

THIAGO ANDRÉ CARREO COSTA

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA COM PROTEÍNA A
E ANTI-IgG PARA O DIAGNOSTICO SOROLÓGICO
DA LEISHMANIOSE VISCERAL FELINA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, *Campus* de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

Orientadora: Profa. Adjunto Mary Marcondes

ARAÇATUBA - 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*"A luta contra o erro tipográfico tem algo de homérico.
Durante a revisão os erros se escondem, fazem-se positivamente invisíveis.
Mas assim que o livro sai, tornam-se visibilíssimos,
verdadeiros sacis a nos botar a língua em todas as páginas.
Trata-se de um mistério que a ciência ainda não conseguiu decifrar..."*

Monteiro Lobato

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Carlos e Zilda,

por sempre terem sido exemplos de força, garra e determinação, pelas orações, por terem sempre confiado em mim e por terem sempre me ajudado nas horas de dificuldades.

Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora,

Professora Adjunto Mary Marcondes que, mesmo receosa em ter-me como um orientado que se propôs a “trilhar os caminhos” da clínica médica, aceitou-me para a orientação deste projeto de dissertação. Pela paciência e compreensão quando precisei conciliar o mestrado com a atividade profissional, apesar da distância. Muito obrigado pelo legado transmitido e pelo exemplo que sempre foi. Espero um dia poder dar-lhe o prazer de poder dizer: “Está vendo o professor Thiago, foi meu orientado!”. Espero ter correspondido suas expectativas.

Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por dar ao homem o direito do livre arbítrio, permitindo-o trilhar seu caminho da forma que melhor lhe convier. Por permitir que eu conviva nesta vida, com pessoas tão maravilhosas. Graças a Deus.

À minha esposa Kamila Carreo pela cumplicidade, amor, carinho e compreensão nos momentos em que me dediquei com afinco na elaboração desta dissertação.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araçatuba onde me graduei, fiz residência e agora concluo meu mestrado.

À Faculdade Pio Décimo pelo apoio e estímulo para a conclusão deste mestrado.

À Universidade Federal de Sergipe pelo apoio e estímulo para a conclusão de mais esta etapa.

À Profa. Ass. Dra. Gisele Fabrino Machado, pelos ensinamentos de como obter cortes do sistema nervoso central quando da elaboração do projeto original.

Ao M.V. MSc. Cláudio Nazaretian Rossi, por ter cedido amostras de soro de felinos do seu projeto de mestrado, pelo apoio e idéias iluminadas.

À Profa. Adjunto Caris Maroni Nunes e Profa. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima pelas valiosas considerações durante o exame de qualificação.

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, pela orientação na realização do teste de ELISA-IgG para o diagnóstico da leishmaniose visceral em gatos e por ter cedido o Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) para a realização deste método.

À M.V. MSc. Fabiana Augusta Ikeda-Garcia pelo auxílio na confecção de algumas sorologias.

À M.V. Ana Amélia Domingues Gomes pela ajuda fundamental na fase final da confecção desta dissertação.

Ao M.V. MSc. Mauricio Franco Zanette pelas conversas e dicas no transcorrer de minhas atividades.

À M.V. Gisela Cristiane Ferraro, pela dedicação na realização da análise estatística.

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

À funcionária Thaíse Yumie Tomokane, do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50), pelo auxílio técnico na realização da técnica de ELISA para o diagnóstico de leishmaniose visceral em gatos.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba-SP.

Aos meus colegas de Pós-Graduação Nandressa, Verônica, Caio, Rodrigo, Alexandre, Rodriguinho, entre outros que tanto me ajudaram e acolheram. Estarei sempre pronto quando precisarem.

Aos meus amigos Alexandre Redson, Guillermo Veiga, Cláudio Rossi e Rômulo, companheiros de república, pela convivência harmoniosa e pela amizade incondicional. Aprendi muito com vocês!

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

A todos vocês o meu MUITO OBRIGADO e parabéns. Esta vitória é nossa!

COSTA, T.A.C. **Utilização da técnica de ELISA com proteína A e anti-IgG para ao diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral felina.** 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos estudar, em uma área endêmica para leishmaniose visceral, a soroprevalência anticorpos anti-*Leishmania spp.* em felinos, por meio duas técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA), ELISA-prot.A e ELISA-IgG, utilizando-se 200 gatos. Para avaliar a performance dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico da leishmaniose felina, foram calculadas as especificidades e sensibilidades de cada teste, bem como o índice kappa (k) para cada um deles, com o intuito de avaliar a concordância dos métodos com o teste parasitológico direto (padrão ouro). Foram observadas formas amastigotas do patasito em 4% (8/200) gatos. Pelo ELISA-Prot.A, 4,5% (9/200) dos gatos apresentaram títulos acima do ponto de corte para a espécie e, pelo ELISA-IgG, 11,5% (23/200) dos animais foram considerados soropositivos. O ELISA-Prot.A apresentou sensibilidade de 12,5%, especificidade de 64,5% e concordância fraca com o teste parasitológico direto. O ELISA-IgG apresentou sensibilidade de 25% e especificidade de 19,2%, com índice kappa também indicando fraca concordância.

Palavras-chave: Técnicas imunoenzimáticas, testes sorológicos, gato, *Leishmania*

COSTA, T.A.C. **Use of ELISA-protein A and ELISA-Immunoglobulin G for serological diagnosis of visceral leishmaniasis in cats.** 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

ABSTRACT

The present work aimed to study, in an endemic area for visceral leishmaniasis, the seroprevalence of *Leishmania* sp. infection in cats using two enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques, ELISA-protein A and ELISA-immunoglobulin G. For this purpose, a total of 200 cats were employed. To evaluate the performance of the available serological tests for the diagnosis of feline leishmaniasis it was determined and compared the sensitivity and specificity of ELISA-prot. A and ELISA-IgG, as well as the kappa index (k) for each one, to measure its concordance with the parasitological test (gold standard). Amastigote forms of the parasite were observed in eight (4.0%) cats. By ELISA-protein A nine (4,5%) cats presented titer above the specie's cut off point and by ELISA-IgG 23 (11,5%) were considered seropositive. The ELISA-protein A was 12,5% sensitive and 65,4% specific, and showed a weak concordance with the parasitological test. The ELISA-IgG showed a sensitivity of 25% and specificity of 19,2% and when kappa index was analysed, a weak concordance was observed too.

Keywords: Immunoenzyme techniques, serologic tests, cat, *Leishmania*

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Valores do coeficiente Kappa e sua respectiva concordância, de acordo com Pereira (2001)..... 15

Tabela 2. Valores absolutos e percentuais encontrados para a presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.* por meio de punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, baço, fígado e medula óssea de 200 gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2008)..... 16

Tabela 3. Resultados da pesquisa de *Leishmania sp* por meio de exame parasitológico direto e de sorologia para leishmaniose visceral pela técnica de ELISA utilizando proteína A e anti-IgG, em 200 gatos de área endêmica para a doença. Número absoluto de animais, coeficiente Kappa e concordância com o exame parasitológico. (Araçatuba-SP, 2008)..... 17

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	01
2. OBJETIVOS	09
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Animais.....	10
3.2. Colheita de Sangue Total.....	10
3.3. Citologia de linfonodo, medula óssea, baço e fígado.....	11
3.4. Método de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> SP.....	11
3.4.1. ELISA com proteína A (ELISA-prot A).....	11
3.4.2. ELISA com anti-IgG (ELISA-IgG).....	13
3.4.3. Determinação dos pontos de corte.....	14
3.5. Análise Estatística.....	14
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS	23
APÊNDICES.....	31

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A. Densidades ópticas médias (DO) da padronização das diluições de soro e Proteína A pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina, realizada com amostras positiva e negativa. (Araçatuba-SP, 2008)..... 31
- Apêndice B. Valores das diferenças das médias dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e proteína A, pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina. (Araçatuba-SP, 2008)..... 31
- Apêndice C. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com proteína A para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 51 gatos provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)..... 32
- Apêndice D. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com proteína A para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)..... 33
- Apêndice E. Densidades ópticas médias (DO) da padronização das diluições de soro e anti-IgG pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina, realizada com amostras positiva e negativa. (Araçatuba-SP, 2008)..... 36
- Apêndice F. Valores das diferenças das médias dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e anti-IgG, pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina. (Araçatuba-SP, 2008)..... 36

Apêndice G. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com anti-IgG para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 53 gatos provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)..... 37

Apêndice H. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com anti-IgG para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)..... 38

Apêndice I. Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos esfregaços de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2008)..... 41

1. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica em 62 países dos quatro continentes, causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani*. Na Índia é conhecida como Kala-Azar, palavra de origem indiana que significa “doença negra”. A primeira observação dos parasitos que causavam o Calazar ocorreu na Índia por Cunningham (1885), em indivíduos acometidos pela doença (MICHALICK; GENARO, 2005).

Posteriormente, em 1903, o agente etiológico foi descrito quase simultaneamente por William Leishman e Charles Donovan. No mesmo ano, Laveran e Mesnil, considerando que o parasito associado ao calazar indiano fosse um piroplasma, denominaram-no de *Piroplasma donovani*. Ainda em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania*, denominando *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar (MICHALICK; GENARO, 2005).

O parasito foi encontrado em cães pela primeira vez na Tunísia em 1908, por Nicole e Comte. Já nessa época, os autores sugeriram o possível papel desses animais como reservatório da doença (MICHALICK; GENARO, 2005). Atualmente o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico da leishmaniose visceral no ambiente doméstico, o que gera dificuldades no controle da doença (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000; BANETH, 2006). A enzootia canina geralmente precede a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães é mais prevalente que no homem (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000; BRASIL, 2003). Enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a mais de 50%, a prevalência da doença varia entre três e 10% (FERRER, 2002).

A primeira referência à leishmaniose felina data de 1756 quando Russel, no relatório de sua viagem à cidade de Aleppo, na Índia, descreveu que, além do homem e dos cães, os gatos eram acometidos pela doença (NAUCKE, 2000). Casos esporádicos da enfermidade foram descritos a partir do século XX, notadamente nos países onde a infecção por *Leishmania* sp. é endêmica (PENNISI, 2002).

A infecção natural de um gato doméstico teve sua primeira descrição em 1912, na Argélia, em um animal de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de leishmaniose visceral. O diagnóstico baseou-se no achado de formas amastigotas do parasito na medula óssea, sem a identificação da espécie causadora de enfermidade (SERGENT et al., 1912).

Da descrição do primeiro caso clínico até os dias de hoje, a literatura mundial tem registros de cerca de 45 casos positivos pelo exame parasitológico para *Leishmania* sp.. Destes, 24 (53,33%) ocorreram no Novo Mundo e 21 (46,67%) no Velho Mundo. Os dados compilados da literatura relatam casos de leishmaniose felina em diversos países como nos Estados Unidos (BARNES et al., 1993), França (OZON et al., 1998; GREVOT et al., 2005), Espanha (HERVAS et al., 1999; LEIVA et al., 2005; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007), Itália (POLI et al., 2002; PENISSI et al., 2004; VITA et al., 2005), Portugal (COSTA-DURÃO et al., 1994; MAIA et al., 2008), Suíça (RUFENACH et al., 2005) e Brasil (MELLO, 1940; SAVANI et al., 2004; SILVA et al., 2008). Entre os casos descritos no Novo Mundo, um foi na América do Norte e 23 na América do Sul.

No Brasil o primeiro caso de leishmaniose felina foi identificado pela equipe de Evandro Chagas no Estado do Pará (MELLO, 1940) quando pesquisavam, na região, os possíveis reservatórios de leishmaniose visceral. No entanto, a espécie envolvida não foi identificada. A partir desta época, somente em 1996 houve a descrição de mais um novo caso, em Minas Gerais (PASSOS et al., 1996). Posteriormente, dois casos no Rio de Janeiro (SCHUBACH et al., 2004), um em Cotia - SP (SAVANI et al., 2004), um no Mato Grosso do Sul (SOUZA et al., 2005) e 11 no município de Araçatuba, Estado de São Paulo (ROSSI, 2007). Destes, os casos descritos em Minas Gerais, no Rio de Janeiro e no Mato Grosso do Sul foram causados por cepas dermatrópicas (leishmaniose tegumentar).

Data do ano de 2001 o primeiro diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral em um felino no Brasil, no Estado de São Paulo. Tratava-se de um gato de dois anos de idade que nasceu e foi criado no município de Cotia, e que apresentava emagrecimento progressivo, linfadenomegalia e uma lesão nodular no plano nasal (SAVANI et al., 2004). O animal possuía sorologia positiva pela

reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com título de 1:80, e presença de grande quantidade de formas amastigotas do parasito em esfregaços obtidos por punção aspirativa do nódulo cutâneo. Por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), realizada em um fragmento de baço, o parasito foi identificado como *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

No município de Araçatuba foram identificados alguns gatos parasitologicamente positivos, encaminhados pelo Centro de Controle de Zoonoses da cidade ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sendo um no ano de 2003 (MIRACELLY, 2004), e outros dois no ano de 2004¹. Na mesma cidade, Rossi (2007), pesquisando a presença de *Leishmania* sp. em exames citológicos de punções biopsias aspirativas de linfonodos, medula óssea, fígado e baço de 200 gatos encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses do município, encontrou formas amastigotas do parasitos em oito (4%) dos animais. Apesar do diagnóstico da enfermidade ter sido exclusivamente parasitológico sem definição da espécie, o autor acreditava tratar-se de *Leishmania chagasi*, uma vez que os animais eram provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.

Relatos pretéritos permitiram identificar aspectos importantes com relação à manifestação clínica da leishmaniose felina. Os sintomas em gatos são inespecíficos e assemelham-se ao quadro clínico observado em cães (OZON et al., 1998; POLI et al., 2002; SAVANI et al., 2004; LEIVA et al., 2005). Alguns animais podem apresentar-se com perda de peso e massa muscular, desidratação, linfadenomegalia local ou generalizada (PENNISI et al., 1998; POLI et al., 2002; SAVANI et al., 2004). No entanto não são raras as descrições de gatos parasitologicamente positivos e assintomáticos (VITA et al., 2005; ROSSI, 2007; SILVA et al., 2008).

Simões-Mattos (2005), avaliando felinos infectados experimentalmente com *L. braziliensis* identificaram como alterações clínicas a ocorrência de letargia e disorexia, além da presença de linfonodos hipertrofiados, esplenomegalia, estomatite, uveíte e ulceração em terceira pálpebra.

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

Lesões tegumentares são comuns em gatos com leishmaniose e incluem formações nodulares (CRAIG et al.,1986; COSTA-DURÃO et al.,1994; SAVANI et al., 2004; GREVOT et al.,2005; SIMÕES-MATTOS, 2005), úlceras, crostas (OZON et al.,1998; PENNISI et al.,2004; SIMÕES-MATTOS, 2005), pápulas, alopecia difusa (HERVAS et al.,1999; PENNISI et al., 2004; SIMÕES-MATTOS, 2005) e descamação cutânea (HERVAS et al.,1999).

Em relação à topografia, Craig et al. (1986) referiram que o pavilhão auricular é a área mais predisposta ao surgimento de lesões, pois é a região mais exposta ao vetor, uma vez que os felinos possuem uma pelagem mais rarefeita neste local. Também são descritas lesões no plano nasal (PENNISI et al., 2004) e região periocular (BONFANTE-GARRIDO et al.,1996).

No atinente aos sintomas, um fator importante a ser considerado é o diagnóstico diferencial das lesões com neoplasias (especialmente carcinoma espinocelular) e infecções bacterianas e fúngicas tais como micobacteriose, esporotricose e criptococose (SIMÕES-MATTOS et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2006). A confusão com infecção por fungos é considerada a mais problemática, uma vez que a prescrição de antimicóticos pode levar a uma melhora clínica das lesões pelo fato de alguns destes medicamentos possuírem ação leishmaniostática (SIMÕES-MATTOS, 2005).

Existem discordâncias na literatura com relação à susceptibilidade dos felídeos domésticos à infecção por *Leishmania* sp. Enquanto Vita et al. (2005) relatam haver uma baixa susceptibilidade do gato à enfermidade, estudos experimentais realizados por Kirkpatrick et al. (1984) e Simões-Mattos (2005) ratificam a susceptibilidade da espécie em desenvolver a doença.

Acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à enfermidade (PENNISI, 2002; VITA et al., 2005) provavelmente relacionada a fatores genéticos (MANCIANTI, 2004). Apesar da ocorrência de infecções esporádicas, os felinos não são considerados, até o momento, um reservatório importante da doença (SIMÕES-MATTOS, 2005), havendo poucas informações quanto ao potencial desses animais servirem como reservatórios.

No entanto, cabe ressaltar que Maroli et al. (2007) comprovaram a transmissibilidade de parasitos de felinos para um vetor realizando xenodiagnóstico com *Phlebotomus perniciosus*, o principal vetor responsável pela transmissão da *Leishmania infantum* na Itália. Para tanto utilizaram um gato de 13 anos de idade naturalmente infectado há seis anos. O animal apresentava periodontite e aumento de linfonodos submandibulares, com títulos de anticorpos que variaram de 1:40 a 1:160 pela reação de imunofluorescência indireta.

De acordo com Simões-Mattos (2005), a alta densidade populacional de felinos, de hábitos crepusculares e noturnos, similares aos vetores, associado ao maior controle da leishmaniose visceral canina, podem ser fatores predisponentes à infecção de gatos por *Leishmania* sp. em áreas endêmicas. Ainda, segundo a autora, a preferência alimentar dos flebotomíneos está mais relacionada com a disponibilidade de hospedeiros do que com a atratividade particular de cada um deles.

Existem basicamente três categorias de provas para o diagnóstico da leishmaniose visceral: os métodos parasitológicos, os sorológicos e os moleculares. Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o teste ouro para o diagnóstico da doença (LEONTIDES et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Podem ser observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. em esfregaços realizados por punções biópsias aspirativas de medula óssea, linfonodos, baço, fígado, nódulos cutâneos e esfregaços sangüíneos corados com corantes de rotina (IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006).

Os parasitos têm forma esférica a ovóide, medindo 2-5 μm e contém um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996). A especificidade deste método é próxima a 100%; já a sensibilidade da técnica depende do grau de parasitemia e do tipo de material biológico coletado (WOLSCHRIJN et al., 1996).

As provas sorológicas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. circulantes, que se constitui no instrumento mais utilizado para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, devem ser interpretadas com cautela, uma vez que

não são 100% sensíveis e específicas, podendo gerar resultados falso-positivos e falso-negativos (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Tais testes podem falhar em detectar animais que não fizeram soroconversão e soropositivos que se convertem em soronegativos, mas que ainda permanecem infectados (FERRER, 2002; LEONTIDES et al., 2002; IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

No Brasil, as técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI – IFI Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos) e o ensaio imunoenzimático (ELISA – EIE – Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos) (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; BRASIL, 2003). O teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. apresenta, de acordo com a literatura, especificidade entre 84,4% e 100% e sensibilidade que varia de 94% a 99,5% (MANCIANTI et al., 1995; LAURENTI et al., 2005; ZANETTE, 2006). A determinação do ponto de corte da reação ocorre por meio da média das densidades ópticas de animais sadios de área não endêmica para a doença, acrescida do desvio padrão da média, o qual pode variar entre dois e cinco desvios (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 et al., 1995; ZANETTE, 2006).

Outro fator que pode interferir nos resultados do teste de ELISA é o cromógeno utilizado na reação. Comparando-se a sensibilidade da ortofenilenediamina (OPD) e da tetrametilbenzidina (TMB) é possível verificar que o cromógeno TMB é mais sensível e determina as mais altas densidades ópticas (KPL, 2008).

Existem discrepâncias na literatura quanto à soroprevalência de leishmaniose felina na Itália. Enquanto na Sicília a soroprevalência foi de 62% (PENNISI et al., 1998), na Toscana foi de 0,9% (POLI et al., 2002). Cabe ressaltar que o segundo estudo foi realizado em gatos clinicamente sadios, enquanto o primeiro foi realizado em animais sorologicamente positivos para a

imunodeficiência viral felina (FIV). Ainda, Poli et al (2002) usaram amostras de soro e do conjugado nas mesmas diluições utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

Martín-Sánchez et al. (2007) realizaram sorologia *anti L. infantum* por reação de imunofluorescência indireta em 183 gatos encaminhados a várias clínicas veterinárias no sudeste da Espanha. Sessenta por cento dos felinos apresentaram títulos maiores ou iguais a 1:10. Destes, apenas 11 apresentavam títulos iguais ou superiores a 1:160. Em 47 das 183 amostras séricas (25,7%) detectou-se DNA de *Leishmania infantum*. De forma discrepante, as maiores proporções de PCR positivos (31,6%) foram observadas em gatos com títulos de anticorpos iguais a 1:20. Em contraste, a população com altos títulos de anticorpos, maiores ou iguais a 1:160, foi a que apresentou a menor proporção de positividade à PCR (18,2%). Neste estudo, apenas 11 gatos atingiram valores acima do ponto de corte utilizado pelos mesmos pesquisadores em ensaios de leishmaniose canina (ponto de corte de 1:160).

Rossi (2007), realizando sorologia anti-*L. chagasi* em 200 gatos do município de Araçatuba por meio a técnica de ELISA com proteína A, encontrou positividade em seis (3%) animais.

Solano-Gallego et al. (2007) determinando a soroprevalência de leishmaniose visceral em 445 gatos provenientes da região noroeste da Bacia do Mediterrâneo identificaram um valor de 6,29% por meio da técnica de ELISA com proteína A, e 5,25% por meio de ELISA com anti-IgG. A técnica utilizada para a realização dos dois procedimentos foi a mesma descrita para cães, e os autores utilizaram como cromógeno a ortofenilenediamina (OPD). Para detectar anticorpos anti-*L. infantum* no soro desses gatos foi preciso aumentar em quatro vezes a concentração do soro, e em três vezes a concentração do conjugado, em comparação às concentrações utilizadas na técnica de ELISA para detectar anticorpos caninos, comprovando que as concentrações de anticorpos detectadas em gatos são inferiores às observadas em cães.

Maia et al. (2008) avaliando sorologicamente 23 gatos adultos da área urbana de Lisboa identificaram, por meio da reação de imunofluorescência

indireta sete animais (30,4%) com presença de anticorpos anti-*L. infantum*. Todos os felinos infectados eram assintomáticos, a despeito da detecção de parasitas circulantes pela técnica de PCR.

O acompanhamento clínico de 27 gatos naturalmente infectados por *L. infantum*, por Martín-Sánchez et al. (2007), demonstrou que não houve correlação entre a presença de lesões e sorologia positiva. Destes, seis desenvolveram sintomas de leishmaniose visceral, a despeito do baixo título de anticorpos observados em cinco animais, demonstrando que o aparecimento de lesões pode preceder a produção de anticorpos, fato também evidenciado por Simões-Mattos (2005).

2. OBJETIVOS

Baseando-se na hipótese de que os gatos podem ser infectados por *Leishmania chagasi*, o presente estudo teve como objetivos determinar a soroprevalência de infecção por *Leishmania* sp. em 200 gatos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral; por meio de duas técnicas de ELISA, ELISA utilizando proteína A e ELISA com anti-IgG, bom como comparar a sensibilidade e a especificidade das técnicas utilizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização do presente estudo foram colhidas, entre agosto de 2005 e dezembro de 2006, amostras de dois grupos de animais. O primeiro, constituído por 200 gatos adultos, independente de sexo ou raça, provenientes do Centro de Controle de Zoonozes (CCZ) do município de Araçatuba, São Paulo, área endêmica para leishmaniose visceral; e o segundo formado por 53 gatos residentes no município de Santos, São Paulo, área não endêmica para a doença.

Foram colhidas amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. dos gatos dos dois grupos, e realizadas punções biopsias aspirativas de linfonodo, medula óssea, baço e fígado, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp., por meio de exame parasitológico direto, dos gatos provenientes do CCZ de Araçatuba.

3.2. Colheita de Sangue Total

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular, com agulhas 25x8 mm acopladas a seringas estéreis de 10 ml, obtendo-se um volume mínimo de cinco mililitros. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até a retração visível do coágulo e, a seguir, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos para melhor separação do soro. As amostras obtidas após a centrifugação foram transferidas para ependorfes e armazenadas a -20°C até o momento de seu processamento.

3.3. Citologia de linfonodo, medula óssea, baço e fígado

Após a colheita de sangue os felinos provenientes do CCZ de Araçatuba eram anestesiados com pentobarbital sódico¹ na dose de 15 mg/Kg, por via intravenosa. Após este procedimento, com os gatos ainda em plano anestésico, aplicava-se uma ampola de cloreto de potássio a 19,1%², por via intravenosa.

O método empregado para a eutanásia seguiu as recomendações da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que trata de métodos de eutanásia aplicados a animais domésticos.

Logo após a eutanásia eram realizadas as punções biópsias aspirativas de linfonodo poplíteo, baço e fígado, com agulha 25x 7 mm acoplada a uma seringa de 10 mL. De forma semelhante, por meio de uma agulha 40x16 mm acoplada a uma seringa de 20 mL realizava-se a punção aspirativa da medula óssea. Após a confecção dos esfregaços as lâminas foram coradas com corante hematológico³ e observadas ao microscópio óptico, em objetiva de 100X (imersão), para a pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania* sp.

3.4. Método de ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

3.4.1. ELISA com proteína A (ELISA-prot A)

Para a padronização das diluições mais apropriadas do soro de gatos e para a determinação da concentração da proteína A conjugada à peroxidase, realizou-se ensaio com diluições de soro dos animais controle positivo e negativo de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, bem como do anticorpo nas concentrações 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 e 1:1200.

¹ Hypnol 3% - Fontoveter – Itapira, SP

² Cloreto de potássio a 19,1% – Darrow – Rio de Janeiro, RJ

³ Panótico Rápido - Laborclin – Curitiba, PR

A escolha das melhores diluições foi determinada pelas diferenças das densidades ópticas médias dos dois controles, em triplicata, tendo sido preconizadas as concentrações de soro de 1:50 e da proteína A de 1:100, conforme demonstrado nos apêndices A e B.

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania (L) chagasi* numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, e incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem com solução salina tamponada contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) por quatro vezes, as placas foram bloqueadas com 150 µL de solução salina tamponada acrescida de soro fetal bovino a 10% (SFB) e incubadas à temperatura ambiente durante uma hora.

Depois de nova lavagem com PBS-T por quatro vezes, adicionou-se 100 µL por poço das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo (animal saudável de área não endêmica para leishmaniose visceral) e dos gatos dos grupos experimentais, testadas em duplicata, diluídas 1:50 em PBS-T e SFB, e incubadas por três horas à temperatura ambiente.

Após quatro lavagens com PBS-T, colocou-se 100 µL por poço da proteína A marcada com peroxidase⁴, previamente titulada, diluída 1:100 em PBS-T. Depois de incubação por uma hora em temperatura ambiente a placa era novamente lavada quatro vezes com PBS-T e adicionados 100 µL de uma solução contendo o cromógeno ortofenilenediamina (OPD) (0,4 mg/mL) em diluente apropriado com peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µL de HCl 16% e a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492 nm, utilizando-se leitor de ELISA⁵. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata.

⁴ Sigma – Aldrich Brasil LTDA – São Paulo, SP

⁵ Labsystems Multiskan EX - Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, MA.

3.4.2. ELISA com anti-IgG (ELISA-IgG)

Para a padronização das diluições mais apropriadas do soro de gatos e para a determinação da concentração do anticorpo IgG total anti-gato, realizou-se ensaio com diluições de soro dos animais controle positivo e negativo de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 bem como anticorpo nas concentrações 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000 e 1:80000. A escolha das melhores diluições foi determinada pelas diferenças das densidades ópticas médias dos dois controles, em triplicata, tendo sido preconizadas as concentrações de soro de 1:400 e de IgG total anti-gato de 1:40000, conforme demonstrado nos apêndices E e F.

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania (L) chagasi*, numa concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS-T por quatro vezes, as placas foram bloqueadas com 200 µL de solução salina tamponada acrescida de leite em pó desnatado Molico⁶ a 10% e incubadas à 37°C durante duas horas em câmara úmida. Depois de nova lavagem com PBS-T por quatro vezes, adicionou-se 100 µL por poço das amostras de soros do animal controle positivo, controle negativo e dos gatos dos grupos experimentais, testadas em duplicata, diluídas 1:400 em PBS-T e SFB. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com PBS-T, colocou-se 100 µL por poço do anti-IgG total de gato ligado à peroxidase⁷, na diluição de 1:40000 em PBS-T. Após 45 minutos de incubação à 37°C a placa foi lavada quatro vezes com PBS-T, e foram adicionados 100 µL da solução de tetrametilbenzidina dihidroclorada⁸ (TMB) com posterior incubação da placa por 30 minutos, ao abrigo de luz, em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O.) foi determinada em leitor de ELISA⁹, utilizando-se filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata.

⁶ Nestlé, ⁷ A20-120P Bethyl, Montgomery, USA

⁸ Código 55214, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA

⁹ Labsystems Multiskan EX - Thermo Fisher Scientific Inc. – Waltham, MA.

3.4.3. Determinação dos pontos de corte

A determinação do ponto de corte das técnicas de ELISA foi realizada utilizando-se os soros dos gatos provenientes do município de Santos, São Paulo. Para tanto, utilizou-se a média dos animais negativos acrescida de três desvios-padrões. Desta forma, o ponto de corte utilizado na técnica de ELISA-proteína A foi 0,334 e de ELISA-IgG foi 0,365. Os valores individuais das médias das absorvâncias (densidades ópticas) dos animais do grupo controle encontram-se expressos nos Apêndices C e G.

Os valores de densidade óptica média dos grupos foram corrigidos em função das médias dos controles positivo e negativo, utilizando-se o modelo de A/P.

$$A/P = \frac{\text{DO média da amostra} - \text{DO média do controle negativo}}{\text{DO média do controle positivo} - \text{DO média do controle negativo}}$$

3.5. Análise Estatística

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

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

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

O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar a concordância dos métodos de ELISA-prot A e ELISA-IgG 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 1. As análises foram realizadas utilizando-se o programa “Statistical Analysis System” (SAS, 2005).

Tabela 1. Valores do coeficiente Kappa e sua respectiva concordância, de acordo com Pereira (2001).

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

4. RESULTADOS

De um total de 200 gatos avaliados pelo exame parasitológico direto, em oito (4%) foram evidenciadas formas amastigotas de *Leishmania* sp.. Quatro gatos apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* sp., somente em citologia de linfonodo. Em apenas um animal observou-se o parasito na punção biópsia aspirativa de fígado, sendo negativo nos demais tecidos avaliados. Já em um felino evidenciou-se *Leishmania* sp. tanto em linfonodo quanto em medula óssea, diferente de outros dois, em que foram identificados formas amastigotas em preparados citológicos por PBA de linfonodo, baço e medula óssea. O número de gatos e sua respectiva percentagem, de acordo com a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em linfonodo, baço, fígado e medula óssea, encontram-se apresentados na Tabela 2.

Dos animais positivos, apenas 25% (2/8) apresentavam alterações ao exame físico, caracterizadas por lesões dermatológicas crostosas na região cervical dorsal acompanhadas de hepato e esplenomegalia.

Os resultados obtidos por meio do exame parasitológico direto e pelas técnicas de ELISA nos animais considerados positivos em, pelo menos, um dos testes, encontram-se expressos no quadro 1.

Tabela 2. Valores absolutos e percentuais encontrados para a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. por meio de punção biópsia aspirativa (PBA) de linfonodo, baço, fígado e medula óssea de 200 gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. (Araçatuba-SP, 2008).

Tecido	PBA	
	Número de Animais	Percentagem (%)
Linfonodo	7	87,5
Medula óssea	3	37,5
Baço	2	25,0
Fígado	1	12,5
Total	8	100

Dos 200 gatos avaliados, oito (4%) apresentavam formas amastigotas de *Leishmania sp.* ao exame parasitológico direto, nove (4,5%) possuíam sorologia positiva pela técnica de ELISA-proteína A e 23 (11,5%) pela técnica de ELISA-IgG. Dos oito animais com diagnóstico positivo ao exame parasitológico direto, apenas um (12,5%) apresentou sorologia positiva pelo ELISA-proteína A e dois (25%) por ELISA-IgG, havendo positividade nos três testes simultaneamente em apenas um cão (12,5%) (quadro 1).

Os valores individuais das médias das densidades ópticas (DO) dos testes de ELISA-proteína A e ELISA-IgG encontram-se apresentados nos apêndices C, D, G e H. Os achados individuais para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em esfregaços obtidos por PBA de linfonodo, baço, fígado e medula óssea encontram-se apresentados no apêndice I.

Os valores de sensibilidade e especificidade para o método de ELISA-proteína A foram 12,5% e 65,4% e para o método de ELISA-IgG foram 25% e 19,2%, respectivamente (tabela 3).

Tabela 2. Resultados da pesquisa de *Leishmania sp* por meio de exame parasitológico direto e de sorologia para leishmaniose visceral pela técnica de ELISA utilizando proteína A e anti-IgG, em 200 gatos de área endêmica para a doença. Número absoluto de animais, coeficiente Kappa e concordância com o exame parasitológico. (Araçatuba-SP, 2008)

		Parasitológico		Kappa	Concordância
		Positivo	Negativo		
ELISA-prot A	Positivo	1	8	0,0782	Frac
	Negativo	7	184		
ELISA-IgG	Positivo	2	21	0,0894	Frac
	Negativo	6	171		

Quadro 1. Resultados do exame parasitológico e da sorologia pelas técnicas de ELISA com proteína A e ELISA com anti-IgG de animais considerados positivos em pelo menos um dos métodos de diagnóstico.(Araçatuba-SP, 2008)

ANIMAL	PARASITOLÓGICO	ELISA-proteína A	ELISA anti-IgG
11	-	-	Positivo
23	-	-	Positivo
43	-	Positivo	-
45	-	Positivo	-
55	-	-	Positivo
60	Positivo	Positivo	Positivo
71	-	-	Positivo
77	-	Positivo	Positivo
78	-	-	Positivo
82	-	-	Positivo
83	-	Positivo	Positivo
84	-	-	Positivo
85	-	-	Positivo
96	-	-	Positivo
97	Positivo	-	Positivo
98	-	-	Positivo
101	-	Positivo	Positivo
103	-	Positivo	-
105	Positivo	-	-
131	-	-	Positivo
135	-	-	Positivo
136	-	-	Positivo
141	-	Positivo	-
144	-	-	Positivo
148	Positivo	-	-
153	Positivo	-	-
161	-	Positivo	Positivo
164	Positivo	-	-
174	-	-	Positivo
175	-	Positivo	-
178	-	-	Positivo
179	-	-	Positivo
195	Positivo	-	-
199	Positivo	-	-

5. DISCUSSÃO

O crescente aumento na prevalência de leishmaniose visceral canina no Brasil, particularmente no Estado de São Paulo, área considerada indene até o relato do primeiro caso no ano de 1998, vem gerando preocupações em profissionais que atuam junto a órgãos de saúde pública, em clínicos veterinários de pequenos animais e também na população residente em áreas de risco. Nesse contexto, surge a necessidade de identificar possíveis reservatórios domésticos, entre eles os felinos, conforme salientado por Simões-Mattos (2005).

Apesar da existência de alguns estudos pesquisando a soroprevalência da infecção em populações de felinos residentes em áreas endêmicas, como as realizadas por Pennisi et al. (1998), Poli et al. (2002), Martín-Sánchez et al. (2007), Rossi (2007), Solano-Gallego et al. (2007) e Maia et al. (2008), não está claro ainda se as baixas prevalências de infecção e de doença, em gatos provenientes de áreas endêmicas, são devidas à falhas na detecção de anticorpos ou ao fato dos gatos apresentarem resistência natural à leishmaniose.

A presença de gatos infectados assintomáticos e com baixos títulos de anticorpos, encontrados no presente estudo, confirmam os achados de Maia et al. (2008). Do total de 200 gatos estudados apenas dois possuíam lesões de pele e hepato e esplenomegalia. No entanto, como não foram excluídas outras enfermidades infecciosas nos animais avaliados, não é possível afirmar que tais alterações do exame físico sejam decorrentes de uma infecção por *Leishmania* sp.

No presente ensaio a soroprevalência de infecção por *Leishmania* sp na população de gatos variou de 4,5% pela técnica de ELISA utilizando proteína A, a 11,5% por ELISA com anti-IgG. Tais valores foram bem menores que os observados por Pennisi et al (1998) e Martín-Sánchez et al (2007), que encontraram valores próximos a 60% em populações de gatos da Itália e Espanha, respectivamente. Por outro lado estão relativamente próximos aos resultados obtidos por Solano-Gallego et al (2007) que foram de 6,29% utilizando proteína A e de 5,25% com anti-IgG.

A técnica de ELISA-IgG apresentou sensibilidade superior (25%) à obtida por meio de ELISA–proteína A (12,5%), ambas consideradas melhores do que a sensibilidade obtida por Maia et al (2008) que, utilizando a RIFI, não conseguiram detectar os animais positivos ao exame de PCR. As diferenças na sensibilidade das duas técnicas podem estar relacionadas ao tipo de cromógeno usado, uma vez que para a realização do ELISA-proteína A foi utilizada a ortofenilenediamina (OPD), sabidamente menos sensível que a tetrametilbenzidina (TMB), conforme descrito por KPL (2008).

Desse modo, a utilização do TMB pode justificar a maior soroprevalência observada com o ELISA-IgG, diferente dos achados de Solano-Gallego et al (2007), os quais evidenciaram uma maior soroprevalência por meio da técnica de ELISA com proteína A, do que com o ELISA usando anti-IgG. No entanto, os autores utilizaram o mesmo cromógeno, o OPD, nos dois ensaios.

Outro fator a ser considerado é a diluição do soro e do conjugado, discutido por Solano-Gallego et al. (2007). De acordo com os autores, as concentrações séricas de anticorpos anti-*Leishmania* sp em gatos são inferiores às observadas em cães, necessitando, portanto, de menores diluições de soro e conjugado. No entanto, nos dois ensaios realizados no presente estudo, as amostras não foram testadas simplesmente utilizando-se a mesma técnica padronizada para cães, como feito por Poli et al (2002). Nos dois casos foram realizadas novas padronizações com diversas diluições de soro e de conjugado, com o objetivo de se obter resultados mais fidedignos, conforme demonstrado nos apêndices A, B, E e F. Desta forma, este não pode ser considerado um fator determinante da sensibilidade das duas técnicas.

No que diz respeito à especificidade, aquela obtida no ELISA-proteína A foi muito superior (65,4%) à do ELISA-IgG (19,2%). Martín-Sanches et al (2006), pesquisando infecção por *Leishmania infantum* em gatos na Espanha, não encontraram associação quando da comparação dos resultados de sorologia pela RIFI e da técnica de PCR, porém houve associação entre a RIFI para leishmaniose e o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-vírus da leucemia felina (FeLV) na população estudada. Este fato poderia explicar a baixa

especificidade obtida na RIFI decorrente de co-infecções por outros agentes infecciosos, levando ao aparecimento de reações cruzadas. No presente estudo não temos subsídios para afirmar que reações cruzadas também não tenham ocorrido quando do uso da proteína A.

As concordâncias observadas entre o diagnóstico parasitológico e as técnicas de ELISA utilizadas foram consideradas fracas baseando-se no coeficiente Kappa. Chama a atenção o fato de que dos oito gatos com exame parasitológico positivo, apenas um foi considerado positivo pelo ELISA-proteína A e dois pelo ELISA-IgG. Esta observação concorda com os relatos de Martín-Sánchez et al (2007), os quais, avaliando amostras de soro de 183 gatos, verificaram que os animais com os mais altos títulos de anticorpos foram os que apresentaram a menor proporção de positividade na técnica de PCR. Por outro lado, as maiores proporções de PCR positivos ocorreram em gatos com baixos títulos de anticorpos.

Estes resultados sugerem que a resposta imune à infecção por *Leishmania* sp em gatos difere da observada em cães, o que deve explicar o pequeno número de animais infectados e sintomáticos. Esse fato pode subestimar o número real de gatos infectados, desta forma, facilitando a transmissão dos parasitos, como salientado por Portús et al. (2002).

Sendo assim, as técnicas sorológicas rotineiramente empregadas para cães não demonstram ser um instrumento eficiente para a determinação da infecção em gatos. Deste modo, baseando-se nos resultados observados no presente estudo, onde a utilização do cromógeno TMB elevou a sensibilidade do teste de ELISA, e naqueles observados por Solano-Gallego et al (2007), que demonstraram ser a técnica de ELISA com proteína A mais sensível que o ELISA-IgG, novos ensaios devem ser realizados na tentativa de se obter uma técnica com maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp em felinos domésticos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições do presente experimento permitiram concluir que:

1. A soroprevalência de infecção por *Leishmania* sp utilizando-se a técnica de ELISA com proteína A foi de 4,5%;
2. A soroprevalência de infecção por *Leishmania* sp utilizando-se a técnica de ELISA com anti-IgG foi de 11,5%;
3. Os valores de sensibilidade e especificidade para o método de ELISA-proteína A foram 12,5% e 65,4%, respectivamente;
4. Os valores de sensibilidade e especificidade para o método de ELISA-IgG foram 25% e 19,2%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

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

BARNES, J.C.; STANLEY, O.; CRAIG, T.M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.3, p.416–418. 1993.

BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDIVIA, O.; TORREALBA, J.; GRACÍA, M.T.; GARÓFALO, M.M.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI-JUNIOR, G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Revista Científica FCV-LUZ**, v.6, p.187-190, 1996.

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.

COSTA DURÃO, J.F.; REBELO, E.; PELETEIRO, M.C.; CORREIA, J.J.; SIMÕES, G. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra). Nota preliminar. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, p.140–144. 1994.

CRAIG, T.M.; BARTON, C.L.; MERCER, S.H.; DROLESKEY, B.E.; JONES, L.P. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, n.6, p.1100–1102. 1986.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p.151-156. 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**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings...** Salamanca: Intervet International bv, 2002. p.21-24.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.136, n.20, p.514-516, 1995.

GREVOT, A.; JAUSSAUD HUGUES, P.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; OZON, C.; HAAS, P.; BRETON, C.; BOURDOISEAU, G. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v.12, n.20, p.271-275, 2005.

HERVAS, J.; CHACON-MANRIQUE DE LARA, F; SANCHEZ-ISARRIA, M.A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILLO, J.A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.1, n.2, p.101–105. 1999.

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

KIRKPATRICK, C.E.; FARRELL, J.P.; GOLDSCHMIDT, M.H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. **Experimental Parasitology**, v.58, n.2, p.125-131, 1984.

KPL. Comparison of ABTS, TMB, and OPD Peroxidase Substrate Systems. Disponível em: <<http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tc=5>>. Acesso em: 22 jul. 2008.

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.

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

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.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.8, 2008. Disponível em : <<http://liebertonline.com/doi/pdfplus/10.1089/ubz.2007.0247cookieset=1>>. Acesso em: 26 Ago. 2008.

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

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

MAROLI, M.; PENNISI, M.G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3-4, p.357–360. 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.30, n.145, p.267-273. 2007.

MELLO, G.B. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico** v.54, n.12, p.180. 1940.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) **Parasitologia humana**. 11º Ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2005. p. 56-72.

MIRACELLY, K. Cidade tem primeiro caso de leishmaniose em gato. **Folha da Região**, Araçatuba, 18 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.folhadaregiao.com.br/noticia.php?44494>>. Acesso em: 20 jul. 2008.

NAUCKE, T.J. Leishmaniose bei katzen. **Rundschreiben**, n. 4, 2000. Disponível em: <<http://members.aol.com/TJNaucke/letter04.html>>. Acesso em: 18 jun. 2008

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in

- Southern France. **Veterinary Parasitology**, v.75, n.2-3, p.273–277. 1998.
- PASSOS, V.M.A.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.1, p.19–20. 1996.
- PENNISI, M.G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.), *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Boxmeer: Intervet International, 2002, p. 39–48.
- PENNISI, M.G.; MASUCCI, M.; CATARSINI, O. Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in gatti FIV+ che vivono in zona endemica. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, v.52, p. 265-266, 1998.
- PENNISI, M.G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; GIUDICE, S. Case report of Leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, v.28, suppl. 1, p.363– 366. 2004.
- POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v.26, n.106, p.181-91. 2002.
- PORTÚS, M.; GÁLLEGO, M.; RIERA, C.; AISA, M.; FISA, R.; CASTILLEJO, S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). **Revista Iberica de Parasitologia**, v.62, p.72-76, 2002.
- 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.

ROSSI, C.N. **Ocorrência de *Leishmania sp.* em gatos do município de Araçatuba – São Paulo – Brasil**. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

RUFENACHT, S.; SAGER, H.; MULLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M.M.; ROOSIE, P.J. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Record**, v.156, n.7, p.542–545. 2005.

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.

SAS® Learning Edition 2.0. Cary, NC. EUA: SAS Institute, 2005.

SAVANI, E.S.M.M.; CAMARGO, M.C.G.O; CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; SANTOS, M.G.; D'ÁURIA, S.R.N.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Short communication. **Veterinary Parasitology**, v.120, n.3, p.229–233, 2004.

SCHUBACH, A.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; MADEIRA, M.F.; SANTOS, I.B.; ANDRADE, M.V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M.C.A.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 98, p.165-167, 2004.

SERGEANT, E.; SERGEANT, E.; LOMBAARD, J.; QUILICHINI, M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bull Soc. Pathol. Exot.** v.5, p.93-98. 1912.

SILVA, A.V.; DE SOUZA CÂNDIDO, C.D.; DE PITA PEREIRA, D.; BRAZIL, R.P.; CARREIRA, J.C. The first record of american visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.105, n.1, p.92-94. 2008.

SIMÕES-MATTOS, L. **O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2005. 231f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2005.

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C.M.L.; MATTOS, M.R.F.; POMPEU, M.M.L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n.550, p.79–87. 2004.

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.; GREENE, C.E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 450-458.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, n.4, p.676-680, 2007.

SOUZA, A.L.; BARROS, E.M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.; MARIN, G.R.; NUNES, V.L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p.41–45. 2005.

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.

VITA, S.; AGUZZI, I.; PETROTTA, E.; LUCIANI, A. Feline leishmaniasis and erlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. **Veterinary Research Communications**, v.29, suppl.2, p.319-321, 2005.

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

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.

APÊNDICES

Apêndice A. Densidades ópticas médias (DO) da padronização das diluições de soro e Proteína A pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina, realizada com amostras positiva e negativa. (Araçatuba-SP, 2008).

Diluição dos soros dos gatos		Diluição da Proteína A					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1200
Controle Positivo	1:50	1,668	1,428	1,110	1,134	0,863	0,680
	1:100	0,970	1,051	0,773	0,618	0,480	0,490
	1:200	0,623	0,660	0,480	0,413	0,387	0,423
	1:400	0,151	0,317	0,150	0,197	0,140	0,103
Controle Negativo	1:50	0,087	0,047	0,061	0,044	0,054	0,038
	1:100	0,048	0,029	0,041	0,014	0,032	0,015
	1:200	0,028	0,016	0,038	0,006	0,004	0,010
	1:400	0,009	0,007	0,008	0,004	0,004	0,004

Apêndice B. Valores das diferenças das médias dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e proteína A, pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina. (Araçatuba-SP, 2008).

Diluição dos soros dos gatos	Diluição da proteína A					
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1200
1:50	1,581	1,381	1,049	1,09	0,809	0,655
1:100	0,922	1,022	0,732	0,604	0,448	0,475
1:200	0,595	0,644	0,442	0,407	0,383	0,422
1:400	0,142	0,310	0,142	0,193	0,136	0,099

Apêndice C. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com proteína A para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 51 gatos provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)

ANIMAL	DO	AP	ANIMAL	DO	AP
1	0,226	0,182	27	0,062	0,022
2	0,181	0,138	28	0,220	0,176
3	0,103	0,062	29	0,233	0,189
4	0,092	0,051	30	0,165	0,122
5	0,071	0,030	31	0,080	0,000
6	0,117	0,075	32	0,186	0,143
7	0,075	0,034	33	0,159	0,117
8	0,203	0,160	34	0,120	0,078
9	0,147	0,105	35	0,209	0,165
10	0,157	0,115	36	0,131	0,089
11	0,059	0,019	37	0,149	0,107
12	0,073	0,032	38	0,240	0,196
13	0,241	0,197	39	0,202	0,205
14	0,066	0,025	40	0,176	0,178
15	0,140	0,098	41	0,088	0,089
16	0,183	0,140	42	0,048	0,048
17	0,172	0,129	43	0,162	0,164
18	0,139	0,097	44	0,060	0,060
19	0,039	0,000	45	0,055	0,055
20	0,062	0,022	46	0,045	0,045
21	0,181	0,138	47	0,226	0,229
22	0,260	0,215	48	0,233	0,236
23	0,100	0,059	49	0,085	0,086
24	0,091	0,050	50	0,054	0,055
25	0,047	0,007	51	0,114	0,116
26	0,169	0,126			

Apêndice D. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com proteína A para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
1	0,154	0,170	Não Reagente	41	0,313	0,165	Não Reagente
2	0,790	0,280	Não Reagente	42	0,258	0,289	Não Reagente
3	0,031	0,032	Não Reagente	43	0,286	0,320	Não Reagente
4	0,113	0,124	Não Reagente	44	0,142	0,157	Não Reagente
5	0,135	0,149	Não Reagente	45	0,295	0,330	Não Reagente
6	0,083	0,091	Não Reagente	46	0,079	0,089	Não Reagente
7	0,149	0,165	Não Reagente	47	0,056	0,062	Não Reagente
8	0,080	0,087	Não Reagente	48	0,042	0,046	Não Reagente
9	0,119	0,131	Não Reagente	49	0,003	0,000	Não Reagente
10	0,179	0,199	Não Reagente	50	0,072	0,080	Não Reagente
11	0,133	0,147	Não Reagente	51	0,052	0,057	Não Reagente
12	0,082	0,089	Não Reagente	52	0,057	0,063	Não Reagente
13	0,090	0,098	Não Reagente	53	0,029	0,030	Não Reagente
14	0,084	0,092	Não Reagente	54	0,099	0,112	Não Reagente
15	0,069	0,075	Não Reagente	55	0,069	0,077	Não Reagente
16	0,126	0,139	Não Reagente	56	0,097	0,110	Não Reagente
17	0,039	0,041	Não Reagente	57	0,056	0,061	Não Reagente
18	0,205	0,202	Não Reagente	58	0,085	0,096	Não Reagente
19	0,178	0,198	Não Reagente	59	0,046	0,024	Não Reagente
20	0,238	0,266	Não Reagente	60	1,495	1,000	Reagente
21	0,178	0,198	Não Reagente	61	0,050	0,026	Não Reagente
22	0,146	0,161	Não Reagente	62	0,219	0,140	Não Reagente
23	0,132	0,146	Não Reagente	63	0,087	0,051	Não Reagente
24	0,187	0,208	Não Reagente	64	0,129	0,080	Não Reagente
25	0,097	0,106	Não Reagente	65	0,033	0,015	Não Reagente
26	0,084	0,092	Não Reagente	66	0,030	0,012	Não Reagente
27	0,093	0,101	Não Reagente	67	0,211	0,135	Não Reagente
28	0,062	0,067	Não Reagente	68	0,102	0,060	Não Reagente
29	0,048	0,051	Não Reagente	69	0,096	0,057	Não Reagente
30	0,181	0,202	Não Reagente	70	0,013	0,001	Não Reagente
31	0,075	0,082	Não Reagente	71	0,566	0,207	Não Reagente
32	0,173	0,193	Não Reagente	72	0,603	0,233	Não Reagente
33	0,139	0,154	Não Reagente	73	0,044	0,022	Não Reagente
34	0,670	0,203	Não Reagente	74	0,227	0,103	Não Reagente
35	0,098	0,108	Não Reagente	75	0,097	0,058	Não Reagente
36	0,100	0,110	Não Reagente	76	0,244	0,157	Não Reagente
37	0,790	0,086	Não Reagente	77	1,016	0,513	Reagente
38	0,026	0,026	Não Reagente	78	0,440	0,257	Não Reagente
39	0,114	0,126	Não Reagente	79	0,182	0,115	Não Reagente
40	0,259	0,290	Não Reagente	80	0,149	0,093	Não Reagente

Apêndice D. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com proteína A para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
81	0,051	0,093	Não Reagente	121	0,233	0,194	Não Reagente
82	0,089	0,053	Não Reagente	122	0,200	0,163	Não Reagente
83	1,882	1,102	Reagente	123	0,324	0,280	Não Reagente
84	0,213	0,136	Não Reagente	124	0,156	0,121	Não Reagente
85	0,130	0,108	Não Reagente	125	0,267	0,226	Não Reagente
86	0,289	0,187	Não Reagente	126	0,123	0,090	Não Reagente
87	0,251	0,162	Não Reagente	127	0,212	0,174	Não Reagente
88	0,227	0,145	Não Reagente	128	0,087	0,056	Não Reagente
89	0,057	0,031	Não Reagente	129	0,135	0,117	Não Reagente
90	0,042	0,021	Não Reagente	130	0,062	0,046	Não Reagente
91	0,101	0,060	Não Reagente	131	0,163	0,145	Não Reagente
92	0,318	0,207	Não Reagente	132	0,178	0,160	Não Reagente
93	0,144	0,090	Não Reagente	133	0,089	0,072	Não Reagente
94	0,222	0,142	Não Reagente	134	0,083	0,066	Não Reagente
95	0,016	0,003	Não Reagente	135	0,130	0,113	Não Reagente
96	0,385	0,252	Não Reagente	136	0,189	0,171	Não Reagente
97	0,153	0,096	Não Reagente	137	0,216	0,197	Não Reagente
98	0,089	0,053	Não Reagente	138	0,059	0,043	Não Reagente
99	0,160	0,100	Não Reagente	139	0,247	0,228	Não Reagente
100	0,414	0,272	Não Reagente	140	0,147	0,130	Não Reagente
101	0,734	0,487	Reagente	141	0,501	0,480	Reagente
102	0,140	0,087	Não Reagente	142	0,186	0,168	Não Reagente
103	1,307	0,873	Reagente	143	0,171	0,153	Não Reagente
104	0,218	0,139	Não Reagente	144	0,26	0,241	Não Reagente
105	0,336	0,219	Não Reagente	145	0,110	0,093	Não Reagente
106	0,397	0,260	Não Reagente	146	0,368	0,073	Não Reagente
107	0,233	0,194	Não Reagente	147	0,203	0,185	Não Reagente
108	0,116	0,084	Não Reagente	148	0,314	0,294	Não Reagente
109	0,053	0,024	Não Reagente	149	0,219	0,201	Não Reagente
110	0,056	0,026	Não Reagente	150	0,019	0,003	Não Reagente
111	0,636	0,255	Não Reagente	151	0,114	0,097	Não Reagente
112	0,222	0,183	Não Reagente	152	0,159	0,142	Não Reagente
113	0,192	0,155	Não Reagente	153	0,044	0,028	Não Reagente
114	0,119	0,086	Não Reagente	154	0,130	0,113	Não Reagente
115	0,177	0,141	Não Reagente	155	0,161	0,143	Não Reagente
116	0,031	0,003	Não Reagente	156	0,104	0,087	Não Reagente
117	0,222	0,183	Não Reagente	157	0,153	0,136	Não Reagente
118	0,223	0,185	Não Reagente	158	0,128	0,110	Não Reagente
119	0,140	0,106	Não Reagente	159	0,176	0,158	Não Reagente
120	0,172	0,136	Não Reagente	160	0,232	0,213	Não Reagente

Apêndice D. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com proteína A para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
161	0,445	0,237	Não Reagente	181	0,247	0,067	Não Reagente
162	0,166	0,011	Não Reagente	182	0,132	NEG	Não Reagente
163	0,195	0,044	Não Reagente	183	0,288	0,116	Não Reagente
164	0,164	0,009	Não Reagente	184	0,268	0,092	Não Reagente
165	0,155	NEG	Não Reagente	185	0,304	0,030	Não Reagente
166	0,148	NEG	Não Reagente	186	0,294	0,022	Não Reagente
167	0,078	NEG	Não Reagente	187	0,238	0,055	Não Reagente
168	0,150	NEG	Não Reagente	188	0,239	0,056	Não Reagente
169	0,096	NEG	Não Reagente	189	0,315	0,150	Não Reagente
170	0,026	NEG	Não Reagente	190	0,245	0,064	Não Reagente
171	0,057	NEG	Não Reagente	191	0,279	0,013	Não Reagente
172	0,033	NEG	Não Reagente	192	0,285	0,017	Não Reagente
173	0,065	NEG	Não Reagente	193	0,164	NEG	Não Reagente
174	0,097	NEG	Não Reagente	194	0,102	NEG	Não Reagente
175	0,453	0,320	Não Reagente	195	0,203	0,012	Não Reagente
176	0,184	NEG	Não Reagente	196	0,472	0,144	Não Reagente
177	0,350	0,193	Não Reagente	197	0,206	0,016	Não Reagente
178	0,340	0,181	Não Reagente	198	0,319	0,040	Não Reagente
179	0,017	NEG	Não Reagente	199	0,358	0,203	Não Reagente
180	0,302	0,134	Não Reagente	200	0,409	0,100	Não Reagente

Apêndice E. Densidades ópticas médias (DO) da padronização das diluições de soro e anti-IgG pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina, realizada com amostras positiva e negativa. (Araçatuba-SP, 2008).

Diluição dos soros dos gatos		Diluição do anti-IgG						
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
Controle Positivo	1:5000	2,793	2,911	2,951	3,020	2,295	2,872	2,953
	1:10000	2,863	2,865	2,962	2,901	2,519	2,865	2,679
	1:20000	2,840	2,890	2,821	2,802	2,757	2,538	2,185
	1:40000	2,700	2,636	2,534	2,489	2,960	1,907	1,461
	1:80000	2,684	2,583	2,321	2,225	2,160	1,582	1,203
Controle Negativo	1:5000	2,364	1,834	1,175	0,689	0,064	0,162	0,081
	1:10000	1,813	1,298	0,805	0,425	0,091	0,094	0,072
	1:20000	0,971	0,651	0,395	0,211	0,103	0,065	0,050
	1:40000	0,664	0,428	0,252	0,157	0,084	0,032	0,022
	1:80000	0,496	0,385	0,202	0,122	0,107	0,025	0,017

Apêndice F. Valores das diferenças das médias dos controles positivo e negativo, nas diversas diluições de soro e anti-IgG, pela técnica de ELISA, para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. na espécie felina. (Araçatuba-SP, 2008).

Diluição dos soros dos gatos	Diluição do anti-IgG						
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
1:5000	0,429	1,077	1,776	2,331	2,231	2,710	2,876
1:10000	1,050	1,567	2,157	2,476	2,428	2,771	2,607
1:20000	1,869	2,239	2,426	2,591	2,654	2,473	2,135
1:40000	2,036	2,208	2,282	2,332	2,876	1,875	1,439
1:80000	2,188	2,198	2,119	2,103	2,053	1,557	1,186

Apêndice G. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com anti-IgG para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 53 gatos provenientes de área não endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)

ANIMAL	DO	AP	ANIMAL	DO	AP
1	0,642	0,218	28	0,224	0,062
2	0,556	0,185	29	0,313	0,095
3	0,645	0,219	30	0,431	0,139
4	0,316	0,096	31	0,619	0,209
5	0,319	0,097	32	0,284	0,084
6	0,284	0,084	33	0,142	0,031
7	0,225	0,062	34	0,600	0,202
8	0,560	0,187	35	0,109	0,019
9	0,097	0,015	36	0,405	0,129
10	0,762	0,262	37	0,431	0,139
11	0,162	0,039	38	0,577	0,047
12	0,808	0,279	39	0,368	0,086
13	0,267	0,078	40	0,611	0,207
14	0,134	0,028	41	0,453	0,147
15	0,175	0,044	42	0,337	0,103
16	0,227	0,063	43	0,178	0,043
17	0,162	0,039	44	0,277	0,080
18	0,224	0,062	45	0,195	0,049
19	0,076	0,007	46	0,191	0,048
20	0,458	0,149	47	0,151	0,032
21	0,186	0,048	48	0,510	0,169
22	0,306	0,092	49	0,965	0,341
23	0,937	0,327	50	0,195	0,049
24	0,618	0,209	51	0,168	0,039
25	0,121	0,024	52	0,260	0,074
26	0,159	0,038	53	0,558	0,187
27	0,680	0,232			

Apêndice H. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com anti-IgG para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
1	0,200	0,051	Não Reagente	41	0,079	Neg	Não Reagente
2	0,241	0,067	Não Reagente	42	0,214	0,041	Não Reagente
3	0,118	0,010	Não Reagente	43	0,220	0,043	Não Reagente
4	0,118	0,020	Não Reagente	44	0,228	0,046	Não Reagente
5	0,620	0,210	Não Reagente	45	0,356	0,092	Não Reagente
6	0,159	0,035	Não Reagente	46	0,319	0,079	Não Reagente
7	0,139	0,028	Não Reagente	47	0,574	0,171	Não Reagente
8	0,280	0,081	Não Reagente	48	0,430	0,119	Não Reagente
9	0,287	0,084	Não Reagente	49	0,147	0,017	Não Reagente
10	0,107	0,016	Não Reagente	50	0,259	0,057	Não Reagente
11	1,223	0,439	Reagente	51	0,402	0,109	Não Reagente
12	0,128	0,011	Não Reagente	52	0,391	0,105	Não Reagente
13	0,128	0,024	Não Reagente	53	0,083	Neg	Não Reagente
14	0,087	0,008	Não Reagente	54	0,680	0,211	Não Reagente
15	0,064	0,000	Não Reagente	55	1,860	0,637	Reagente
16	0,166	0,038	Não Reagente	56	0,847	0,273	Não Reagente
17	0,091	0,010	Não Reagente	57	0,676	0,210	Não Reagente
18	0,290	0,085	Não Reagente	58	0,702	0,220	Não Reagente
19	0,150	0,032	Não Reagente	59	0,326	0,081	Não Reagente
20	0,400	0,127	Não Reagente	60	2,695	2,745	Reagente
21	0,355	0,110	Não Reagente	61	1,019	0,337	Não Reagente
22	0,278	0,081	Não Reagente	62	0,313	0,076	Não Reagente
23	3,167	1,176	Reagente	63	0,092	Neg	Não Reagente
24	0,426	0,137	Não Reagente	64	0,257	0,056	Não Reagente
25	0,089	0,009	Não Reagente	65	0,348	0,089	Não Reagente
26	0,162	0,037	Não Reagente	66	0,320	0,079	Não Reagente
27	0,308	0,092	Não Reagente	67	0,400	0,109	Não Reagente
28	0,089	0,009	Não Reagente	68	0,216	0,041	Não Reagente
29	0,236	0,065	Não Reagente	69	0,093	Neg	Não Reagente
30	0,783	0,247	Não Reagente	70	0,375	0,099	Não Reagente
31	0,101	0,000	Não Reagente	71	1,456	0,498	Reagente
32	0,327	0,082	Não Reagente	72	0,746	0,236	Não Reagente
33	0,387	0,104	Não Reagente	73	0,174	0,025	Não Reagente
34	0,263	0,058	Não Reagente	74	0,450	0,127	Não Reagente
35	0,397	0,107	Não Reagente	75	0,208	0,038	Não Reagente
36	0,214	0,041	Não Reagente	76	0,821	0,264	Não Reagente
37	0,201	0,036	Não Reagente	77	1,194	0,401	Reagente
38	0,115	0,005	Não Reagente	78	1,461	0,499	Reagente
39	0,161	0,022	Não Reagente	79	0,531	0,157	Não Reagente
40	0,392	0,105	Não Reagente	80	0,528	0,156	Não Reagente

Apêndice H. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com anti-IgG para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
81	0,511	0,150	Não Reagente	121	0,406	0,103	Não Reagente
82	1,770	0,613	Reagente	122	0,267	0,049	Não Reagente
83	1,794	0,622	Reagente	123	0,219	0,030	Não Reagente
84	1,244	0,419	Reagente	124	0,506	0,142	Não Reagente
85	2,141	0,750	Reagente	125	0,655	0,200	Não Reagente
86	0,663	0,206	Não Reagente	126	0,362	0,086	Não Reagente
87	0,399	0,108	Não Reagente	127	0,508	0,143	Não Reagente
88	0,693	0,217	Não Reagente	128	0,309	0,065	Não Reagente
89	0,211	0,039	Não Reagente	129	0,513	0,145	Não Reagente
90	0,791	0,253	Não Reagente	130	0,151	0,004	Não Reagente
91	0,466	0,133	Não Reagente	131	1,182	0,404	Reagente
92	0,714	0,223	Não Reagente	132	0,835	0,269	Não Reagente
93	0,988	0,329	Não Reagente	133	0,392	0,106	Não Reagente
94	0,978	0,325	Não Reagente	134	0,335	0,085	Não Reagente
95	0,928	0,306	Não Reagente	135	1,448	0,495	Reagente
96	1,512	0,532	Reagente	136	2,272	0,798	Reagente
97	2,976	1,101	Reagente	137	0,621	0,187	Não Reagente
98	2,801	1,033	Reagente	138	0,115	Neg	Não Reagente
99	0,500	0,140	Não Reagente	139	0,377	0,092	Não Reagente
100	0,394	0,098	Não Reagente	140	0,396	0,099	Não Reagente
101	2,071	0,750	Reagente	141	0,847	0,274	Não Reagente
102	0,393	0,098	Não Reagente	142	0,415	0,109	Não Reagente
103	0,961	0,318	Não Reagente	143	0,351	0,086	Não Reagente
104	0,331	0,074	Não Reagente	144	2,280	0,801	Reagente
105	0,623	0,187	Não Reagente	145	0,316	0,073	Não Reagente
106	0,326	0,072	Não Reagente	146	0,907	0,292	Não Reagente
107	0,317	0,069	Não Reagente	147	0,796	0,251	Não Reagente
108	0,743	0,234	Não Reagente	148	1,032	0,338	Não Reagente
109	0,116	Neg	Não Reagente	149	0,763	0,238	Não Reagente
110	0,205	0,025	Não Reagente	150	0,087	Neg	Não Reagente
111	0,941	0,311	Não Reagente	151	0,171	0,019	Não Reagente
112	0,518	0,146	Não Reagente	152	0,236	0,043	Não Reagente
113	0,595	0,177	Não Reagente	153	0,091	Neg	Não Reagente
114	0,278	0,053	Não Reagente	154	0,354	0,087	Não Reagente
115	0,370	0,089	Não Reagente	155	0,708	0,218	Não Reagente
116	0,180	0,015	Não Reagente	156	0,215	0,035	Não Reagente
117	0,172	0,012	Não Reagente	157	0,404	0,105	Não Reagente
118	0,193	0,020	Não Reagente	158	0,167	0,023	Não Reagente
119	0,185	0,017	Não Reagente	159	0,249	0,048	Não Reagente
120	0,409	0,104	Não Reagente	160	0,482	0,134	Não Reagente

Apêndice H. Densidades ópticas médias (DO) e corrigidas (A/P), obtidas por meio da técnica de ELISA com anti-IgG para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp., no soro de 200 gatos provenientes de área endêmica para a doença. (Araçatuba-SP, 2008)

Animal	DO	A/P	Resultado	Animal	DO	A/P	Resultado
161	1,309	0,441	Reagente	181	0,592	0,175	Não Reagente
162	0,227	0,040	Não Reagente	182	0,187	0,031	Não Reagente
163	0,494	0,139	Não Reagente	183	0,512	0,149	Não Reagente
164	0,375	0,095	Não Reagente	184	0,155	0,019	Não Reagente
165	0,335	0,080	Não Reagente	185	0,469	0,133	Não Reagente
166	0,197	0,034	Não Reagente	186	0,316	0,078	Não Reagente
167	0,238	0,044	Não Reagente	187	0,197	0,035	Não Reagente
168	0,425	0,113	Não Reagente	188	0,260	0,057	Não Reagente
169	1,071	0,352	Não Reagente	189	0,373	0,098	Não Reagente
170	0,256	0,050	Não Reagente	190	0,231	0,047	Não Reagente
171	0,233	0,042	Não Reagente	191	0,449	0,126	Não Reagente
172	0,418	0,110	Não Reagente	192	0,760	0,239	Não Reagente
173	0,375	0,095	Não Reagente	193	0,237	0,049	Não Reagente
174	1,146	0,380	Reagente	194	0,409	0,112	Não Reagente
175	0,714	0,220	Não Reagente	195	0,303	0,073	Não Reagente
176	0,653	0,198	Não Reagente	196	0,531	0,156	Não Reagente
177	0,542	0,157	Não Reagente	197	0,363	0,095	Não Reagente
178	1,519	0,519	Reagente	198	0,381	0,101	Não Reagente
179	1,790	0,619	Reagente	199	0,277	0,064	Não Reagente
180	0,555	0,161	Não Reagente	200	0,730	0,228	Não Reagente

Apêndice I. Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* nos esfregaços de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Apêndice I. Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* nos esfregaços de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado
41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
51	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
52	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
53	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
54	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
55	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
56	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
57	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
60	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
61	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
71	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
73	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
74	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
75	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
77	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
78	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
79	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
80	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Apêndice I. Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* nos esfregaços de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado
81	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
82	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
83	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
84	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
85	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
86	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
87	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
88	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
89	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
90	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
91	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
92	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
93	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
94	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
95	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
96	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
97	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
98	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
99	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
100	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
101	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
102	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
103	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
104	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
105	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
106	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
107	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
108	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
109	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
110	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
111	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
112	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
113	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
114	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
115	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
116	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
117	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
118	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
119	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
120	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Apêndice I. Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* nos esfregaços de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2008) (continua)

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado
121	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
122	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
123	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
124	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
125	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
126	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
127	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
128	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
129	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
130	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
131	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
132	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
133	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
134	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
135	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
136	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
137	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
138	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
139	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
140	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
141	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
142	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
143	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
144	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
145	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
146	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
147	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
148	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
149	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
150	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
151	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
152	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
153	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
154	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
155	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
156	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
157	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
158	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
159	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
160	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Apêndice I. Resultados individuais da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.* nos esfregaços de citologias aspirativas por agulha fina de linfonodo, medula óssea, baço e fígado de 200 gatos do município de Araçatuba-SP. (Araçatuba-SP, 2008)

Animal	Linfonodo	Medula Óssea	Baço	Fígado
161	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
162	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
163	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
164	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
165	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
166	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
167	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
168	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
169	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
170	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
171	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
172	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
173	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
174	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
175	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
176	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
177	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
178	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
179	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
180	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
181	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
182	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
183	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
184	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
185	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
186	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
187	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
188	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
189	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
190	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
191	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
192	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
193	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
194	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
195	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
196	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
197	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
198	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
199	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
200	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)