup>2</sup>. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em triplicata. Para a determinação do ponto de corte foi realizado o teste de ELISA no soro de 20 cães sadios de área não endêmica para leishmaniose visceral. O ponto foi estipulado a partir da média acrescida de três desvios-padrões da leitura da densidade óptica (DO), o qual foi considerado 0,270.

### **3.8 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para leishmaniose visceral**

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral foi realizada de acordo com Camargo (1974). As lâminas foram sensibilizadas adicionando-se 15 µl da suspensão de parasitas, promastigotas de *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa 46, em PBS em cada círculo. Após a secagem em estufa, as

---

<sup>1</sup> Sigma –Aldrich Brasil LTDA

<sup>2</sup> Labsystems Multiskan EX

lâminas foram embaladas em papel extra-fino e papel alumínio e armazenadas em freezer à -20°C. No momento do uso, as lâminas foram descongeladas em estufa durante cinco minutos. Em cada círculo foram adicionados 20 µl das amostras de soro a serem testados, diluídas na concentração de 1:40 em PBS. As lâminas foram então incubadas durante 30 minutos em câmara úmida à 37 °C e, em seguida, lavadas por imersão em PBS por três vezes. O anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína<sup>1</sup> foi diluído na concentração de 1:100 em azul de Evans e, 20 µl desta solução foram adicionados em cada círculo das lâminas, as quais foram novamente incubadas durante 30 minutos à 37 °C. Optou-se por utilizar a diluição 1:100 do conjugado, por ter sido esta a que melhor discriminou os soros positivos das amostras negativas para leishmaniose visceral canina. Após nova lavagem em tampão PBS, foi adicionada glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 9,5) e as lâminas foram recobertas por lamínula para leitura em microscópio de fluorescência. Soros sabidamente positivos e negativos foram utilizados em cada lâmina como controles positivo e negativo da reação. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluições iguais a 1:40. As amostras de soros positivas nesta diluição foram novamente testadas para a determinação

do título. Em cada círculo da lâmina foram adicionados 20 µl de diluições sucessivas dos soros testes positivos a partir de 1:80, duplicando-se a diluição até 1:1280.

### **3.9 Imunocromatografia para leishmaniose visceral**

Para a realização da técnica de imunocromatografia utilizou-se um Kit comercial<sup>2</sup> que detecta a presença de anticorpos anti-*Leishmania sp.* no soro de animais. Em uma fita impregnada com o antígeno foram aplicados 20 µl do soro a ser testado. Em seguida, foram adicionadas três gotas de tampão à fita, cuja leitura foi realizada após 10 minutos. A fita apresenta uma membrana pré-coberta com o antígeno recombinante (rK39) na região da banda teste e anti-proteína A na região da banda controle. Durante o teste, a amostra de soro reage com o conjugado colorimétrico (conjugado proteína A coloidal de ouro) e a mistura então ascende através da membrana

---

<sup>1</sup> Sigma –Aldrich Brasil LTDA

<sup>2</sup> Kalazar Detect Animal Rapid Test – Inbios International

por capilaridade, reagindo com o antígeno e produzindo uma banda vermelha. Apesar da presença de anticorpos anti-*Leishmania sp.* no soro, a mistura continua a migrar através da membrana até a região da anti-proteína A, dando origem a uma nova banda vermelha nesta região. A presença desta linha indica um volume adequado da amostra de soro utilizada, um fluxo adequado através da fita e a viabilidade dos reagentes. Desta forma, o teste foi considerado positivo quando se formaram duas faixas vermelhas e, negativo, quando aparecia somente a faixa controle. Os resultados foram determinados individualmente, de forma qualitativa (positivo ou negativo) e as variações da intensidade de cor da banda formada foram classificadas em escores variando de fraco positivo (1/2+), quando de uma banda tênue, à forte positivo (3+), quando de uma banda de cor intensa.

### **3.10 ELISA para doença de Chagas**

A presença de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* nas amostras de soros dos animais naturalmente acometidos por leishmaniose visceral e de animais sadios foi determinada por

meio do método de TESA-ELISA, utilizando exoantígenos de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, realizado de acordo com a técnica descrita por Umezawa et al. (2001).

### **3.11 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para babesiose, toxoplasmose e neosporose.**

A RIFI para detecção de anticorpos anti-*Babesia canis* foi realizada segundo Machado (1994). As reações de imunofluorescência indireta utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* foram realizadas de acordo com Dubey et al. (1988) e Camargo (1974), respectivamente, estabelecendo-se como ponto de corte 1:50 para neosporose e 1:16 para toxoplasmose.

### **3.12 Teste de imunoensaio enzimático para a detecção de anticorpos anti-*Erlichia canis***

Para a realização do teste de imunoensaio enzimático utilizou-se o Kit comercial SNAP\*3Dx\*<sup>1</sup>. Foram pipetadas três gotas do soro de cada amostra e armazenadas em ependorfes fornecidos juntamente com o Kit. Em seguida, foram adicionadas quatro gotas do conjugado anti-*Erlichia canis* HRPO fornecido pelo teste, em cada ependorfe. Os tubos foram homogeneizados e o conteúdo de cada tubo colocado em um dispositivo para a realização do teste. Oito minutos após acionar o ativador do dispositivo realizava-se a leitura do teste. De acordo com o fabricante, um resultado positivo, indicado pela presença de um círculo azul, corresponde a um elevado título de anticorpos anti-*E. canis*.

### **3.13 Análise Estatística**

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

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

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

---

<sup>1</sup> IDDEX Laboratories

O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar a concordância dos métodos de ELISA, RIFI e imunocromatografia com o exame parasitológico. A interpretação da concordância entre os métodos a partir dos valores de Kappa, de acordo com Pereira (2001), encontra-se apresentada na tabela abaixo.

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



As análises foram realizadas utilizando-se o programa “Statistical Analysis System” (SAS).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral.**

Todas as amostras de soro dos cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral foram submetidas à técnica de ELISA, e o número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se

apresentados na tabela 1. Os valores individuais das médias das absorvâncias (densidades ópticas) encontram-se apresentados no quadro 1 (anexos).

Somente 49 amostras de soro foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), pois ocorreu um problema no frasco em que se encontrava armazenada uma das amostras, que precisou ser descartada do experimento. Como esta avaliação foi a última a ser realizada durante o experimento, não havia outra alíquota de soro do mesmo cão que pudesse substituí-la. O número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na tabela 2. Os valores individuais dos títulos de anticorpos encontram-se apresentados no quadro 2 (anexos).

As amostras dos 50 soros submetidos à técnica de imunocromatografia foram qualitativamente classificadas na dependência da intensidade de cor da banda formada. O número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados na tabela 3. Os resultados individuais das leituras das fitas encontram-se apresentados no quadro 3 (anexos).

Tabela 1– Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA, em número absoluto e percentagem, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>ELISA</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Positivo</b>	47	94%
<b>Negativo</b>	3	6%
<b>Total</b>	50	100%

Tabela 2– Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>RIFI</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Positivo</b>	48	98%
<b>Negativo</b>	1	2%
<b>Total</b>	49	100%

Tabela 3– Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia, em número absoluto e percentagem, de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.*, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Imunocromatografia</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Positivo</b>	43	86%
<b>Negativo</b>	7	14%
<b>Total</b>	50	100%

#### **4.2 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras dos soros de animais sadios, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.**

As 45 amostras de soro dos cães de área não endêmica foram submetidas às técnicas de ELISA, RIFI e imunocromatografia, e o número de cães e sua respectiva percentagem, de acordo com o resultado da sorologia, encontram-se apresentados nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados nos quadros 4, 5 e 6, respectivamente (anexos).

Tabela 4- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA, em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>ELISA</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Positivo</b>	7	15,6 %
<b>Negativo</b>	38	84,4%

<b>Total</b>	45	100%
--------------	----	------

Tabela 5- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente saudáveis provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>RIFI</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Positivo</b>	4	8,9%
<b>Negativo</b>	41	91,1%
<b>Total</b>	45	100%

Tabela 6- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia, em número absoluto e percentagem, de cães clinicamente saudáveis provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Imunocromatografia</b>	<b>Número de animais</b>	<b>Percentagem</b>
<b>Positivo</b>	4	8,9%
<b>Negativo</b>	41	91,1%
<b>Total</b>	45	100%

#### **4.3 Determinação dos valores de sensibilidade e especificidade relativas dos métodos empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.**

A sensibilidade e especificidade relativas dos métodos de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia foram determinadas considerando-se como referência os resultados obtidos no exame parasitológico para leishmaniose visceral canina. Os valores de sensibilidade e especificidade, bem como o coeficiente Kappa, encontram-se apresentados na tabela 7.

Tabela 7- Valores de sensibilidade e especificidade relativas para as técnicas de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia empregadas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006)

	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Kappa</b>
<b>RIFI</b>	98,0%	91,1%	0,893

<b>ELISA</b>	94,0%	84,4%	0,788
<b>Imunocromatografia</b>	86,0%	91,1%	0,769

#### 4.4 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de animais portadores de doença de Chagas.

Das 14 amostras de soro de cães com doença de Chagas submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, nove (64,3%) apresentaram resultado positivo por meio da técnica de ELISA, seis (42,9%) pela RIFI e todas foram consideradas negativas pelo teste de imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 8 e os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 7 (anexos).

Tabela 8-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 14 cães portadores de doença de Chagas. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>C1</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>C2</b>	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C3</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>C4</b>	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C5</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>C6</b>	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C7</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>C8</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>C9</b>	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C10</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>C11</b>	Positivo	Positivo	Negativo
<b>C12</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>C13</b>	Negativo	Positivo	Negativo
<b>C14</b>	Negativo	Negativo	Negativo

#### 4.5 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de animais portadores de erliquiose, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.

Das 13 amostras de soro de animais portadores de erliquiose submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, uma (7,7%) apresentou valor acima do ponto de corte pelo método de ELISA, nenhuma foi considerada positiva pela reação de imunofluorescência indireta e uma (7,7%) apresentou reatividade ao teste de imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 9 e os valores individuais das médias das absorvâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 8 (anexos).

Tabela 9-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 13 cães portadores de erliquiose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>168</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>169</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>171</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>172</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>174</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>175</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>177</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>178</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>179</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>180</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>181</b>	Negativo	Negativo	Positivo
<b>182</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>183</b>	Negativo	Negativo	Negativo

#### **4.6 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de animais portadores de babesiose, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.**

Das 12 amostras de soro de cães com babesiose submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, nenhuma apresentou reação positiva por meio dos métodos

de ELISA, RIFI e imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 10 e os valores individuais das médias das absorvâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 9 (anexos).

Tabela 10-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 12 cães portadores de babesiose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>149</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>150</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>151</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>152</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>153</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>154</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>155</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>156</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>157</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>158</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>159</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>160</b>	Negativo	Negativo	Negativo

#### **4.7 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. nas amostras de soro de animais apresentando co-infecção por erliquiose e babesiose, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.**

Das seis amostras de soro de cães apresentando co-infecção por erliquiose e babesiose, submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, cinco (83,3%) apresentaram resultado positivo por meio da técnica de ELISA, nenhum pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e, três (50%) apresentaram reatividade ao teste de imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 11 e os valores individuais das médias das absorvâncias

(densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 10 (anexos).

Tabela 11-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de seis cães com co-infecção por erliquiose e babesiose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>161</b>	Positivo	Negativo	Positivo
<b>162</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>163</b>	Positivo	Negativo	Positivo
<b>164</b>	Positivo	Negativo	Negativo
<b>165</b>	Positivo	Negativo	Positivo
<b>166</b>	Negativo	Negativo	Negativo

#### **4.8 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de animais portadores de toxoplasmose, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.**

Das 10 amostras de soro de cães infectados com toxoplasmose, submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, todas apresentaram resultados negativos por meio da técnica de ELISA, cinco (50%) apresentaram resultado positivo pela reação de imunofluorescência indireta e uma (10%) foi classificada como positiva pela técnica de imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 12 e os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 11 (anexos).

Tabela 12-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 10 cães portadores de toxoplasmose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>118</b>	Negativo	Positivo	Negativo
<b>119</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>122</b>	Negativo	Positivo	Negativo



123	Negativo	Negativo	Negativo
124	Negativo	Positivo	Negativo
128	Negativo	Negativo	Negativo
131	Negativo	Positivo	Negativo
133	Negativo	Negativo	Negativo
138	Negativo	Positivo	Negativo
148	Negativo	Negativo	Positivo

#### 4.9 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de animais portadores de neosporose, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.

Das oito amostras de soro de cães com neosporose, submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, todas apresentaram resultados negativos por meio das técnicas de ELISA e imunofluorescência indireta (RIFI) e uma (12,5%) foi classificada como positiva pela técnica de imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 13 e os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 12 (anexos).

Tabela 13-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de oito cães portadores de neosporose. (Araçatuba-SP, 2006)

Animal	ELISA	RIFI	Imunocromatografia
121	Negativo	Negativo	Negativo
126	Negativo	Negativo	Negativo
129	Negativo	Negativo	Negativo
134	Negativo	Negativo	Negativo
137	Negativo	Negativo	Negativo
140	Negativo	Negativo	Positivo
144	Negativo	Negativo	Negativo
147	Negativo	Negativo	Negativo

#### 4.10 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soros de animais apresentando co-infecção por toxoplasmose e neosporose, provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral canina.

Das 13 amostras de soro de cães com co-infecção por toxoplasmose e neosporose, submetidas à sorologia para leishmaniose visceral, todas apresentaram resultados negativos por meio das técnicas de ELISA e imunofluorescência indireta (RIFI) e três (23%) foram classificadas como positivas pela técnica de imunocromatografia. Os resultados das sorologias encontram-se apresentados na tabela 14 e os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas), dos títulos de anticorpos e das leituras das fitas de imunocromatografia encontram-se apresentados no quadro 13 (anexos).

Tabela 14-Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica de ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia em amostras de soro de 13 cães com co-infecção por toxoplasmose e neosporose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
120	Negativo	Negativo	Negativo
125	Negativo	Negativo	Negativo
127	Negativo	Negativo	Positivo
130	Negativo	Negativo	Negativo
132	Negativo	Negativo	Negativo
135	Negativo	Negativo	Negativo
136	Negativo	Negativo	Negativo
139	Negativo	Negativo	Positivo
141	Negativo	Negativo	Positivo
142	Negativo	Negativo	Negativo
143	Negativo	Negativo	Negativo
145	Negativo	Negativo	Negativo
146	Negativo	Negativo	Negativo

#### 4.11 Percentagem de ocorrência de reações cruzadas entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas, erliquiose, babesiose, co-infecção por erliquiose e babesiose, toxoplasmose, neosporose e co-infecção por

**toxoplasmose e neosporose, submetidas à sorologia para leishmaniose visceral.**

As percentagens de ocorrência de reações cruzadas entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas, erliquiose, babesiose, co-infecção por erliquiose e babesiose, toxoplasmose, neosporose e co-infecção por toxoplasmose e neosporose, submetidas à sorologia para leishmaniose visceral por meio da técnica ELISA, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e por imunocromatografia encontram-se apresentadas nas figuras 1, 2 e 3.

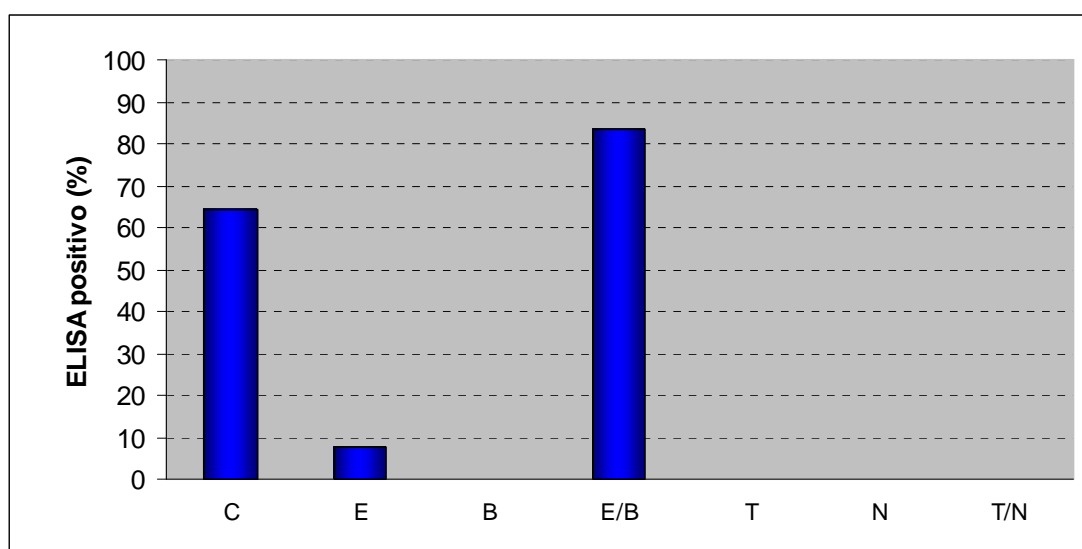


FIGURA 1- Percentagem da ocorrência de reação cruzada entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas (C), erliquiose (E), babesiose (B) e co-infecção por erliquiose e babesiose (E/B), toxoplasmose (T), neosporose (N) e co-infecção por toxoplasmose e neosporose (T/N) submetidas à técnica ELISA para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. (Araçatuba –SP, 2006)

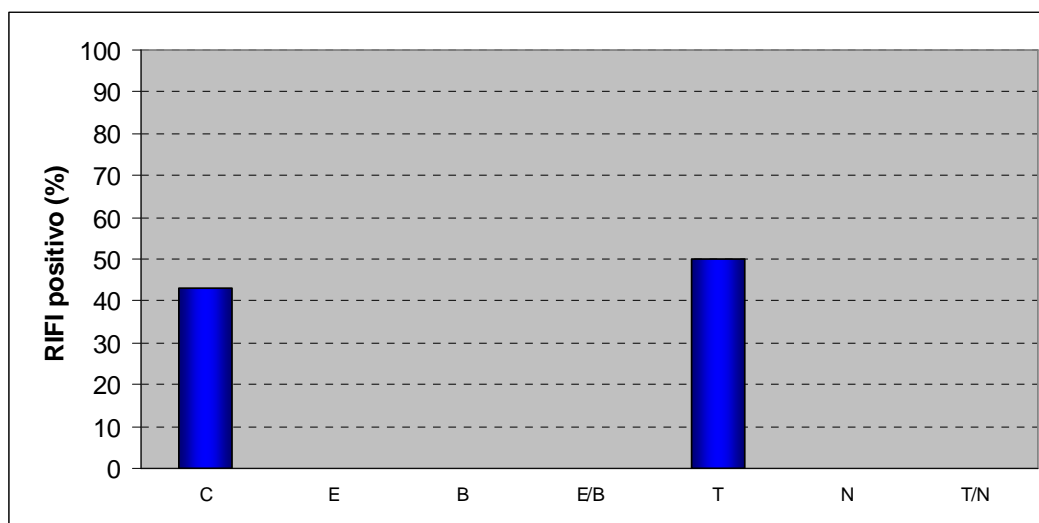


FIGURA 2- Percentagem da ocorrência de reação cruzada entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas (C), erliquiose (E), babesiose (B), co-infecção por erliquiose e babesiose (E/B), toxoplasmose (T), neosporose (N) e co-infecção por toxoplasmose e neosporose (T/N) submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006)

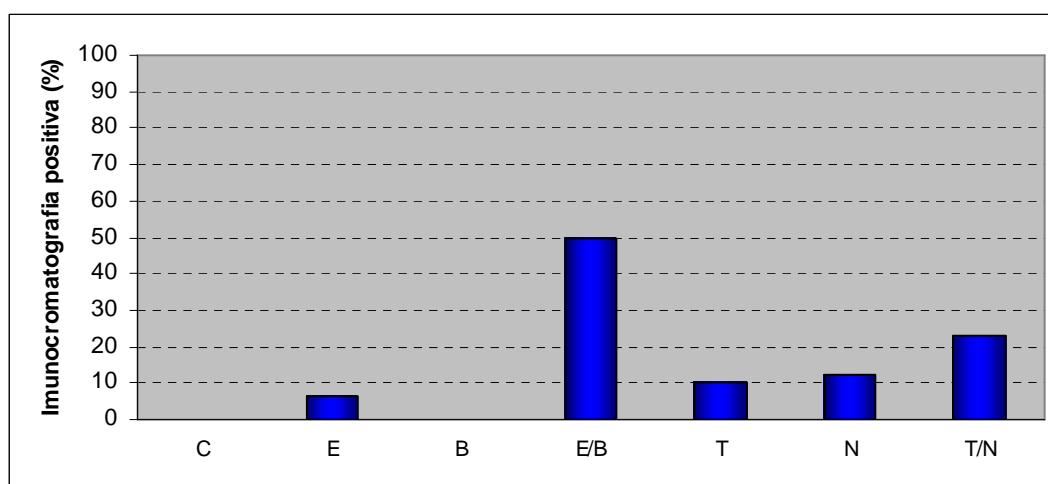


FIGURA 3- Percentagem da ocorrência de reação cruzada entre amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas (C), erliquiose (E), babesiose (B), co-infecção por erliquiose e babesiose (E/B), toxoplasmose (T), neosporose (N) e co-infecção por toxoplasmose e neosporose (T/N), submetidas à técnica de imunocromatografia para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina. (Araçatuba-SP, 2006)

#### 4.12 Sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose nas amostras de soro de animais parasitologicamente positivos para leishmaniose visceral.

Todas as amostras de soro de cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral foram submetidas à sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose. Das 50 amostras testadas, nenhuma apresentou sorologia positiva para doença de Chagas, 28 (56%) apresentaram sorologia positiva para erliquiose, 42 (85,7%) para babesiose, 17 (34%) para toxoplasmose e oito (16%) para neosporose. Os resultados encontram-se apresentados individualmente no tabela 15.

Tabela 15- Resultados da sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose em amostras de soro de 50 cães naturalmente infectados por leishmaniose visceral, provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>Doença de Chagas</b>	<b>Erliquiose</b>	<b>Babesiose</b>	<b>Toxoplasmose</b>	<b>Neosporose</b>
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
5	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
11	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
34	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
37	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
39	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
50	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
52	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
54	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
56	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

59	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	.	.	.
63	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
64	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
73	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
74	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
75	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
77	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
80	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
82	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
83	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
85	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
86	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
87	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
88	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
89	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
91	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
92	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
94	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
98	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
99	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
100	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
113	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
117	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

#### **4.13 Sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose nas amostras de soro de animais sadios, provenientes de áreas não endêmicas para leishmaniose visceral canina.**

Todas as amostras de soro de cães clinicamente sadios provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral foram submetidas à sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose. Das 45 amostras testadas, nenhuma apresentou sorologia positiva para doença de Chagas, sete (15,6%) apresentaram sorologia positiva para erliquiose, 38 (84,4%) para babesiose, 17 (37,8%) para toxoplasmose e nenhuma para neosporose. Os resultados encontram-se apresentados individualmente no tabela 16.

Tabela 16- Resultados da sorologia para doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose em amostras de soro de 45 cães sadios

provenientes de área não endêmica para leishmaniose visceral.  
(Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>Doença de Chagas</b>	<b>Erliquiose</b>	<b>Babesiose</b>	<b>Toxoplasmose</b>	<b>Neosporose</b>
184	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
185	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
186	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
187	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
188	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
189	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
190	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
191	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
192	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
193	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
194	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
195	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
196	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
197	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
198	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
199	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
200	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
201	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
202	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
203	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
204	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
205	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
206	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
207	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
208	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
209	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
210	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
211	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
212	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
213	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
214	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
215	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
216	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
217	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
218	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
219	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
220	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
221	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
222	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
223	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
224	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
225	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
226	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
227	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
228	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

## **5 DISCUSSÃO**

A escolha dos métodos sorológicos avaliados neste estudo baseou-se no fato da reação de imunofluorescência indireta e do ELISA serem os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde para a o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, e do teste



comercial de imunocromatografia ser um método recém desenvolvido que tem como atrativo, além de sua praticidade e rápido resultado, o antígeno recombinante K39, o qual determina elevada especificidade. No presente estudo, a reação de imunofluorescência indireta apresentou elevados valores de sensibilidade (98%) e especificidade (91,1%) (tabela 7), demonstrando o melhor desempenho quando comparada aos outros dois métodos, corroborando os relatos de Alves e Bevilacqua, (2004) e Mettler et al. (2005), no entanto, com especificidade abaixo da descrita por Mancianti et al. (1995). Apesar do bom desempenho, a reação de imunofluorescência indireta é uma técnica laboriosa, principalmente quando se deseja avaliar uma grande número de amostras, e requer habilidade do observador para interpretação dos resultados, pois o limiar entre reações positivas e negativas é muito sutil e, algumas vezes, subjetivo.

O método de ELISA apresentou sensibilidade de 94%, que se aproxima dos valores observados por Laurenti et al. (2005) e Mancianti et al. (1995). A especificidade observada nesta reação foi de 84,4% (tabela 7), valor próximo ao observado por Ashford et al. (1995) e inferior ao verificado por Vercammen et al. (1997). O método de ELISA apresentou como atrativo a capacidade de processar várias amostras de soro simultaneamente em um curto intervalo de tempo, qualidade almejada para inquéritos epidemiológicos.

O teste de imunocromatografia demonstrou 86% de sensibilidade e 91,1% de especificidade (tabela 7), dados que se aproximam dos apresentados por Laurenti et al. (2005) e Melo (2004), os quais avaliaram pacientes caninos. Os valores obtidos encontram-se um pouco abaixo dos verificados por Bern et al. (2000), Carvalho et al. (2003) e Sundar et al. (2002), os quais submeteram ao teste amostras de soro de pacientes humanos. Ao contrário dos resultados obtidos por Reinthinger et al. (2002), a especificidade deste teste demonstrou ser elevada. O teste de imunocromatografia destacou-se por ser de fácil execução e pela rapidez de seus resultados. Devido a essas qualidades este método torna-se uma opção viável de diagnóstico em regiões onde o acesso a laboratórios é restrito, com custo unitário da fita de imunocromatografia em torno de R\$12,00.

A concordância de cada teste individualmente com o método parasitológico, que foi adotado como padrão ouro neste trabalho, foi avaliada por meio da determinação do coeficiente Kappa. O coeficiente Kappa demonstrou discreta diferença entre os métodos avaliados com o teste ouro. Dentre os métodos avaliados, a RIFI apresentou uma ótima

concordância (Kappa = 0,893) com o exame parasitológico, seguida dos métodos de ELISA (Kappa = 0,788) e de imunocromatografia (Kappa = 0,769), ambos com uma concordância considerada boa, de acordo com os critérios sugeridos por Pereira (2001).

No presente experimento, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania sp.* nas amostras de soro de animais portadores de doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose produziu reações cruzadas com todos os agentes etiológicos, exceto *Babesia canis*, em pelo menos uma das três técnicas avaliadas, corroborando os achados de Alves e Bevilacqua (2004), Costa et al. (1991) e discordando das observações de Lima et al. (2005) e Vercammen et al. (1997).

Das 14 amostras de soro de cães portadores de doença de Chagas nove (64,3%) foram positivas por meio do método de ELISA, seis (42,9%) positivas na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e nenhuma amostra foi considerada positiva pelo teste de imunocromatografia para leishmaniose visceral (quadro 7). O emprego de antígenos totais nos métodos de ELISA e RIFI, aparentemente, prejudicou a especificidade e predispôs à ocorrência de reação cruzada com o *T. cruzi*, concordando com os relatos de Melo (2004) e Rachamin et al. (1991). Uma desvantagem do uso de antígeno total é que ele pode compartilhar epítomos comuns com outros antígenos microbianos e pode reagir com soro de pacientes positivos para outras doenças infecciosas. Por outro lado, torna-se evidente o auxílio da técnica de imunocromatografia no diagnóstico de cães portadores de leishmaniose visceral em áreas endêmicas para a doença de Chagas.

Das 13 amostras de soro de cães portadores de erliquiose, uma (animal 174) foi positiva por meio do método de ELISA e outra (animal 181) por imunocromatografia (quadro 8). Apesar de Vercammen et al. (1997) afirmarem não existir reação cruzada entre leishmaniose visceral e erliquiose por meio da técnica de ELISA, os autores avaliaram o soro de um único cão portador de erliquiose, o que certamente prejudica a confiabilidade dos resultados. Por outro lado, Lima et al (2005) testaram amostras de soro de 15 cães com erliquiose, um número um pouco maior que o testado no presente experimento, e não obtiveram reações cruzadas. A reação de imunofluorescência indireta foi a única que não apresentou reações cruzadas entre erliquiose e leishmaniose visceral canina.

A ausência de reação cruzada com soros de animais infectados por *Babesia sp.* foi observada em todos os três métodos (quadro 9), concordando com Lima et al. (2005) e

Vercammen et al.(1997), e discordando de Rosário et al (2005). Por outro lado, os soros de cães concomitantemente infectados por *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.* apresentaram resultados positivos pelas técnicas de ELISA e imunocromatografia em cinco (83,3%) e três (50%) das seis amostras testadas, respectivamente (quadro 10). Não foi possível correlacionar os valores de absorbância média observada pela técnica de ELISA e os resultados da imunocromatografia. Enquanto o cão 161 apresentou absorbância de 0,313 pelo ELISA e foi considerado como positivo (+) por imunocromatografia, o animal 162 possuía absorbância de 0,310 e foi classificado como negativo pela técnica de imunocromatografia. Apesar da ausência de relatos na literatura, a co-infecção entre erliquiose e babesiose aumentou a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose visceral quando comparado aos agentes isoladamente.

Nenhuma das amostras de soro dos 10 cães portadores de toxoplasmose apresentou reação cruzada por meio da técnica de ELISA, confirmando os relatos de Lima et al. (2005). No entanto, cinco (50%) foram positivas pela RIFI e uma (10%) pelo teste de imunocromatografia (quadro 11), demonstrando ser a técnica de ELISA a mais confiável em regiões com alta prevalência de toxoplasmose.

Apesar da ausência de relatos na literatura sobre estudos pesquisando possíveis reações cruzadas entre neosporose e leishmaniose visceral por meio de técnicas sorológicas, no presente experimento foi possível verificar que as amostras soropositivas para neosporose (quadro 12) e de animais com co-infecção por toxoplasmose e neosporose (quadro 13) apresentaram resultados positivos somente pela técnica de imunocromatografia, revelando um (12,5%) e três (23%) resultados positivos, respectivamente. Diferente do que se observou com co-infecção por erliquiose e babesiose, os soros de cães apresentando co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* não apresentaram uma maior ocorrência de reação cruzada com leishmaniose visceral quando comparado com os dois agentes isoladamente.

Embora existam descrições na literatura da ocorrência de reações cruzadas entre leishmaniose visceral e as demais enfermidades testadas no presente experimento, como as descritas por Alves e Bevilacqua (2004) e Costa et al. (1991), tais estudos não mencionam o título obtido por meio da reação de imunofluorescência indireta e nem a densidade óptica observada na técnica de ELISA. É importante ressaltar, no entanto, que a maioria dos animais erroneamente classificados como positivos no presente experimento, apresentaram

reações fracamente positivas, com títulos de RIFI, densidades ópticas de ELISA e escores de imunocromatografia próximos ao ponto de corte estabelecido pelo método, valores muito inferiores aos demonstrados pelas médias das amostras do grupo controle positivo.

À exceção do que ocorreu aos demais patógenos, algumas amostras de soro positivas para doença de Chagas atingiram valores elevados de densidade óptica pelo método de ELISA, fato este justificado pela relação filogenética entre *L. chagasi* e *T. cruzi*, confirmando os relatos de Badaró et al. (1986). Deste modo, os resultados sorológicos positivos para leishmaniose visceral devem ser interpretados com muita cautela devido à possibilidade de reação cruzada com doença de Chagas, especialmente em áreas onde há sobreposição das duas enfermidades, situação muito comum em diversas regiões do Brasil. Diante desta situação, dos métodos avaliados, o teste comercial de imunocromatografia empregando como antígeno o rk39 é a melhor opção devido à sua capacidade de distinguir, com sucesso, os pacientes chagásicos daqueles infectados pela *L. (L.) chagasi*, em função de sua elevada especificidade.

Embora o número de amostras testadas seja pequeno, a percentagem de reação cruzada entre cães positivos para leishmaniose visceral e animais apresentando co-infecção entre erliquiose e babesiose foi bastante elevada, alcançando valores de 83,3% no ELISA e 50% na imunocromatografia. Tais observações não podem ser confrontadas com a literatura, uma vez que os trabalhos realizados testaram soros de animais infectados por um único agente, como os descritos por Lima et al. (2005), Rosário et al. (2005) e Vercammen et al. (1997). A reação cruzada entre *Leishmania sp.* e *Ehrlichia sp.* por meio das mesmas técnicas também ocorreu, porém, com menor frequência (7,7% para ambos os testes). Este fato gera preocupação, pois estas duas enfermidades apresentam sintomas que, freqüentemente, assemelham-se aos observados na leishmaniose visceral canina, além de coexistirem em grande parte do país. Por este motivo, devemos atentar aos resultados positivos para o calazar canino quando houver suspeita de co-infecção, principalmente quando o ELISA ou o teste de imunocromatografia forem empregados. Nesta situação, a possibilidade de co-infecção deve ser descartada por meio da pesquisa de mórulas de *Ehrlichia sp.* ou *Babesia sp.* em esfregaços de sangue periférico antes de se firmar o diagnóstico sorológico e, sempre que possível, o método de escolha deve ser a reação de imunofluorescência indireta.

A literatura descreve apenas um trabalho avaliando reação cruzada entre toxoplasmose e leishmaniose visceral (Lima et al., 2005), a qual não foi observada pelos autores, que utilizaram a técnica de ELISA, fato este também verificado no presente experimento. Entretanto, as reações cruzadas envolvendo toxoplasmose ocorreram por meio das técnicas de imunocromatografia (10%) e, mais pronunciadamente, pela RIFI (50%), sugerindo a utilização do método de ELISA para a avaliação de cães com alterações neuromusculares compatíveis com o envolvimento destas duas enfermidades. Apesar da elevada ocorrência de reação cruzada entre *L. chagasi* e *T. gondii*, por meio da RIFI, os títulos máximos destas reações não ultrapassaram 1:80.

A soroprevalência de erliquiose nas amostras dos 50 cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* (tabela 15) e dos 45 cães clinicamente saudáveis (tabela 16) foi de 56% e 15,6%, respectivamente, sugerindo que a elevação do número de casos soropositivos pode estar relacionada à imunossupressão causada pela leishmaniose visceral. Além disto, é importante ressaltar que a soroprevalência da erliquiose nos animais provenientes de Araçatuba – SP ultrapassou o dobro da observada em um estudo realizado em clínicas e hospitais do estado de São Paulo, a qual aproximou-se de 20% (MACHADO, 2004; MORAES et al., 2004).

A soroprevalência de neosporose nos animais naturalmente infectados por leishmaniose visceral também foi superior (16%) quando comparada aos cães saudáveis, que não apresentaram sororeatividade para a doença, sugerindo que a imunossupressão causada pela leishmaniose também predispõe à infecção por este protozoário, conforme descrito por Cringoli et al. (2002), Gennari et al. (no prelo) e Tarantino et al. (2001). Não houve diferença aparente entre as soroprevalências de doença de Chagas, babesiose e toxoplasmose nas amostras dos dois grupos acima citados.

Em relação ao grupo de 45 cães saudáveis, dos nove animais que apresentaram resultados falso positivos por meio das técnicas sorológicas, os sete que apresentaram sorologia positiva pela técnica de ELISA (quadro 4) possuíam anticorpos anti-*Babesia sp.*, sendo que destes, dois apresentavam também anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*. Apesar de não ter sido observada reação cruzada pela técnica de ELISA para leishmaniose visceral no soro de cães com babesiose, confirmando os relatos de Lima et al. (2005) e Vercammen et al. (1997), no grupo de cães provenientes de área não endêmica para leishmaniose

visceral esta reação parece ter ocorrido, a não ser que seja decorrente de formação de anticorpos contra outro agente não testado no presente experimento. Dos quatro cães que apresentaram sorologia positiva pela RIFI (quadro 5), três possuíam anticorpos anti-*Babesia sp.* e um anti-*Toxoplasma sp.* discordando dos achados de Vercammen et al (1997). Finalmente, os quatro cães com sorologia positiva pela imunocromatografia (quadro 6) também possuíam anticorpos anti-*Babesia sp.*, sendo que um deles se observou também anticorpos anti-*Toxoplasma sp.*, mais uma vez sugerindo haver reação cruzada entre babesiose e leishmaniose visceral, apesar dos resultados negativos nos soros de cães portadores de babesiose.

Com base nos valores de Kappa e na comparação entre os valores de sensibilidade e especificidade de cada método testado, o presente estudo permitiu concluir que a reação de imunofluorescência indireta apresentou o melhor desempenho, seguida da técnica de ELISA e, por último, pela imunocromatografia. Os resultados apresentados diferem parcialmente dos apresentados por Mancianti et al. (1995), que verificou em seus estudos uma sensibilidade do método de ELISA superior ao da RIFI concluindo, no entanto, que ambos os métodos são aptos para o sorodiagnóstico da doença.

Apesar da reação de imunofluorescência indireta ter apresentado o melhor desempenho, a escolha do método sorológico para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina depende também da praticidade e do custo de sua execução, além do conhecimento da situação epidemiológica da doença na área onde as amostras de soros serão avaliadas. Em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, onde a prevalência da doença é elevada, é preferível a utilização de um teste que apresente elevada sensibilidade para identificar dentre uma população de suspeitos o maior número de animais infectados, evitando que cães positivos permaneçam como fontes de infecção para o vetor e, conseqüentemente, minimizando as chances de infecção humana. Neste contexto, as técnicas de ELISA e da RIFI são opções aceitáveis por apresentarem elevada sensibilidade. No entanto, concordando com Mancianti et al. (1995), o método de ELISA apresenta a vantagem de realização de inquéritos epidemiológicos em larga escala com rápida divulgação dos resultados. A RIFI, apesar da elevada sensibilidade, é uma técnica laboriosa que consome muito tempo para o processamento de um grande número de amostras, fato este que compromete o sucesso de um programa de controle da doença baseado na eutanásia de cães

infectados.

Por outro lado, em áreas com baixa prevalência da doença, o médico veterinário tende a optar por um teste com elevada especificidade para evitar que cães sejam erroneamente diagnosticados como portadores de leishmaniose visceral e, conseqüentemente, submetidos à eutanásia desnecessariamente. Nesta situação, a técnica de imunocromatografia é adequada devido à sua elevada especificidade, além de não haver a necessidade de se equipar laboratórios em áreas onde a prevalência da doença seja baixa e não justifique tal empreendimento.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições do presente experimento, permitem concluir:

1. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) apresenta o melhor desempenho dentre os três métodos avaliados, demonstrando 98% de sensibilidade e 91,1% de especificidade, além de ótima concordância com o método parasitológico (Kappa = 0,893);
2. O método de ELISA apresenta 94% de sensibilidade e 84,4% de especificidade, além de boa concordância com o método parasitológico (Kappa = 0,788);
3. O teste de imunocromatografia apresenta o pior desempenho dentre os três métodos avaliados, demonstrando uma sensibilidade de 86% e especificidade de 91,1%, apesar de boa concordância com o método parasitológico (Kappa = 0,769);
4. A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania sp* apresenta resultados positivos nas amostras de soros de animais portadores de doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose em, pelo menos, uma das três técnicas avaliadas, confirmando a ocorrência de reação cruzada entre os agentes etiológicos destas enfermidades.



## 7 REFERÊNCIAS

ABDULLAHI, S. U.; MOHAMMED, A. A.; TRIMMEL, A. R.; SANNUSI, A.; ALAFIATAYO, R. Clinical and haematological findings in 70 naturally occurring cases of canine babesiosis. **Journal of Small Animal Practice**, v.31, n.3, p.145-147, 1990.

ALENCAR, J.E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.706-717.

ALVES, R.O. **Avaliações ecodopplercardiográfica computadorizada e dinâmica (sistema Holter) e clínico-patológica em cães com cardiomiopatia chagásica experimental**. 2003. 89f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

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

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGUSKY, M.; WENTHOLD, R.J.Jr.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultraestructutural characterization of cardiac changes in the canine model. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, n.3, p.328-336, 1997.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHES, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIQUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, n.1, p.133-138, 1998.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR, R.H.; BADARÓ, R.; DAVID, J.R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for

the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.3, p.251-255, 1995.

AZEVEDO, S. S.; BATISTA, C. S. A.; VASCONCELLOS, S. A.; AGUIAR, D. M.; RAGOZO, A. M. A.; RODRIGUES, A. A. R.; ALVES, C. J.; GENNARI, S. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.79, n.1, p.51-56, 2004.

BADARÓ, R.; REED, S. G., BARRAL, A.; ORGE, G.; JONES, T. C. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n.1, p.72-78, 1986.

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

BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. **Veterinary Record**, v.139, n.18, p.439-443, 1996.

BARBER, J.S.; PAYNE-JOHNSON, C.E.; TREES, A.J. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.12, p.568-574, 1996.

BARR, S.C. Trypanosomiasis. In: Greene, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.676-685.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARÓ, R.; REED, S. G.; SHEIKY, Y. A. W. Cloning characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.102, n.2, p.249-261, 1999.

BERGER, S.L.; PALMER, R.H.; HODGES, C.C.; HALL, D.G. Neurologic manifestations of trypanosomiasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.198, n.1, p.132-134, 1988.

BERN, C.; JHA, S.N.; JOSHI, A.B.; THAKUR, G.D.; BISTA, M.B. Use of the recombinant k39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.63, n.3-4, p.153-157, 2000.

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

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

BRANDÃO, L.P.; HAGIWARA, M.K. Babesiose canina: revisão. **Revista Clínica Veterinária**, v.7, n.41, p.50-59, 2002.

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

BRENIERE, S.F.; CARRASCO, R.; MIGUEZ, H.; LEMESRE, J.L.; CARLIER, Y. Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. **Tropical and Geographical Medicine**, v.37, n.3, p.231-238, 1985.

BRITO, A. F.; SOUZA, L. C.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.31-35, 2002.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; TRINCA, L.A.; LOPES, R.S.; WIEDMEYER, C.E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v.35, n.1, p.141-146, 2004.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, n.4, p.143-171, 1974.

CAÑÓN-FRANCO, E. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; SOUZA, S. L. P.; SILVA, J. C. R.; PINTER, A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.115, n.1, p.71-74, 2003.

CARVALHO, S.F.G.; LEMOS, E.M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant k39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.3, p.321-324, 2003.

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

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

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

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

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological surveys of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.4, p.307-313, 2002.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. **Journal Eukaryot Microbiology**, v.47, n.1, p.37-39, 2000.

DOMINGUES, L. M.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; CARVALHO, C. S.; COSTA, A. J.; MALHEIROS, E. B. Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IIF). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.79-85, 1998.

DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.754-774.

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J., UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.9, p. 1269-1285, 1988.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detectind infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v.110, n.3, p.647-656, 1993.

EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.B.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; MACAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine visceral leishmaniasis in northeast brazil: assessment of serodiagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, n.2, p.118-123, 1990.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. 1º Fórum sobre leishmaniose visceral canina, anais, Jaboticabal, 10 – 11 de março de 2006.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, anoV, n.28, p.36-44, 2000.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; BONELLO, F.L.; CIARLINI, P.C.; GONÇALVES, M.E.; LIMA, V.M.F.; PERRI, S.H.V. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Veterinárias Notícias**, Uberlândia, v.11, n.2, p.61-69, 2005.

FERRER, L. Canine Leishmaniosis: Evaluation of the Immunocompromised Patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8, 2002, GRANADA. Proceedings.... Disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653>  
Acesso em: 13 agosto de 2006. a

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

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

FURTANELLO, T.; FIORIO, F.; CALDIN, M; LUBAS, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. **Veterinary Parasitology**, v.1-2, n.134, p.77-85, 2005.

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

GENNARI, S.M.; YAI, L.E. O.; D´AURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.2, p.177-179, 2002.

GOULD, D.J.; MURPHY, K.; RUDORF, H.; CRISPIN, S.M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. **Journal small animal practice**, v.41, n.6, p.263-265, 2000.

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

HAGIWARA, M. K.; HOLZCHUH, M. P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis* I. Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.5, n.39, p.745-755, 1987.

HIGA, A. C.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.2, p.91-95, 2000.

IKEDA, F.A.; FEITOSA, M.M.; CIARLINI, P.C.; MACHADO, G.F.; LIMA, V.M.F. Criptococose e toxoplasmose associadas à leishmaniose visceral canina – relato de casos. **Revista Clínica Veterinária**, v.10, n.56, p.28-32, 2005.

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

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

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F.; Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.1, p.59-71, 1992.

LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CORBETT, C.E.P.; DIETZE, R. Evaluation of Kalazar detect rapid test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 3., 2005. Italy. **Abstract book...Italy**, 2005. p.160.

LEMESRE, J.L.; AFCHAIN, D.; OROZCO, O.; LOYENS, M.; BRENIERE, F.S.; DESJEUX, P.; CARLIER, Y.; MARTIN, U.; NOGUEIRA-QUEIROS, J.A.; LE RAY, D.; CAPRON, A. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, n.1, p.86-93, 1986.

LEONTIDES, L.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A.F.; GALATOS, A.D.; MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, p.19-27, 2002.

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

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

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.53-57, 2004.

MACHADO et al. Isolation of *Babesia bigemina* and *B. bovis* in merozoites by ammonium chloride lysis of infected eritrocites. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.27, p.2591-2598, 1994.

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

MARETZKI, C.H.; FISHER, D.J.; GREENE, C.E. Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.205, n.11, p.1554-1556, 1994.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, pt3, p.237-246, 1999.

MAYWALD, P. G.; MACHADO, M. I.; COSTA-CRUZ, J.M.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v.12. n.3, p.321-328, 1996.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: Congresso de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004.

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

MEURS, K. M.; ANTHONY, M. A.; SLATER, M.; MILLER, M. W. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.213, n.4, p.497-500, 1998.

MONTENEGRO, V. M.; JIMENEZ, M.; PINTO DIAS, J. C.; ZELEDÓN, R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.4, p. 491-494, 2002.

MORAES, H. A.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N. R. P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia spp.* **Clínica Veterinária**, n.48, p. 28-30, 2004.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytologic in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v.91, n.2-3, p.197-204, 2003.

NEER, T.M.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and *Wobachia* infection. In: Greene, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.203-216.

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

ORDEIX, L.; LLORET, A.; FONDEVILA, D.; BUBEY, J.P.; FERRER, L.; FONDATI, A. Cutaneous neosporosis during treatment of pemphigus foliaceus in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.38, n.5, p.415-419, 2002.

PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Encefalite por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães. **Clínica Veterinária**, v.9, n.48, p. 44-52, 2004.

PASSOS, V. M. A.; VOLPINI, A. C.; BRAGA, E. M.; LACERDA, P. A. F.; OUAISSI, A.; LIMA-MARTINS, M. V. C.; KRETTLI, A. U. Differential serodiagnosis of human infection caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* using ELISA with a recombinant antigen (rTc24). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.6, p.791-793, 1997.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 596p.

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



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

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

REICHMANN, M.L.A.B. Leishmaniose visceral canina – uma zoonose reemergente. In: 1º Fórum sobre leishmaniose visceral canina, Jaboticabal, SP, 2006.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2352-2356, 2002.

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

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M.; MANELLI, A.; MIGNONI, W.; BOLLO, E.; GRADONI, L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.6, p.1153-1156, 2003.

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

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p.

Disponível em: [www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish\\_visc/LVA24ago03.pdf](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visc/LVA24ago03.pdf)

Acesso em 13 de ago.de 2006.

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

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

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.49, n.1, p.55 – 60, 2003.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

SOUSA, S. L. P.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy farms in Paraná, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n.2, p.408-409, 2002.

SUNDAR, S.; PAI, K.; SAHU, M.; KUMAR, V.; MURRAY, H.W. Immunochromatographic strip-test detection of anti-k39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.96, n.1, p.19-23, 2002.

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

TABOADA, J.; LOBETTI, R. Babesiosis. In: Greene, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.722-736.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.103-123, 1991.

TARANTINO, C.; ROSSI, G.; KRAMER, L. H.; PERRUCCI, S.; CRINGOLI, G.; MACCHIONI, G. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.102, n.1-2, p.77-83, 2001.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, p.1-8, 2006. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TD7-4JVSWWV-6&\\_coverDate=05%2F02%2F2006&\\_alid=424492790&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_qd=1&\\_cdi=5191&\\_sort=d&\\_view=c&\\_acct=C000049647&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=972052&md5=72e70f860d730d511db32a6fca0cf884](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD7-4JVSWWV-6&_coverDate=05%2F02%2F2006&_alid=424492790&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=5191&_sort=d&_view=c&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=72e70f860d730d511db32a6fca0cf884)

Acesso em: 12 jul. 2006

TROY, G. C.; VULGAMOTT, J. C.; TURNWALD, G. H. Canine Ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.16, n.2, p.181-187, 1980.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; STOLF, A.M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. **Parasitology**, v.39, p.169-176, 2001.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; LERAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Veterinary Record**, v.141, n.13, p.328-330, 1997.

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

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

## ANEXOS

Quadro 1– Densidades ópticas médias (DO), por meio da técnica de

ELISA para leishmaniose visceral canina, de 50 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba- SP. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>DO</b>	<b>Animal</b>	<b>DO</b>
<b>2</b>	1,004	<b>60</b>	0,066 *
<b>5</b>	1,006	<b>62</b>	1,280
<b>11</b>	1,253	<b>63</b>	1,430
<b>12</b>	1,241	<b>64</b>	1,459
<b>13</b>	1,356	<b>73</b>	1,199
<b>21</b>	1,088	<b>74</b>	1,160
<b>22</b>	1,091	<b>75</b>	1,120
<b>25</b>	1,377	<b>76</b>	1,235
<b>26</b>	1,288	<b>77</b>	1,312
<b>29</b>	0,922	<b>80</b>	1,017
<b>30</b>	1,100	<b>82</b>	1,068
<b>34</b>	1,036	<b>83</b>	1,104
<b>37</b>	1,135	<b>85</b>	0,795
<b>39</b>	1,168	<b>86</b>	0,121*
<b>40</b>	1,140	<b>87</b>	1,219
<b>42</b>	1,191	<b>88</b>	1,115
<b>45</b>	1,108	<b>89</b>	1,173
<b>46</b>	1,330	<b>91</b>	1,200
<b>47</b>	1,296	<b>92</b>	0,156*
<b>50</b>	1,052	<b>94</b>	1,000
<b>51</b>	0,924	<b>98</b>	0,938
<b>52</b>	1,236	<b>99</b>	1,366
<b>54</b>	1,370	<b>100</b>	1,184
<b>56</b>	1,140	<b>113</b>	1,189
<b>59</b>	1,059	<b>117</b>	1,270

\* animais soronegativos

Quadro 2- Títulos de anticorpos anti-*Leishmania sp.* obtidos por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral, do soro de 49 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba- SP. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>Título</b>	<b>Animal</b>	<b>Título</b>
<b>2</b>	1 :1280	<b>60</b>	< 1:40 *
<b>5</b>	1:640	<b>62</b>	-----
<b>11</b>	1:1280	<b>63</b>	1:1280
<b>12</b>	1:1280	<b>64</b>	1:1280
<b>13</b>	1:1280	<b>73</b>	1:1280
<b>21</b>	1:1280	<b>74</b>	1:1280
<b>22</b>	1:320	<b>75</b>	1:1280
<b>25</b>	1:1280	<b>76</b>	1:1280
<b>26</b>	1:320	<b>77</b>	1:1280
<b>29</b>	1:160	<b>80</b>	1:1280
<b>30</b>	1:1280	<b>82</b>	1:1280
<b>34</b>	1:1280	<b>83</b>	1:1280
<b>37</b>	1:320	<b>85</b>	1:640
<b>39</b>	1:1280	<b>86</b>	1:1280
<b>40</b>	1:1280	<b>87</b>	1:1280
<b>42</b>	1:1280	<b>88</b>	1:640
<b>45</b>	1:640	<b>89</b>	1:640
<b>46</b>	1:1280	<b>91</b>	1:1280
<b>47</b>	1:1280	<b>92</b>	1:40
<b>50</b>	1:1280	<b>94</b>	1:640
<b>51</b>	1:1280	<b>98</b>	1:1280
<b>52</b>	1:1280	<b>99</b>	1:1280
<b>54</b>	1:1280	<b>100</b>	1:1280
<b>56</b>	1:1280	<b>113</b>	1:1280
<b>59</b>	1:1280	<b>117</b>	1:1280

\* animal soronegativo

Quadro 3- Resultados da técnica de imunocromatografia para leishmaniose visceral, classificadas em escores, variando de fraco positivo (1/2+) à forte positivo (3+), do soro de 50 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do município de Araçatuba. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>Resultado</b>	<b>Animal</b>	<b>Resultado</b>
<b>2</b>	3+	<b>60</b>	Negativo
<b>5</b>	2+	<b>62</b>	2+
<b>11</b>	negativo	<b>63</b>	3+
<b>12</b>	negativo	<b>64</b>	3+
<b>13</b>	2+	<b>73</b>	2+
<b>21</b>	3+	<b>74</b>	3+
<b>22</b>	2+	<b>75</b>	2+
<b>25</b>	1+	<b>76</b>	3+
<b>26</b>	1+	<b>77</b>	3+
<b>29</b>	1+	<b>80</b>	2+
<b>30</b>	1+	<b>82</b>	1/2 +
<b>34</b>	2+	<b>83</b>	1+
<b>37</b>	2+	<b>85</b>	negativo
<b>39</b>	3+	<b>86</b>	negativo
<b>40</b>	1+	<b>87</b>	2+
<b>42</b>	2+	<b>88</b>	1+
<b>45</b>	1/2 +	<b>89</b>	1/2 +
<b>46</b>	1+	<b>91</b>	3+
<b>47</b>	2+	<b>92</b>	negativo
<b>50</b>	2+	<b>94</b>	2+
<b>51</b>	2+	<b>98</b>	negativo
<b>52</b>	2+	<b>99</b>	2+
<b>54</b>	1/2 +	<b>100</b>	3+
<b>56</b>	1+	<b>113</b>	1+
<b>59</b>	3+	<b>117</b>	2+

Quadro 4- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA para leishmaniose visceral canina, do soro de 45 cães provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>DO</b>	<b>Animal</b>	<b>DO</b>
<b>184</b>	0,234	<b>207</b>	0,068
<b>185</b>	0,144	<b>208</b>	0,111
<b>186</b>	0,153	<b>209</b>	0,111
<b>187</b>	0,224	<b>210</b>	0,060
<b>188</b>	0,344 *	<b>211</b>	0,159
<b>189</b>	0,327 *	<b>212</b>	0,048
<b>190</b>	0,226	<b>213</b>	0,037
<b>191</b>	0,437 *	<b>214</b>	0,160
<b>192</b>	0,285 *	<b>215</b>	0,071
<b>193</b>	0,247	<b>216</b>	0,067
<b>194</b>	0,150	<b>217</b>	0,090
<b>195</b>	0,339 *	<b>218</b>	0,065
<b>196</b>	0,299 *	<b>219</b>	0,069
<b>197</b>	0,253	<b>220</b>	0,061
<b>198</b>	0,210	<b>221</b>	0,160
<b>199</b>	0,277 *	<b>222</b>	0,080
<b>200</b>	0,081	<b>223</b>	0,152
<b>201</b>	0,078	<b>224</b>	0,065
<b>202</b>	0,057	<b>225</b>	0,072
<b>203</b>	0,144	<b>226</b>	0,064
<b>204</b>	0,104	<b>227</b>	0,049
<b>205</b>	0,065	<b>228</b>	0,117
<b>206</b>	0,079		

\*animais soropositivos

Quadro 5- Títulos de anticorpos anti-*Leishmania sp.* obtidos por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose visceral, do soro de 45 cães provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>Título</b>	<b>Animal</b>	<b>Título</b>
<b>184</b>	< 1:40	<b>207</b>	< 1:40
<b>185</b>	< 1:40	<b>208</b>	< 1:40
<b>186</b>	< 1:40	<b>209</b>	< 1:40
<b>187</b>	< 1:40	<b>210</b>	< 1:40
<b>188</b>	1:160 *	<b>211</b>	< 1:40
<b>189</b>	< 1:40	<b>212</b>	< 1:40
<b>190</b>	< 1:40	<b>213</b>	< 1:40
<b>191</b>	1:160 *	<b>214</b>	< 1:40
<b>192</b>	1:40 *	<b>215</b>	< 1:40
<b>193</b>	< 1:40	<b>216</b>	< 1:40
<b>194</b>	< 1:40	<b>217</b>	< 1:40
<b>195</b>	< 1:40	<b>218</b>	< 1:40
<b>196</b>	1:40 *	<b>219</b>	< 1:40
<b>197</b>	< 1:40	<b>220</b>	< 1:40
<b>198</b>	< 1:40	<b>221</b>	< 1:40
<b>199</b>	< 1:40	<b>222</b>	< 1:40
<b>200</b>	< 1:40	<b>223</b>	< 1:40
<b>201</b>	< 1:40	<b>224</b>	< 1:40
<b>202</b>	< 1:40	<b>225</b>	< 1:40
<b>203</b>	< 1:40	<b>226</b>	< 1:40
<b>204</b>	< 1:40	<b>227</b>	< 1:40
<b>205</b>	< 1:40	<b>228</b>	< 1:40
<b>206</b>	< 1:40		

\* animais soropositivos



Quadro 6- Resultados da técnica de imunocromatografia para leishmaniose visceral, classificadas em escores, variando de fraco positivo (1/2+) à forte positivo (3+), do soro de 45 cães provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>Resultado</b>	<b>Animal</b>	<b>Resultado</b>
184	negativo	207	negativo
185	negativo	208	negativo
186	negativo	209	negativo
187	½ +	210	negativo
188	½ +	211	negativo
189	negativo	212	negativo
190	negativo	213	negativo
191	negativo	214	negativo
192	negativo	215	negativo
193	½ +	216	negativo
194	negativo	217	negativo
195	negativo	218	negativo
196	negativo	219	negativo
197	negativo	220	negativo
198	negativo	221	negativo
199	½ +	222	negativo
200	negativo	223	negativo
201	negativo	224	negativo
202	negativo	225	negativo
203	negativo	226	negativo
204	negativo	227	negativo
205	negativo	228	negativo
206	negativo		

Quadro 7- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 14 cães portadores de doença de Chagas. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animais</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>C1</b>	0,336*	< 1:40	Negativo
<b>C2</b>	0,357*	1:40 *	Negativo
<b>C3</b>	0,248	< 1:40	Negativo
<b>C4</b>	0,402*	1:40 *	Negativo
<b>C5</b>	0,436*	< 1:40	Negativo
<b>C6</b>	0,660*	1:160 *	Negativo
<b>C7</b>	0,299*	< 1:40	Negativo
<b>C8</b>	0,244	< 1:40	Negativo
<b>C9</b>	0,941 *	1:80 *	Negativo
<b>C10</b>	0,406*	< 1:40	Negativo
<b>C11</b>	0,784*	1:160 *	Negativo
<b>C12</b>	0,221	< 1:40	Negativo
<b>C13</b>	0,119	1:40 *	Negativo
<b>C14</b>	0,105	< 1:40	Negativo

\* animais soropositivos

Quadro 8- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 13 cães portadores de erliquiose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>168</b>	0,085	< 1:40	Negativo
<b>169</b>	0,051	< 1:40	Negativo
<b>171</b>	0,203	< 1:40	Negativo
<b>172</b>	0,151	< 1:40	Negativo
<b>174</b>	0,385*	< 1:40	Negativo
<b>175</b>	0,128	< 1:40	Negativo
<b>177</b>	0,077	< 1:40	Negativo
<b>178</b>	0,156	< 1:40	Negativo
<b>179</b>	0,095	< 1:40	Negativo
<b>180</b>	0,098	< 1:40	Negativo
<b>181</b>	0,037	< 1:40	1/2+
<b>182</b>	0,100	< 1:40	Negativo
<b>183</b>	0,112	< 1:40	Negativo

\* animal soropositivo

Quadro 9- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 12 cães portadores de babesiose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>149</b>	0,028	< 1:40	Negativo
<b>150</b>	0,031	< 1:40	Negativo
<b>151</b>	0,073	< 1:40	Negativo
<b>152</b>	0,081	< 1:40	Negativo
<b>153</b>	0,141	< 1:40	Negativo
<b>154</b>	0,069	< 1:40	Negativo
<b>155</b>	0,132	< 1:40	Negativo
<b>156</b>	0,080	< 1:40	Negativo
<b>157</b>	0,087	< 1:40	Negativo
<b>158</b>	0,046	< 1:40	Negativo
<b>159</b>	0,045	< 1:40	Negativo
<b>160</b>	0,054	< 1:40	Negativo

Quadro 10- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de seis cães com co-infecção por erliquiose e babesiose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>161</b>	0,313*	< 1:40	1 +
<b>162</b>	0,310*	< 1:40	Negativo
<b>163</b>	0,299*	< 1:40	1/2 +
<b>164</b>	0,450*	< 1:40	Negativo
<b>165</b>	0,397*	< 1:40	1/2 +
<b>166</b>	0,140	< 1:40	Negativo

\* animais soropositivos

Quadro 11- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 10 cães portadores de toxoplasmose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>118</b>	0,039	1:80*	Negativo
<b>119</b>	0,023	< 1:40	Negativo
<b>122</b>	0,103	1:40*	Negativo
<b>123</b>	0,033	< 1:40	Negativo
<b>124</b>	0,079	1:40*	Negativo
<b>128</b>	0,015	< 1:40	Negativo
<b>131</b>	0,009	1:40*	Negativo
<b>133</b>	0,081	< 1:40	Negativo
<b>138</b>	0,071	1:80*	Negativo
<b>148</b>	0,054	< 1:40	1 +

\*animais soropositivos

Quadro 12- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de oito cães portadores de neosporose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>121</b>	0,088	< 1:40	Negativo
<b>126</b>	0,025	< 1:40	Negativo
<b>129</b>	0,056	< 1:40	Negativo
<b>134</b>	0,018	< 1:40	Negativo
<b>137</b>	0,056	< 1:40	Negativo
<b>140</b>	0,122	< 1:40	1 +
<b>144</b>	0,018	< 1:40	Negativo
<b>147</b>	0,130	< 1:40	Negativo

Quadro 13- Densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA, títulos de anticorpos por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e leitura das fitas de imunocromatografia para leishmaniose visceral canina, do soro de 13 cães com co-infecção por toxoplasmose e neosporose. (Araçatuba-SP, 2006)

<b>Animal</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIFI</b>	<b>Imunocromatografia</b>
<b>120</b>	0,028	< 1:40	Negativo
<b>125</b>	0,026	< 1:40	Negativo
<b>127</b>	0,026	< 1:40	1/2 +
<b>130</b>	0,027	< 1:40	Negativo
<b>132</b>	0,021	< 1:40	Negativo
<b>135</b>	0,002	< 1:40	Negativo
<b>136</b>	0,134	< 1:40	Negativo
<b>139</b>	0,065	< 1:40	1+
<b>141</b>	0,147	< 1:40	1/2 +
<b>142</b>	0,044	< 1:40	Negativo
<b>143</b>	0,066	< 1:40	Negativo
<b>145</b>	0,046	< 1:40	Negativo
<b>146</b>	0,034	< 1:40	Negativo