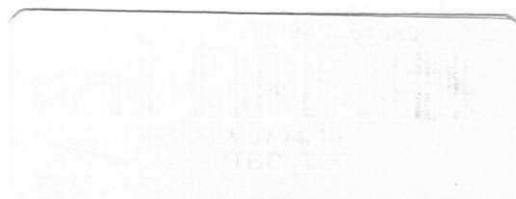


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Avaliação da Prevalência do calazar em raposas (*Cerdocyon thous*) e cães (*Canis lupus familiares*) provenientes do município de João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Gilzane Dantas Nóbrega



2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Avaliação da Prevalência do calazar em raposas (*Cerdocyon thous*) e cães (*Canis lupus familiares*) provenientes do município de João Pessoa, Paraíba, Brasil.**

**Gilzane Dantas Nóbrega**

**Graduando**

**Profa. Marcia Almeida de Melo**

**Orientadora**

**Patos  
Abril de 2010**

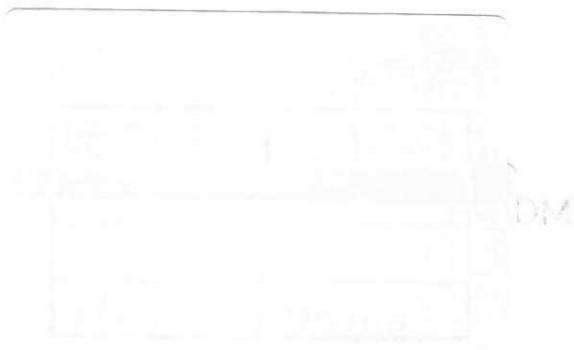


Biblioteca Setorial do CDSA. Junho de 2022.

Sumé - PB



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA



FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CAMPUS DE PATOS - UFCG

N754a  
2010

Nóbrega, Gilzane Dantas.

Avaliação da Prevalência do calazar em raposas (*Cerdocyon thous*) e cães (*Canis lupus familiares*) provenientes do município de João Pessoa, Paraíba, Brasil. / Gilzane Dantas Nóbrega. - Patos - PB: CSTR, UFCG, 2010.

58p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientadora: Marcia Almeida de Melo

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Zoonoses - Monografia. 2 – Saúde Pública. 3. Calazar – raposas. 4- Calazar - Cães

CDU: 614

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

GILZANE DANTAS NÓBREGA  
**Graduando**

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

ENTREGUE EM ...../...../.....

MÉDIA: 10,0

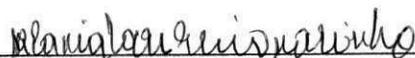
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. Marcia Almeida de Melo

Nota 10,0

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Almir Pereira de Souza

Nota 10,0

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup>. Melânia Loureiro Marinho

Nota 10,0

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

GILZANE DANTAS NÓBREGA  
**Graduando**

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADO EM ...../...../.....

EXAMINADORES:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia Almeida de Melo (Orientadora)

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza (Examinador I)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Melânia Loureiro Marinho (Examinador II)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por ter me guiado quando me senti perdida, por ter me dado força quando me encontrava enfraquecida, por ter me estimulado a seguir em frente quando a vontade muitas vezes foi de desistir, por ouvir minhas preces quando mesmo em silêncio eu conversava, por me fazer acreditar que eu era capaz, enfim agradeço por tudo e por todas as pessoas maravilhosas que TU quisestes que cruzassem meu caminho. OBRIGADA!

A meu pai Gilberto, minha mãe Sônia, meus irmãos Gutemberg, Francisco Gêdson e Jefferson e ao meu sobrinho Vitor Gabriel que sempre me estimularam e me deram força e muito amor durante toda a caminhada, contribuindo sempre para meu enriquecimento pessoal e servindo de base nos momentos mais difíceis.

A toda minha família: avós maternos (João Dantas e Francisca) e paternos (Francisco Lúcio e Maria- *in memorian*), as minhas tias e tios, primas e primos que sempre buscam me ajudar e me fortalecem.

Ao meu namorado Temístocles Neto por compartilhar alegrias e tristezas, por me incentivar nas horas de dificuldade, e principalmente, por me ensinar a entender o maior e melhor de todos os sentimentos que é o amor.

Aos meus verdadeiros amigos que sempre estarão comigo, embora que distantes de corpo, em especial Hellen Renatta, Karla Mamede, Cassandra, Wanusca, José Wilker e Alexandre porque sei que sempre torceram e torcem pela minha vitória e pela felicidade.

A minha Orientadora a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Almeida de Melo pelo grande incentivo e por ter me acolhido na sua vida profissional e na sua vida pessoal e pela sua paciência e dedicação em transmitir muito da sua experiência e pelo auxílio na concretização desta e de outras obras científicas e a sua família: Professor e Doutor Paulo Paes de Andrade por compartilhar sua grandiosa inteligência e sabedoria, Camilinha e Lucas pelas muitas vezes que dividiram a mãe deles comigo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido do CSTR/Patos-PB, Aline Antas, Arthur Pombo, Expedito Kennedy, Kamila Nunes, Tereza Emannelle pelo companheirismo e a colaboração durante a preparação deste estudo.

Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres/IBAMA-CABEDELO na pessoa do Médico Veterinário e Analista Ambiental Paulo Guilherme Carniel Wagner responsável pela idealização deste trabalho e pelo livre acesso aos animais silvestres que me foi concedido durante o desenvolvimento deste trabalho e a Michelle pelo seu auxílio como bióloga, Mércia pela sua paciência, Rony e Odair pelas inúmeras vezes que deixaram suas tarefas para me ajudarem com animais.

Aos Médicos Veterinários Thiago (MIB), Beto e Helen Leontina, e a Bióloga Helze e a todos os tratadores pelo auxílio na captura dos animais do Parque Zoobotânico Arruda Câmara/João Pessoa.

A meus colegas Jefferson Cordeiro, Jean Leal, Janaína Larisse e Layse Wanderley por terem me auxiliado durante as coletas com os animais silvestres.

Ao Centro de Controle de Zoonoses-JP nas pessoas dos Médicos Veterinários do Centro de Controle de Zoonoses-JP, o Dr. e Mestre Felipe Eduardo da Silva Sobral e o Dr. Marcos por terem colaborado na coleta de material dos cães e pelas informações compartilhadas, e a todo o pessoal que fazem parte deste Centro.

A todos os Diretores e Coordenadores da UFCG-Campus de Patos por administrarem a universidade com muita responsabilidade e sabedoria.

A todos os meus Professores por terem plantando um pouco de cada semente da vossa sabedoria na minha vida contribuindo para o meu amadurecimento profissional.

A todos os funcionários que sempre se colocaram a disposição para contribuir com as suas atribuições em especial: Damião pelo enorme coração, Tereza por ser esta maravilhosa, a Ana Benvinda por ser tão divertida.

Aos meus colegas de graduação que conviveram comigo todos estes anos compartilhando momentos bons e ruins.

Aos animais que sem eles não seria possível concretizar esta realização e partilhar a amizade com indivíduos de patas.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>08</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>09</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Histórico da Doença.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Epidemiologia.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Manifestações Clínicas.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Diagnóstico.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Tratamento.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Medidas de Controle.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 Medidas de Prevenção.....</b>	<b>27</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Área de estudo.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Populações estudadas.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Local de execução.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4 Os Ensaios.....</b>	<b>32</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1 -</b> Formas amastigotas ou aflageladas do parasito. As setas estão indicando o núcleo e cinetoplasto.....	16
<b>Figura 2 -</b> Forma promastigota ou flagelada do parasito. As setas apontam para o núcleo e o cinetoplasto.....	16
<b>Figura 3 -</b> Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.....	17
<b>Figura 4 -</b> O vetor ( <i>Lutzomyia longipalpis</i> ) responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral na América Latina.....	18
<b>Figura 5 -</b> Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Estado do Pará.....	19
<b>Figura 6 -</b> Raposa <i>Cerdocyon thous</i> .....	21
<b>Figura 7 -</b> Distribuição geográfica da espécie <i>Cerdocyon thous</i> no Brasil.....	22
<b>Figura 8 -</b> Concentração das médias obtidas pela extração de DNA de sangue total utilizando o kit comercial, a sílica e o isopropanol.....	40
<b>Figura 9 -</b> Média do grau de pureza de DNA das amostras de sangue total obtido nas três técnicas pela relação de A260:A280.....	41
<b>Figura 10 -</b> Tendência entre concentração de DNA e pureza das amostras após a extração com kit comercial.....	42
<b>Figura 11 -</b> Tendência entre concentração de DNA e pureza das amostras após extração com sílica.....	42
<b>Figura 12 -</b> Tendência entre concentração de DNA e pureza das amostras após extração com isopropanol.....	43

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1</b> - Resultado do ELISA S7, em absorbância, das amostras de raposas provenientes do zoológico, em duas avaliações com pontos de corte entre 0,207 a 0,218.....	37
<b>Tabela 2</b> - Resultado do ELISA S7, em absorbância, das amostras de raposas provenientes do zoológico, em duas avaliações com pontos de corte entre 0,207 a 0,218.....	38
<b>Tabela 3</b> - Concentração de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtido a partir de sangue total das raposas extraído com kit comercial, isopropanol e sílica e medida por fotometria.....	39
<b>Tabela 4</b> - Valores relativos ao grau de pureza do DNA de amostras de sangue total das raposas extraído com kit comercial, técnica de isopropanol e da sílica e medido por fotometria ( $A_{260}:A_{280}$ ).....	40
<b>Tabela 5</b> - Prevalência dos animais soropositivos em relação ao total de animais caracterizados quanto ao padrão da raça.....	45
<b>Tabela 6</b> - Prevalência dos animais soropositivos em relação ao total de animais com relação à faixa etária.....	45
<b>Tabela 7</b> - Prevalência da leishmaniose visceral canina do Centro de Controle de Zoonoses de acordo com os bairros avaliada nos meses de janeiro/fevereiro de 2010 com base no diagnóstico sorológico através do ELISA S7.....	46

## RESUMO

**NÓBREGA, GILZANE DANTAS. Avaliação da Prevalência do calazar em raposas (*Cerdocyon thous*) e cães (*Canis lupus familiares*) provenientes do município de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Patos, UFCG. 2010, 58 p. (Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária).**

A leishmaniose visceral é uma zoonose cujos reservatórios incriminados são o cão, raposa e marsupiais. A prevalência em cães tem aumentado nos últimos anos e ainda há controvérsias sobre a importância das espécies de raposa no ciclo epidemiológico. Este trabalho teve como objetivo verificar a soroprevalência do calazar em cães do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) e em raposas que são capturadas pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-IBAMA/PB) e as que estão em cativeiro no Parque Zoobotânico Arruda Câmara localizados em de João Pessoa/PB. Um total de 13 amostras de raposas e 113 amostras de cães foram testadas através da sorologia com ELISA S7, um kit comercial com o antígeno constituído de um fragmento recombinante da HSP70 de *Leishmania chagasi*. A prevalência canina foi de 19,65%. As nove raposas capturadas pelo CETAS não apresentaram sorologia positiva. As quatro raposas do parque zoobotânico, por permanecerem em cativeiro, foram testadas duas vezes e duas apresentaram uma aparente soroconversão na segunda sorologia. 12 cães (57,17%) apresentaram pelo menos um dos sinais clínicos sugestivos da doença. 86,9% eram animais sem padrão de raça definida (SPRD), 12 (52,1%) e 11 (47,1%) eram fêmeas e machos, respectivamente. Em relação à positividade por bairros, há uma tendência a uma maior ocorrência na região sudeste da cidade. Em função da alta prevalência do calazar nos cães provenientes do CCZ, de informações sobre o número crescente de cães positivos em clínicas veterinárias e a evidência de sinantropia de raposas em João Pessoa, são necessários estudos epidemiológicos para avaliar o quadro atual da distribuição da doença no município e a influência destes animais silvestres no ciclo biológico para que medidas de controle sejam rotineiramente adotadas.

**Palavras-chave: soroprevalência, animal silvestre, canídeos, leishmaniose, nordeste**

## ABSTRACT

**NÓBREGA, GILZANE DANTAS. Evaluation of prevalence of kala-azar in foxes (*Cerdocyon thous*) and dogs (*Canis lupus familiares*) from João Pessoa, Paraíba, Brazil.** Patos, UFCG. 2010, 58 p. (Monograph of the Course of Veterinary Medicine, Veterinary Medicine Prevent and Animal Health).

Visceral leishmaniasis is a zoonosis whose main reservoirs are the dog, the fox and the opossum. The prevalence in dogs has increased in the last years. Moreover, the role of foxes in the epidemiological cycle is still controversial. This study was developed to determine the prevalence of leishmaniasis among dogs from the Center for Zoonosis Control (CCZ) and foxes captured by the Center for Screening of Wild Animals (CETAS-IBAMA/PB), as well as those kept in captivity at the Arruda Camara Zoobotanical Park, all three institutions located in João Pessoa, Paraíba, Brazil. An amount of 13 foxes and 113 dogs were tested by ELISA S7, a commercial recombinant diagnostic assay based on a fragment of *Leishmania chagasi* HSP70. Canine prevalence was 19.65%. Nine foxes caught by CETAS were serologically negative. Four foxes from the Zoobotanical Park, since held in captivity, were tested twice and two of them had an apparent seroconversion in the second serology. 12 dogs (57.17%) had at least one clinical sign from visceral leishmaniasis. 86.98% animals were mongrels, 12 (52.1%) and 11 (47.1%) were females and males, respectively. In relation to neighborhood prevalence, there is a tendency for a higher occurrence in the southeast region of the city. As the leishmaniasis prevalence in dogs from CCZ is high and as small animal veterinarians have reported the increasing number of positive dogs, associated to the fact that synanthropic foxes are increasingly found in João Pessoa, epidemiological studies are needed to establish the current status of the disease distribution in the city and the influence of wild animals in the biological cycle.

**Keywords:** seroprevalence, wild animal, dog, leishmaniasis, northeast

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) apresenta grande importância para a saúde pública por se tratar de uma zoonose. Pode levar crianças à morte e as drogas utilizadas para tratamento humano são tóxicas e não podem ser utilizadas em grávidas, cardiopatas e nefropatas. Outro agravante é que o principal reservatório para o ser humano, o cão, tem uma relação afetiva direta com o homem cujo tratamento para esta espécie não é autorizado pelo Ministério da Saúde e as vacinas que são comercializadas ainda estão em fase de estudo, fazendo com que a medida de controle indicada seja o sacrifício do animal positivo, o que gera conflitos entre os proprietários, os órgãos de saúde pública e veterinários.

Animais silvestres, como a raposa, também são incriminados como reservatórios da leishmaniose visceral, mas até o momento não há resultados que comprovem qual espécie atua como reservatório ou hospedeiro acidental em regiões endêmicas brasileiras. Em especial no município de João Pessoa - PB tem-se relatado que a espécie *Cerdocyon thous* estão desenvolvendo hábitos sinantrópicos.

Até 1999, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) era responsável pela execução das medidas de controle relacionadas ao calazar, incluindo o inquérito sorológico em cães domiciliados. Com a Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro 1999, a execução de tais medidas passou para a responsabilidade dos Estados e de Municípios, cabendo a FUNASA a coordenação do programa. A partir de então, o que tem ocorrido na maioria dos municípios é que as medidas de controle deixaram de ser preventivas e só são executadas quando há um caso humano, ficando restritas a um raio de 300 metros em torno deste. Provavelmente, este fato tem levado ao aumento da prevalência dos casos caninos em várias regiões, como informado por médicos veterinários responsáveis por clínicas nos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Desta forma, com o apoio do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA) e do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), ambos em João Pessoa, o objetivou-se com este trabalho obter dados sobre a prevalência de calazar canino no município e verificar a participação de raposas no ciclo epidemiológico da leishmaniose visceral.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico da Doença

A primeira descrição da Leishmaniose Visceral (LV) foi na Grécia, em 1835 onde anteriormente era conhecida como “ponos” (Deus da dor, na mitologia grega). Em 1869 foi denominada na Índia de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) em virtude do escurecimento da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI, 1981).

William Boog Leishman no ano de 1900, em Bengal na Índia, identificou a presença de um protozoário no baço de um soldado que foi a óbito em decorrência da febre “Dum Dum”. Em 1903, o agente etiológico foi descrito por Donovan que demonstrou a presença dos parasitos em aspirados esplênicos de uma criança que apresentava febre irregular. Rogers, em 1904, foi o primeiro a cultivar o parasita em sangue citratado a 22°C e observou que nas culturas o parasita se apresentava na forma flagelada. Nicolle e colaboradores encontraram parasitos em cães no ano de 1908, na Tunísia, sugerindo o papel destes animais como reservatórios. Apenas no ano de 1931 é que os flebotomíneos foram incriminados como vetores, onde a transmissão da doença ficou conhecida através de xenodiagnóstico em hamsters (MICHALICK e GENARO, 2005).

No Brasil em 1934, Henrique Penna relatou os primeiros caso da infecção no país a partir de lâminas histológicas de fígado examinadas *post mortem* para diagnóstico de febre amarela (LAINSON et al., 1986; GENARO, 2000; RANGEL e LAINSON, 2003). Evandro Chagas estudando a epidemiologia da doença suspeitou que o mosquito responsável pela transmissão aos humanos fosse o flebotomíneo *L. longipalpis* devido sua constante presença ao redor e no interior das residências de pacientes doentes (CHAGAS, 1936; RANGEL e LAINSON, 2003).

Em 1953, após um surto em humanos com LV no Ceará, os pesquisadores Leônidas Deane, Maria Deane e Joaquim Eduardo de Alencar realizaram uma investigação epidemiológica da doença e verificaram infecção natural em raposas *Lycalopex vetulus* (RANGEL e LAINSON, 2003). Lainson e colaboradores em 1969, na Amazônia, relataram a infecção em *Cerdocyon thous*.

## 2.2 Epidemiologia

Dos 500.000 novos casos anuais em humanos no mundo, estima-se que 90% ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão com estimativas de mais de 50.000 mortes. O número crescente dos casos está relacionado principalmente ao deslocamento das populações, exposição da população não imunizada, fatores econômicos e sociais, má-nutrição e co-infecção de pessoas com HIV (WHO, 2007).

### 2.2.1 Distribuição

A LV tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, neste último continente também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical (MISSAWA e LIMA, 2006). Nas Américas, a LV ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, Nicarágua, México, El Salvador e Brasil (MELO, 2004).

No Brasil a LV, que anteriormente era restrita às áreas rurais do Nordeste brasileiro, avançou para outras regiões consideradas livres da doença alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos (GONTIJO e MELO, 2004; LAZARI, 2007). Atualmente está distribuída em 21 unidades da federação (MS, portal da saúde) envolvendo além do Nordeste outras regiões como Norte, Centro-Oeste e Sudeste, com a prevalência influenciada por aspectos geográficos, climáticos e sociais (LAZARI, 2007).

Na Itália, foi observada 18% de prevalência em raposas (*Vulpes vulpes*) (MANCIANTI et al., 1994). Curi et al., (2006) perceberam que a prevalência foi mais elevada nas raposas quando comparadas aos cães usando os mesmos testes diagnósticos para as duas espécies.

Batista (2008) observou prevalência de 5,02% para o município de Caicó-RN e 8,5% para cães enviados ao CCZ no mesmo período. Troncarelli et al., (2009) obtiveram prevalência de 65% em cães no CCZ de Bauru-SP.

### 2.2.2 Etiologia

As espécies de parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral estão divididas

mundialmente em três gêneros: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e a *Leishmania (Leishmania) infantum*. A *L. infantum* e a *L. donovani* são os agentes causadores da doença nas áreas do mar Mediterrâneo e do Oriente Médio (FRASER, 2008) e a *L. chagasi* é responsável pela forma clínica da leishmaniose visceral nas Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil (FERREIRA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005).

### 2.2.2.1 Classificação Taxonômica

A posição sistemática da espécie *Leishmania chagasi* segundo Kreutzer et al., (1987):

Reino: Protista (Haekel,1886)

Subreino: Protozoa (Goldfuss,1817)

Filo: Sarcostigophora (Honiberg e Balamuth,1963)

Subfilo: Mastigophora (Diesing,1866)

Classe:Zoomastigophora (Calkins,1909)

Ordem: Kinetoplastida (VickKerman,1976)

Subordem: Trypanosomatina (Kent,1880)

Família: Trypanosomatidae ( Grobben,1905)

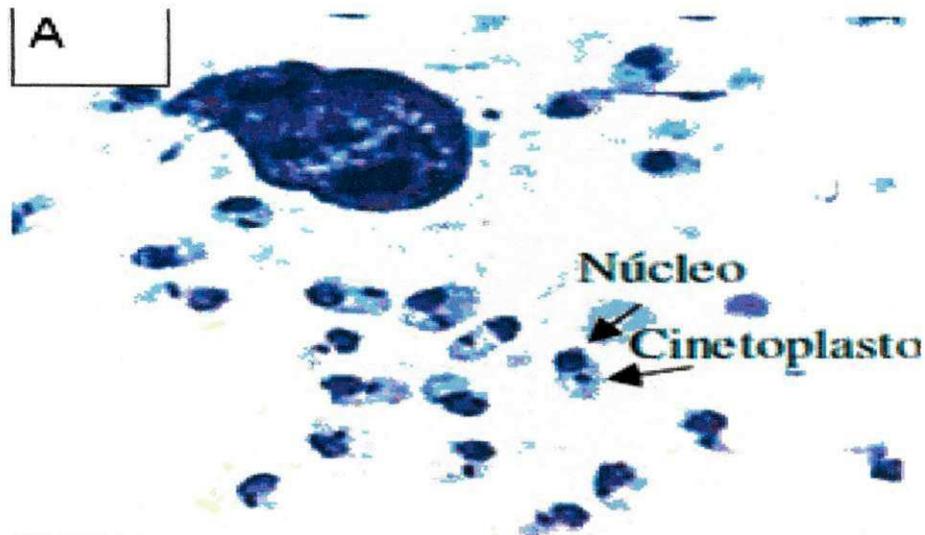
Gênero: *Leishmania* (Ross,1903) Subgênero: *Leishmania* (Saf'Janova1982)

Espécie: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas,1937)

### 2.2.2.2 Morfologia do Parasito

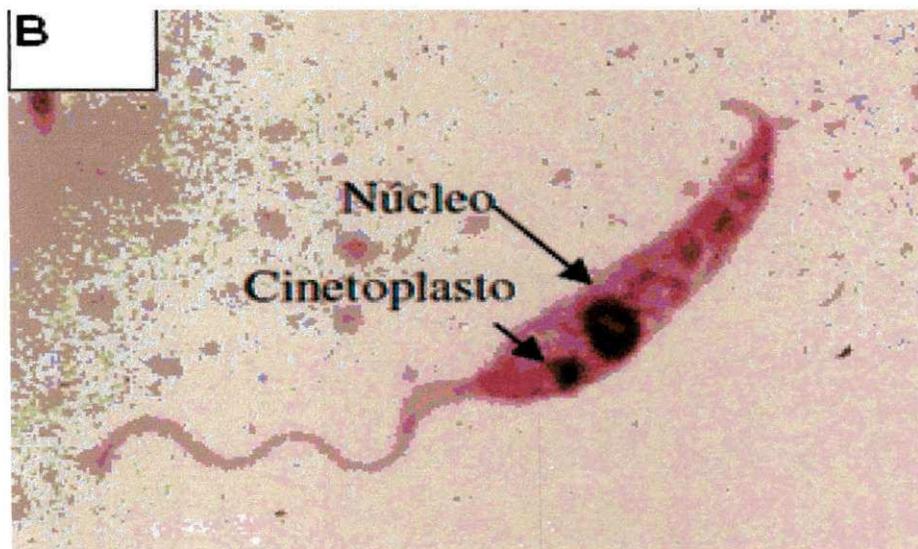
A *Leishmania chagasi* apresenta semelhanças morfológicas com as diversas espécies existentes. A forma aflagelada ou amastigota (Figura 1) está presente nos tecidos dos vertebrados, especialmente em macrófagos, medindo 3,7 x 2,1 µm. É arredondada ou ovóide com núcleo grande, oval e excêntrico sem flagelos; junto ao núcleo encontra-se uma estrutura denominada cinetoplasto (extensão da mitocôndria), rica em DNA mitocondrial, o kDNA. Nos canídeos (cães e raposas), estes protozoários são encontrados em grande quantidade na pele. A forma flagelada ou promastigota (Figura 2), observada em cultura de células e no hospedeiro invertebrado, é alongada, com cinetoplasto

localizado na extremidade do flagelo. O núcleo é central, formado de feixes paralelos de microtúbulos, envoltos em uma bainha citoplasmática (FERREIRA et al., 2003; BASANO e CAMARGO, 2004; AHID, 2009).



**Figura 1** - Formas amastigotas ou aflageladas do parasito. As setas estão indicando o núcleo e cinetoplasto.

Fonte: <http://www.med.unimarburg.de/stpg/ukm/lt/hygiene/schwarz/projects.html>.



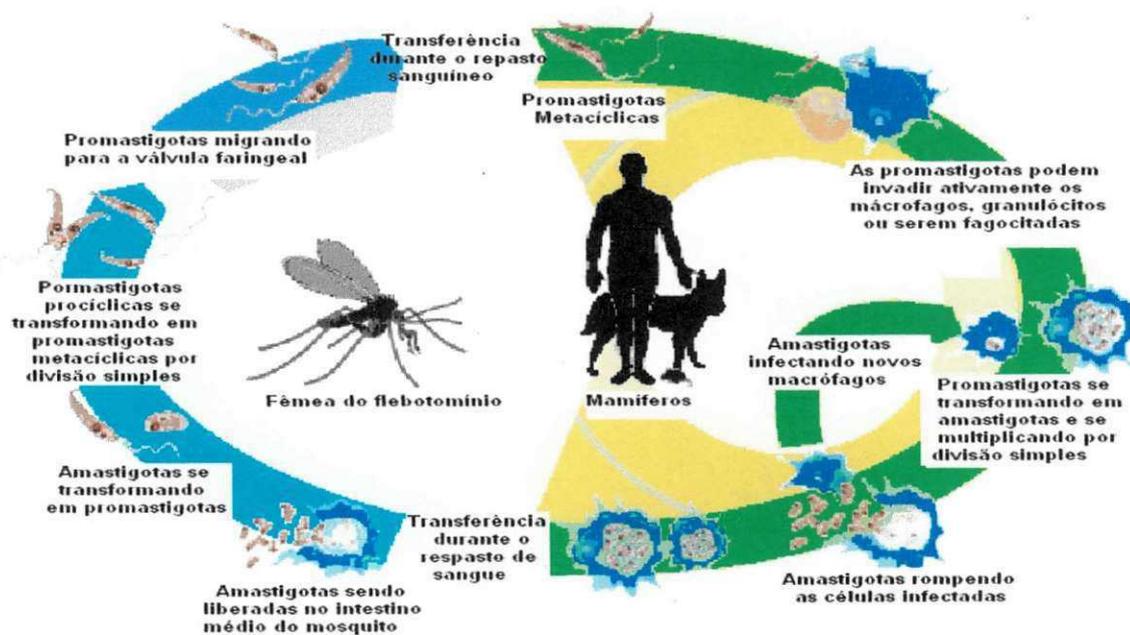
**Figura 2** - Forma promastigota ou flagelada do parasito. As setas apontam para o núcleo e o cinetoplasto.

Fonte: <http://www.vet.upenn.edu/schoolresources/communications/publications/bellwether/48/fxhounds.html>.

### 2.2.2.3 Ciclo Biológico

De acordo com Rey (2001), a forma infectante para os hospedeiros vertebrados são os promastigotas metacíclicos, que se alojam no intestino anterior e faringe do flebotomíneo fêmea. Os promastigotas metacíclicos são transmitidos aos hospedeiros durante o repasto sanguíneo e se dirigem para os órgãos linfóides secundários, principalmente no fígado, baço, medula óssea e linfonodos, infectando células do sistema fagocítico mononuclear, como monócitos, histiócitos e macrófagos, onde se transformam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam por fissão binária até romperem a célula hospedeira, disseminam-se pelas vias hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos.

Um flebotomíneo não infectado adquire o parasito ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, através da ingestão de amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo (BASANO e CAMARGO, 2004; SILVA, 2008). As formas intracelulares são liberadas no trato digestivo do inseto, que se diferenciam para formas promastigotas procíclicas, multiplicando-se por divisão binária. Estas formas procíclicas diferenciam-se para formas infectivas metacíclicas e migram então para a probóscide do inseto, de onde poderão infectar um novo hospedeiro mamífero (SILVA, 2008) (Figura 3).



**Figura 3** - Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.

Fonte adaptado de : [http://commons.wikimedia.org/wiki/Template:Other\\_versions/Leishmaniasis\\_life\\_cycle\\_diagram](http://commons.wikimedia.org/wiki/Template:Other_versions/Leishmaniasis_life_cycle_diagram)

### 2.2.3 Vetor e Transmissão

As várias formas da doença são transmitidas de animais silvestres ou domésticos para o homem por intermédio da picada de mosquitos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

A *Lutzomyia longipalpis* (Figura 4), presente nos países da América Latina (exceto no Chile), é considerado o principal vetor da *L. chagasi*. Estes mosquitos são dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, conhecidas genericamente por flebotomíneos (GONTIJO e MELO, 2004).



**Figura 4** - O vetor (*Lutzomyia longipalpis*) responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral na América Latina.

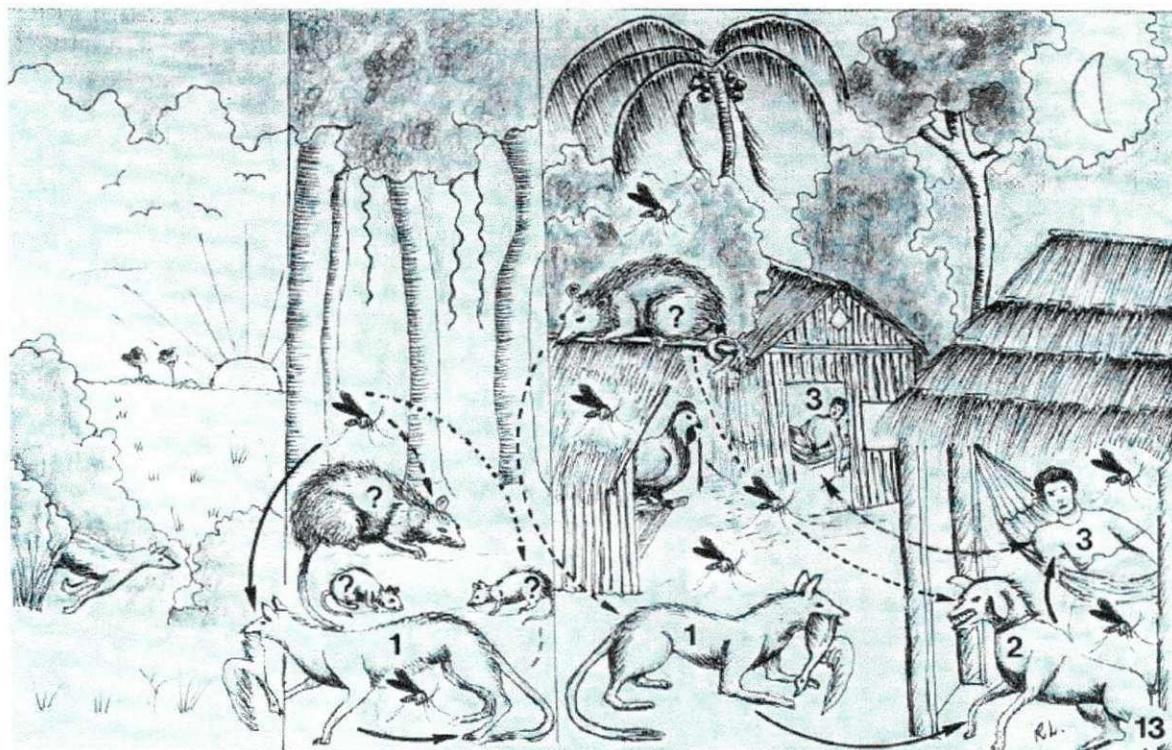
Fonte: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lutzomyia\\_longipalpis-sandfly.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lutzomyia_longipalpis-sandfly.jpg)

Os flebotomos são pequenos mosquitos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Têm como característica o vôo saltitante e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso, ao contrário dos outros dípteros. Geralmente é de cor parda (“mosquito palha”), sendo que as fêmeas é que são responsáveis pela transmissão pelo fato do aparelho bucal estar adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

Nas regiões Norte e Nordeste, a *L. longipalpis* progressivamente foi deixando de habitar apenas as matas e se adaptando ao ambiente rural, fato este somado também à presença de animais silvestres e sinantrópicos nestas áreas rurais. Recentemente, verificou-

se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, podendo ser encontrados no peridomicílio, abrigos de animais domésticos, intradomicílio e entre outros ambientes, apresentando atividade crepuscular e noturna (MS, 2006).

A transmissão peridoméstica das raposas para pessoas e/ou cães através dos flebotomos pode ocorrer quando os canídeos silvestres entram nas cidades a procura de alimento ou quando os cães domésticos invadem extensas áreas desmatadas ao redor das cidades (DIPINETO, 2007). A figura 5 demonstra o ciclo epidemiológico da LV mostrando a relação da transmissão entre animais silvestres, domésticos e o homem através do mosquito *L. longipalpis*.



**Figura 5** - Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Estado do Pará: 1. o parasita se mantém no ciclo enzoótico silvestre em raposas e possivelmente em outros animais por uma população silvestre do flebotomo *Lutzomyia longipalpis*; 2,3. A invasão pelo vetor das moradias localizadas na proximidade da floresta estabelece a infecção no cão e no homem. Linhas contínuas indicam a rota de transmissão definida e as linhas descontínuas representam uma possível transmissão entre outros animais silvestres, e provavelmente o homem também serve de fonte de infecção para o flebotomo (Modificado de Lainson, 1989).

Apesar da transmissão por flebotomíneos ser a mais importante na epidemiologia da leishmaniose, a participação de outros vetores tem sido avaliada.

Cerqueira et al., (2000) observaram em raposas espécies de pulgas que infestam humanos e outros mamíferos sugerindo a existência de uma possível conexão ecoepidemiológica do hospedeiro silvestre para *Leishmania chagasi* com o ambiente doméstico através do ectoparasito.

Macerado de carrapatos e pulgas provenientes de cães positivos foi capaz de infectar hamsters por via oral e inoculação intraperitoneal. Apesar da possibilidade da infecção experimental, o fato não comprova a viabilidade destes ectoparasitos como vetores uma vez que formas promastigotas não foram evidenciadas nos esfregados de sangue do macerado (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO e LINARDI, 2007).

Outro meio de transmissão da doença foi descrita por Shaw (2007) que relatou casos de humanos com LV onde os fatores indicaram que a transmissão da doença possivelmente tenha ocorrido após a transfusão sanguínea.

#### **2.2.4 Reservatórios**

A *Leishmania (Leishmania) chagasi* têm a capacidade de infectar e produzir doença em canídeos sejam eles domésticos ou silvestres (CABRERA, 1999), principalmente cães (*Canis lupus familiaris*) e raposas (Figura 6), onde são considerados os principais reservatórios da doença (MELO, 2004). Diversos grupos de animais silvestres além dos canídeos como felinos, roedores e marsupiais também já foram incriminados como reservatórios da leishmaniose visceral (LUPPI et al., 2008; NOÉ, 2008).

Na década de 50, L. Deane, M. Deane e Alencar, estudando o calazar no Ceará, estabeleceram a importância do cão doméstico e a raposa como fonte de infecção e manutenção da leishmaniose visceral (MICHALICK e GENARO, 2005; RANGEL e LAINSON, 2003). Porém Courtenay et al., (2002) em seus trabalhos afirmou que embora confirmada a alta estimativa da infecção por exames parasitológicos de raposas com LV, a contribuição destas espécies na transmissão por canídeos foi muito baixa (9%) se comparada aos cães (91%).



**Figura 6** - Raposa *Cerdocyon thous*

O avanço da agricultura e da pecuária próximo às áreas naturais proporcionou um contato entre as populações humanas e de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus habitats. Este estreito contato facilitou a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes, estabelecendo-se assim novas relações entre hospedeiros e parasitas, e novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão das doenças (CORRÊA e PASSOS, 2001).

A importância dos animais sinantrópicos para a LV se deve ao fato de viverem em ambiente florestal e circularem em habitações humanas podendo ter relação entre a transmissão silvestre, peridomiciliar e domiciliar do parasito (CABRERA et al., 2003).

De acordo com Silva (2004), muitos animais silvestres da fauna brasileira estão vivendo ou no seu habitat natural (vida silvestre) ou em cativeiros como parques zoológicos (zôos), criadouros conservacionistas, científicos ou comerciais, institutos de pesquisa, centros de triagem e reabilitação, ou em residências de munícipes (criados ilegalmente como animais de estimação).

Após um estudo comparativo dos crânios e da morfologia dental de exemplares de raposas, a *Cerdocyon thous* foi considerada como sendo a única espécie de canídeo neotropical, além dos cães, que podem comprovadamente se infectar com a *L. chagasi* supondo que, provavelmente, Deane e Deane identificaram a *Cerdocyon thous* como sendo *Lycalopex vetulus*. (COURTENAY et al., 1996).

Com relação à nomenclatura científica das raposas do Nordeste Júnior et al., (2002) classificaram-nas como *Cerdocyon thous* baseando-se na distribuição geográfica, como mostra a Figura 7, e pelas características físicas desta espécie.



**Figura 7** - A área em verde indica a distribuição geográfica da espécie *Cerdocyon thous* no Brasil.

Fonte: Júnior et al (2002).

Em áreas onde as leishmanioses enzoóticas são descritas, a *L. chagasi* se apresenta circulando entre raposas (CABRERA, 2003). Individualmente, uma raposa é fonte de infecção tão eficiente quanto o cão, onde serve como fator de disseminação da doença para regiões afastadas das áreas endêmicas (REY, 2001), principalmente pela doença se apresentar na forma assintomática (LAINSON et al., 1990).

O significado das raposas como reservatórios da LV dependerá de sua capacidade de transmitir a infecção com sucesso aos flebótomos ou da sua possibilidade de reintroduzir o patógeno nas populações caninas livres da doença (COURTENAY, 2002). Lainson et al., (1990) infectaram uma com raposa *Leishmania (L.) chagasi* por intermédio da picada flebótomos infectados de cães doentes indicando a alta susceptibilidade deste hospedeiro.

Segundo o Ministério da Saúde (2003) na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. Genaro (2000) relata que os cães têm sido encontrados infectados em todos os focos da doença humana, sendo considerado o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral.

Não há predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção canina (GONTIJO e MELO, 2004; CABRERA et al., 2003; NAVEDA et al., 2006 e ALMEIDA et al., 2009). Batista (2008) e França-Silva (1997) relataram uma maior probabilidade em animais com pelo curto Naveda et al., (2006) verificaram uma maior frequência em animais de 1 a 3,9 anos.

Cabrera et al., (2003) relataram que cães que habitavam próximo a matas estavam mais sujeitos à infecção comparados aos que moravam a 100 metros de distância.

### **2.3 Manifestações Clínicas**

As manifestações clínicas da doença nos cães podem variar consideravelmente, dependendo da interação da espécie do parasita, da resposta de cada hospedeiro e da fase atual da doença (LANOTTE et al., 1979).

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral (LV) surgem progressivamente e as lesões cutâneas podem estar presentes em combinação com a doença visceral (LACHAUD et al., 2002). Nos cães, os sinais clínicos mais frequentes na avaliação feita por Almeida et al., (2005) foram o emagrecimento, úlceras de pele, seguido de onicogribose, conjuntivite, descamação, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. Outras manifestações podem estar incluídas como diarreia, envolvimento articular, fraqueza, redução das atividades, anorexia, anemia, linfadenopatia local ou generalizada, atrofia muscular e falência renal onde normalmente esta é a principal causa de morte de cães infectados (Pumarola et al., 1991; Solano-Gallego et al., 2001).

Apesar da grande diversidade de manifestações clínicas, existem animais que apresentam sinais leves (oligossintomáticos) ou se encontram aparentemente saudáveis (assintomáticos) (MS, 2006). Aproximadamente 50% a 60% dos cães infectados são assintomáticos, o que sugere a existência de animais resistentes ou com infecção recente na população. Cães infectados, mesmo assintomáticos, podem apresentar grande quantidade de parasitos na pele (HERMONT, 2008). Estes animais permanecem com a doença

cl clinicamente inaparente por longos períodos (TESH, 1995) favorecendo ainda mais a infecção do vetor.

Deane e Deane, descrevendo a doença nas raposas, observaram que alguns animais infectados tinham aparência saudável, mas que outras mostravam os mesmos sinais que são relatados nos cães com a infecção (MICHALICK e GENARO, 2005). Alterações clínicas foram descritas por Courtenay (2002) em uma raposa infectada que tinha sinais da doença caracterizada por leve aumento no linfonodo poplíteo, onicogribose e algumas áreas de dermatite e por Bonamigo e Oliveira (2009) que além destas manifestações relataram lesões no pavilhão auricular, úlcera de córnea com secreção ocular purulenta, hepatomegalia e esplenomegalia.

## **2.4 Diagnóstico**

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade ao mesmo tempo (GONTIJO e MELO, 2004).

O diagnóstico definitivo da doença depende da demonstração do parasito em tecidos ou do isolamento do organismo através de cultura (CAMARGO-NEVES e SANTUCCI, 2000-2001).

### **2.4.1 Diagnóstico Clínico**

O diagnóstico clínico da LV é difícil de ser realizado devido à variedade de sinais que a doença pode apresentar que podem ser confundidas com outras enfermidades e por isso deve-se incluir outros exames para confirmação da doença (DEANE, 1938; SUNDAR e RAI, 2002; GONTIJO e MELO, 2004).

### **2.4.2 Diagnóstico Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial é baseado em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (NOGUEIRA et al., 2009).

#### 2.4.2.1 Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos estão relacionados com a demonstração do parasito em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. Podem realizar o isolamento do parasito em cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirado de tecidos em meio bifásico, Novy-Mac-Neal-Nicole (NNN) obtendo-se crescimento de formas promastigotas (SUNDAR e RAI, 2002; ALMEIDA, 2009;). A taxa de positividade ao exame direto de aspirado medular avaliado em canídeos silvestres foi de 8,06% (BONAMIGO e OLIVEIRA, 2009) e 26% em cultura do parasito em trabalhos com *Cerdocyon thous* (COURTENAY et al., 2002).

O cultivo de aspirado de baço é mais eficiente (95%) na detecção do parasito do que quando a cultura é feita com amostras de medula óssea (54 a 86%) ou linfonodo (64%) (SIDDIG et al., 1988).

#### 2.4.2.2 Métodos sorológicos

Essas técnicas são utilizadas no diagnóstico da leishmaniose visceral visando detectar anticorpos específicos ao parasita. Em geral, os métodos mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste de aglutinação direta (DAT) e o Western Blot por apresentarem sensibilidade e especificidade que podem variar entre 80 e 100% (HERMONT, 2008).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina, relatados por Gontijo e Melo (2004), são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), este último se mostra como um teste rápido, de fácil execução e leitura, e ainda mais sensível e específico que a RIFI (ALMEIDA et al., 2005; FERREIRA et al., 2007).

É importante ressaltar que, geralmente, nos estágios iniciais da doença os cães são soronegativos, portanto, deve-se estar atento quando exames sorológicos forem utilizados no diagnóstico da doença (HERMONT, 2008).

#### 2.4.2.3 Métodos moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica que tem sido utilizada com

finalidades de diagnóstico, monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos e tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasito. O diagnóstico é baseado na amplificação *in vitro* de sequência de DNA mitocondrial do parasita (GOMES, 2008; HERMONT, 2008).

A concentração de uma solução de DNA pode ser precisamente medida pela espectrometria de absorvância de ultravioleta (UV). A quantidade de radiação UV absorvida por uma solução de DNA é diretamente proporcional à quantidade de DNA da amostra. A absorvância é medida a 260 nm e, nesse comprimento de onda, uma absorvância ( $A_{260}$ ) de 1.0 corresponde a 50  $\mu$ g de DNA de fita dupla por mL (BROWN, 2003). A pureza do ácido nucléico extraído é obtida baseada na relação entre a absorvância de proteína e do DNA ( $A_{260}/A_{280}$ ). As preparações puras de DNA e RNA após a extração devem ter uma absorvância esperada  $>1.8$  e  $>2.0$ , respectivamente, onde valores abaixo de 1.8, podem ser indicativo da presença de proteínas nas amostras, como validado por Glasel (1995).

O DNA pode ser extraído por diversas técnicas como kits comerciais, sílica, isopropanol a partir de amostras de sangue, punção de linfonodo e medula óssea, e tecidos como pele, baço e swab conjuntival (SOLANO-GALEGO et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; COURTENAY et al., 2002; ANDRADE et al., 2006; DIPINETO, 2007; FERREIRA et al., 2008; NÓBREGA et al., 2009).

A sensibilidade e especificidade do teste podem variar de acordo o tecido utilizado. Nunes et al., (2007) analisando amostras de sangue revelou uma sensibilidade de 55% e especificidade de 66,3%; Troncarelli (2009) encontrou uma sensibilidade de 85,1% e 85,7% de especificidade em amostras de fígado e 88,1% de sensibilidade e 90,2% de especificidade para o baço.

## 2.5 Tratamento

De acordo com o MS (2006), o tratamento de cães não é uma medida recomendada, porque a terapia pode proporcionar o desaparecimento dos sintomas, mas os animais continuam portadores da doença, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotômios e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano.

A portaria interministerial nº 1.426 de 11 de Julho de 2008, proíbe o tratamento de

leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A portaria foi criada levando-se em consideração as normas do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Ministério da Saúde.

## **2.6 Medidas de Controle**

O controle da leishmaniose visceral tem como objetivo principal interromper a cadeia de transmissão da doença em uma população (HERMONT, 2008). Um maior conhecimento científico sobre o papel específico de cada elemento da cadeia de transmissão (agente etiológico, vetor, o ser humano e os reservatórios silvestres e domésticos) representa um dos maiores desafios para o aprimoramento das estratégias de controle. As medidas de controle usualmente empregadas não tem apresentado efetividade suficiente para redução da prevalência, ainda que importantes avanços tenham sido alcançados na redução da letalidade (FUNASA, 2002).

Para Rey (2001) o controle desta doença deve ser baseado no conhecimento prévio das condições epidemiológicas de cada região para que se possa elaborar um plano que se enquadre a cada ecossistema e aos recursos disponíveis.

O Ministério da Saúde (2006) recomenda o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, diagnóstico e sacrifício dos animais soropositivos, a identificação e eliminação do vetor e a educação em saúde da população como medidas de controle da doença.

Todo caso humano suspeito deve ser submetido à investigação clínica, epidemiológica e aos métodos auxiliares de diagnóstico. Caso seja confirmado, inicia-se o tratamento segundo procedimentos terapêuticos padronizados fazendo o acompanhamento dos pacientes mensalmente para avaliação da cura clínica.

A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo.

Para a realização da eutanásia, deve-se ter como base a Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

O destino dos cadáveres destes animais deverão obedecer ao previsto na Resolução RDC n.º 33, de 25 de fevereiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que

segundo essa resolução, os cadáveres de animais errantes ou domésticos são considerados do Grupo D (resíduos comuns) que por suas características, não necessitam de procedimentos diferenciados. O destino dos cadáveres destes animais poderão ser valas comuns de aterros sanitários.

O controle químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual é a medida de controle vetorial recomendada no âmbito da proteção coletiva. Esta medida é dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana e canina conseqüentemente, diminuindo o risco de transmissão da doença.

Devem se realizar atividades de educação em saúde, visando a participação ativa da comunidade e com isso obtenham informações sobre o atendimento precoce das pessoas com diagnóstico positivo da doença, bem como contribua, de forma participativa, para as medidas de controle da doença (manejo ambiental, controle vetorial, controle do reservatório entre outras).

## **2.7 Medidas de Prevenção**

O Ministério da Saúde (2006) afirma que os programas preventivos são voltados para população humana, para o vetor e para a população canina.

Com relação aos humanos, as medidas mais comuns para evitar os riscos de transmissão se baseiam no uso de mosquiteiros impregnados com inseticida, uso de repelentes, telas nas janelas e portas e evitar exposição aos horários de atividade do vetor nos locais em que são descritos a presença destes insetos.

O combate ao vetor não é um método fácil, se realizado apenas pelo controle químico, por isso torna-se necessário a limpeza de quintais, terrenos e praças públicas para possivelmente evitar condições que favoreçam o desenvolvimento de criadouros de formas imaturas do vetor.

A captura de cães errantes é essencial, especialmente em áreas urbanas, por ser fonte disseminadora de diversas doenças de importância médico-sanitária, entre elas a LV. No caso das doações de cães, é recomendado a realização de exames sorológicos antes da doação destes animais, principalmente em áreas de transmissão da LV. Outro fator importante a ser considerado é o uso de telas em canis individuais ou coletivos nos canis

domiciliares, de clínicas veterinárias, *pets shops*, abrigos de animais, hospitais veterinários e com isso prevenir a entrada dos insetos vetores da doença.

Os resultados obtidos por Camargo-Neves et al., (2004) demonstraram uma redução da prevalência em cães com o uso de coleiras impregnadas com deltametrina.

Dois laboratórios estão comercializando no Brasil, as vacinas contra a leishmaniose visceral canina, a Fort Dodge Saúde Animal (Leishmune<sup>®</sup>) e Hertape Calier Saúde Animal (Leish-Tec<sup>®</sup>), ambas registradas no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento - MAPA (MS, 2009). A Leishmune<sup>®</sup> é uma vacina composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante da fucose-manose (FML) de *Leishmania donovani* utilizando como adjuvante a saponina (RIBEIRO, 2003) enquanto que a Leish-Tec<sup>®</sup> é composta pela proteína recombinante A2 com adjuvante a base de saponina (HERMONT, 2008).

Apesar de serem autorizadas pelo MAPA, o Ministério da Saúde não recomenda a utilização destas vacinas por entender que ainda não terem realizado o estudo de fase 3, isto é, avaliação em campo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

A cidade de João Pessoa está localizada na Mesorregião da Mata Paraibana, Microrregião de João Pessoa, situada entre as coordenadas de 07°06'54" de latitude e 34°51'47" de longitude e a uma altitude de 47,5 metros acima do nível do Oceano Atlântico (IBGE, 2005). Seus Limites são com os municípios de Bayeux (6 km), Alhandra (36 km), Conde (16 km), Cabedelo (18 km) e Santa Rita (12 km).

A população é composta por cerca de 702.235 habitantes em uma área de 211 km<sup>2</sup> (IBGE 2009) e a população estimada de cães é de 65.000 animais.

O clima é quente, com mínimas de 20° e máximas de 31°. A umidade relativa do ar é sempre elevada, nunca inferior aos 74%. O inverno tem seu início normalmente em março, prolongando-se até agosto. A vegetação é do tipo Mata Latifoliada Perenifólia Costeira (Mata Atlântica) recoberta por vastas áreas de florestas em torno da cidade. A Mata Atlântica abriga muitas espécies de animais silvestres, dentre eles a raposa que notadamente visitam as áreas peridomiciliares na busca de alimentação.

#### 3.2 Populações estudadas

##### 3.2.1 Raposas (*Cerdocyon thous*)

Do total de treze amostras coletadas desta espécie no período de setembro de 2007 a fevereiro de 2010, nove (9) foram de animais que deram entrada no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-IBAMA/PB) e quatro (4) do Parque Zoobotânico Arruda Câmara/JP.

Sangue de todos os animais foi coletado sem adição de anticoagulante para separação do soro e com anticoagulante (20 µL de heparina sódica 5.000 U.I./mL para 5 mL de sangue) para servir de fonte de DNA para a PCR.

Dos animais provenientes do CETAS-IBAMA/PB, foi retirado um fragmento de orelha para extração de DNA para a PCR. Não foram coletados fragmentos de orelha dos animais do Parque Zoobotânico Arruda Câmara pelo fato de serem animais de exposição. As quatro raposas do zoológico foram reavaliadas sorologicamente após um ano da

primeira coleta.

Para coleta de sangue venoso, inicialmente foi realizada a contenção física dos animais pelos tratadores através dos puçás e das luvas de raspa de couro. Após a imobilização física promovia-se a contenção química com cloridrato de cetamina + xilazina + diazepam (10 mg/kg a 5% + 2 mg/kg a 10% + 1 mg/kg a 1% IM - Intra Muscular) garantindo uma sedação mais segura no manuseio com as raposas. A assepsia da região a ser puncionada foi realizada com algodão embebido com iodopovidina e o sangue venoso coletado da veia céfalica ou da veia safena. Quando necessária, a coleta de sangue foi realizada na veia jugular após a tricotomia e assepsia do local.

As amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e refrigerados a -20°C até a realização dos ensaios.

As raposas também foram avaliadas quanto à presença de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral.

### 3.2.2 Cães (*Canis lupus familiares*)

O total de 117 cães deu entrada no Centro de Controle de Zoonoses de João Pessoa/PB nos meses de janeiro e fevereiro de 2010.

Sangue e linfonodo poplíteo foram coletados de todos os animais eutanasiados independente de suas características físicas e idade. Os animais eram encaminhados ao CCZ por diferentes motivos: sorologia positiva para LV, sinais sugestivos de LV, cães deixados no CCZ pelos proprietários, animais com patologias diversas e capturados na rua.

A coleta de sangue venoso também foi realizada por punção da veia céfalica ou da veia safena, após a contenção física do animal através do uso do cambão.

O soro foi obtido por centrifugação do sangue sem anticoagulante a 3.000 rotações por 10 minutos no laboratório na própria sede no CCZ. Para obtenção de sangue total foram adicionados 20 µL de heparina sódica (5.000 U.I./mL). As amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e refrigerados a -20°C até a realização dos testes.

Após a coleta de sangue venoso, os cães foram sacrificados por aprofundamento anestésico com Pentobarbital (40 g) sódico e Difenilhidantoína sódica (5 g) <sup>1</sup> na dose indicada para cães (1mL para cada 5kg de Peso vivo por via endovenosa ou intracardiaca),

---

<sup>1</sup> Euthanyle®

proporcionando uma eutanásia rápida cerca de 15 segundos e aparentemente indolor. Os fragmentos de linfonodo poplíteo foram obtidos durante a necropsia e acondicionados em tubos de 1,5 mL e armazenadas a -20°C até a realização dos testes. As carcaças foram descartadas no aterro sanitário local.

Para todos os animais foi preenchida uma ficha individual com os seguintes dados: nº da ficha, endereço, raça do animal, idade, pelagem, sinais clínicos (presença ou ausência), sexo, procedência e resultado do ensaio.

### **3.3 Local de execução**

Todas as amostras foram transportadas em caixa térmica contendo gelo até o Laboratório de Biologia Molecular do Semi-árido do CSTR/Patos-PB, onde foram realizados todos os testes.

### **3.4 Ensaaios**

#### **3.4.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

Todas as amostras de ambas as espécies foram sorologicamente testadas através do ELISA/S7 recombinante<sup>2</sup> quanto a pesquisa de anticorpos específicos para *L. chagasi*.

As raposas que não reagiram ao teste foram tatuadas e soltas em áreas supervisionadas pelo IBAMA.

##### **3.4.1.1 Protocolo da reação**

##### **Sensibilização e neutralização da placa**

1. A sensibilização foi feita com a distribuição de 100 µL do antígeno (solução S7) por poço na placa. A placa era incubada *overnight* a 4° C em geladeira ou por 4 horas em temperatura ambiente (T.A.).
2. Depois do período de incubação a solução S7 foi desprezada, e em seguida a placa

---

<sup>2</sup> Biogene Ind. & Com. LTDA®

lavada com tampão PBST (solução de lavagem fornecida pelo kit e adicionada de 0,05 % de tween 20) por três vezes.

3. Realizada a lavagem, a placa foi bloqueada com 100  $\mu$ L por poço de uma solução composta de PBST + 2% de leite em pó desnatado e posterior incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo a solução foi desprezada e a placa lavada duas vezes com PBST.

### **Diluição dos soros**

1. Todos os soros caninos foram diluídos 1:100 em solução de coleta. Os soros das raposas foram diluídos nas concentrações (1:40, 1:50 e 1:100); em seguida mantidas por 12 horas na geladeira (4° C) ou por 4 horas em T.A.
2. Os soros utilizados como controles negativo e positivo foram fornecidos pelo kit.

### **Realização do teste**

1. A placa bloqueada foi lavada uma vez com o tampão PBST e distribuídos 100  $\mu$ L de soros controles negativos e positivo e a amostra teste, previamente diluídos. Em seguida a placa foi incubada por 30 minutos a T.A.
2. Após a incubação a placa foi lavada por três vezes com PBST.
3. O conjugado (Proteína A-Peroxidase) preparado no momento do uso foi diluído 1:10000 em PBST. Foram distribuídos 100  $\mu$ L em cada poço e novamente incubado em T.A por mais 30 minutos.
4. O conjugado foi desprezado e a placa lavada por 3 vezes com PBS (tampão fosfato).
5. A solução de revelação para cada placa foi composta de 10 mL de tampão citrato (pH 5.5) + 100  $\mu$ L de TMB (tetrametilbenzidina) e 50  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio. O volume de 100  $\mu$ L foi distribuído por poço.
6. Após 20 minutos em T.A., acrescentou-se duas (2) gotas da solução de parada ( $H_2SO_4$  2N).
7. A leitura foi efetuada em leitor de ELISA a  $\lambda = 450$  nm e os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (DO).
8. O ponto de corte (cut off) para o ELISA foi determinado para cada placa a partir da

média dos valores dos dois (2) soros não reagente (fornecidos com o kit) somada a um fator de correção ( $R= 0,142$ ).

9. A amplitude da zona cinza foi determinada pela subtração de **0,03** do ponto de corte.

### 3.4.2 Extração de DNA

As amostras de sangue total foram submetidas à extração de DNA seguindo as técnicas do isopropanol (AUSUBEL et al., 2002), sílica (descrita pelo *Australian Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation/CSIRO*, Austrália) e por kit comercial<sup>3</sup> de acordo com o protocolos descritos abaixo:

#### Kit comercial

Inicialmente o material foi transferido para um tubo de reação de 1,5 mL e adicionado 400 µL de tampão de lise G e 40 µL de proteinase K e depois feita agitação do tubo em vortex. Para promover a lise completa do tecido os tubos foram incubados em banho-maria a 52° C em constante agitação.

1. Após a lise as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rotações por minuto (rpm) e o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. Para evitar rastros de RNA nas amostras durante a PCR, foram adicionados 40 µL de RNase A (10 mg/mL) agitando em vortex e em seguida incubando por 5 minutos em T.A.
2. Posteriormente, acrescentou-se 200 µL de tampão de lise T e o tubo foi agitado em vortex por 10 segundos. O conteúdo foi transferido para uma coluna e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. Após centrifugação, o filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor.
3. A lavagem do DNA foi feita duas vezes pela adição de 550 µL de tampão de lavagem e centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto.
4. A eluição do DNA foi feita com 200 µL de tampão D (previamente aquecido a 52° C) e em seguida centrifugado por 2 minutos a 9.500 rpm. O DNA foi armazenado por 3 minutos em T.A.

---

<sup>3</sup> Invisorb Spin Blood Mini Kit®

### **Técnica de extração pela sílica**

1. Células provenientes da centrifugação de 50  $\mu$ L de sangue foram lavadas 2 vezes com 1 mL de PBS 1x pH 7.4. Em seguida, adicionou 200  $\mu$ L de tampão de lise (100 mM TrisHCl pH 8, 5 mM de EDTA pH 8, 200 mM de NaCl e 2% SDS) e 4  $\mu$ L de proteinase K (do estoque 10 mg/mL).
2. O material foi incubado em banho-maria à 56°C até sua completa dissolução com posterior acréscimo de 40  $\mu$ L de acetato de potássio e homogenização com vortex ;
3. As amostras foram incubadas em gelo por 4 minutos, centrifugadas e o sobrenadante recolhido para um microtubo de 1,5 mL;
4. Após adicionar 240  $\mu$ L de solução ligadora de DNA (10% w/v de sílica, 3 M de tiocianato de guanidina, pH 6 - 6.5), o tubo foi misturado por inversão durante 5 minutos;
5. A sílica foi peletizada por centrifugação a 14.000 rpm por 2 min e lavada duas vezes com 1 mL de etanol 70% gelado. O tubo era novamente invertido para homogeneizar da sílica e o etanol em todas as lavagens.
6. A eluição do DNA era feita pela distribuição de 200  $\mu$ L de tampão TE (10mM de Tris pH 8.0), homogeneizando o tubo, e centrifugando as amostras por 1 minuto a 8.000 rpm ( $\geq 6000 \times g$ ).
7. O sobrenadante contendo o DNA foi removido para um outro tubo e estocado a -20°C até a realização das dosagens.

### **Técnica de extração pelo isopropanol**

A técnica de extração por isopropanol seguiu o protocolo descrito por Ausubel et al., (2002).

1. Células provenientes da centrifugação de 50  $\mu$ L de sangue foram lavadas 2 vezes com 1 mL de PBS 1x pH 7.4. Em seguida, adicionou 200  $\mu$ L de tampão de lise (100 mM TrisHCl pH 8, 5 mM de EDTA pH 8, 200 mM de NaCl e 2% SDS) e 4  $\mu$ L de proteinase K (do estoque 10 mg/mL).
2. O material foi incubado em banho-maria à 56°C até sua completa dissolução com posterior acréscimo de 40  $\mu$ L de acetato de potássio e homogenização com vortex ;
3. Recolheu-se a fase líquida e transferiu-se para um novo tubo com 210  $\mu$ L de

isopropanol homogeneizando a amostra;

4. Em seguida, a amostra foi centrifugada em máxima rotação descartando o sobrenadante;
5. O pellet de DNA foi lavado 3X com 1 mL de etanol 70% misturando-a por imersão.
6. O tubo é secado por 1 hora em estufa a 37° C e após esse tempo o pellet de DNA é ressuspenso com 200 µL de tampão TE pH 8.0 e estocado a -20°C até a realização das dosagens.

#### **3.4.2.2 Dosagem de DNA**

Logo após a extração, a concentração de DNA (µg/mL) das amostras e o grau de pureza (coeficiente  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) foram verificados em fotômetro<sup>4</sup>.

#### **3.5 Análise estatística**

A análise dos resultados foi realizada por porcentagem simples através do programa Microsoft Office Excel.

---

<sup>4</sup> BioPhotometer plus Eppendorf

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Raposas

#### 4.1.2 Sorologia

As 13 raposas avaliadas neste trabalho apresentavam-se saudáveis, sem nenhum sinal sugestivo de LV ou de qualquer patologia.

O resultado da sorologia das amostras provenientes do CETAS foi negativo em título 1:40. O ponto de corte foi o mesmo calculado para as amostras de cão da mesma placa uma vez que as duas espécies são filogeneticamente relacionadas (ZRZAVY e RICANKOVA, 2004). Como os animais foram soltos após o resultado do exame, não foi possível verificar soro-conversão.

**Tabela 1** - Resultado do ELISA S7, em absorbância, das amostras de raposas do CETAS avaliadas na diluição 1:40 utilizando pontos de corte entre 0,161 a 0,218.

<b>Amostra Nº</b>	<b>Absorbância Diluição (1:40)</b>	<b>Amostra Nº</b>	<b>Absorbância Diluição (1:40)</b>
<b>01</b>	0,144	<b>06</b>	0,035
<b>02</b>	0,065	<b>07</b>	0,042
<b>03</b>	0,101	<b>08</b>	0,164
<b>04</b>	0,023	<b>09</b>	0,115
<b>05</b>	0,081		

As quatro raposas do zoológico Parque Arruda Câmara, por permanecerem em cativeiro, foram avaliadas sorologicamente em dois períodos distintos. O soro foi diluído 1:40 na primeira avaliação e 1:40, 1:50 e 1:100 na segunda. Foi observado que na segunda avaliação, na diluição 1:40, as raposas CN-02 e CN-03 tiveram uma soro-conversão aparente, entretanto, na diluição 1:100, que é a utilizada no diagnóstico canino, as mesmas ainda permaneceram negativas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resultado do ELISA S7, em absorbância, das amostras de raposas provenientes do zoológico, em duas avaliações com pontos de corte entre 0,207 a 0,218.

Amostra/Diluição	1 : 40 (1ª)*	1:40 (2ª)**	1 : 50**	1 : 100**
CN-01	0,063	0,037	0,011	0,005
CN-02	0,082	0,202	0,107	0,050
CN-03	0,064	0,222	0,136	0,087
CN-04	0,076	0,022	0,029	0,015

\*(1ª) Primeira avaliação

\*\* (2ª) Segunda avaliação

O soro das raposas foram diluídos 1:40 porque, teoricamente, vertebrados que mantêm patógenos no ciclo silvestre não devem desenvolver uma resposta imune agressiva contra o mesmo; haveria um balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a sobrevivência do agente para que ambos sobrevivam e o ciclo seja mantido.

Raposas *C. thous* foram encontradas infectadas no Parque Nacional da Serra do Cipó em Minas Gerais (CURI et al., 2006), entretanto, em 2002, Courtenay et al., verificaram que nenhum flebotomíneo ficou infectado após realizar repasto sanguíneo nestas raposas. Isto demonstra que é improvável que está espécie seja um reservatório importante para a introdução de *Leishmania* em áreas livres de leishmaniose visceral canina.

#### 4.1.3 Dosagem de DNA

Durante a realização da PCR vários fatores podem contribuir para a inibição da reação, como a contaminação com proteínas, resíduos de EDTA e altas concentrações do DNA alvo. De acordo com Held (2009), baseado na relação A260/A280, preparações puras de DNA e RNA após a extração devem ter uma absorbância esperada >1,8 e >2,0, respectivamente; valores abaixo de 1,8 podem ser indicativos da presença de proteínas nas amostras, como validado por Glasel (1995).

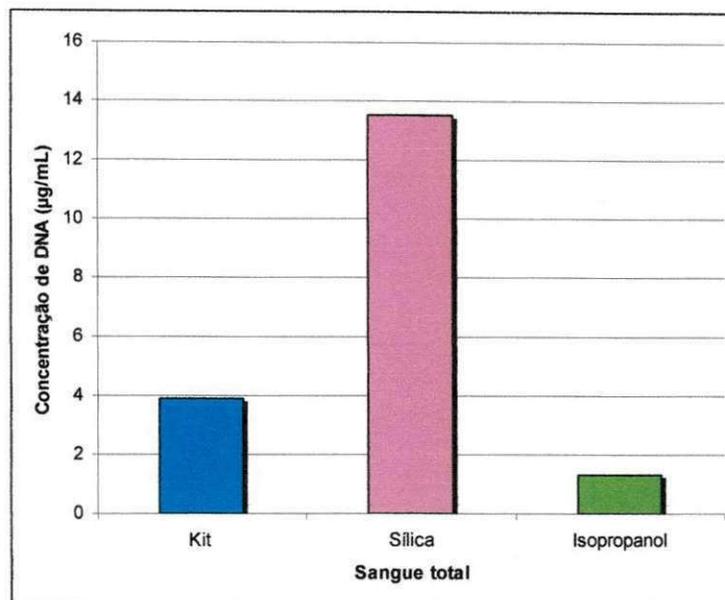
Os kit comerciais são bastante eficientes demonstram boa reprodutibilidade em relação à quantidade de DNA extraída da amostra e seu grau de pureza, mas ainda são caros para procedimento de rotina. O uso de uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico tem custo mais baixo, mas libera vapores tóxicos e é corrosiva, exigindo cuidados especiais no manuseio e descarte. Visando obter uma técnica que apresente boa

eficiência de extração de DNA associada com grau de pureza satisfatório para PCR e baixo custo, o DNA de sangue total foi extraído por tres métodos diferentes: um kit comercial, sílica e isopropanol.

Os resultados da concentração de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) e do grau de pureza (coeficiente  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. A média obtida com o kit foi de 3,9  $\mu\text{g}$  de DNA, estando de acordo com o informado no manual, que indica para 100  $\mu\text{L}$  de sangue mamífero a obtenção de 3 a 6  $\mu\text{g/mL}$  de DNA. As médias obtidas com a extração pela sílica e isopropanol foram de 13,5 e 1,3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Sambrook et al., (2003) recomendam a utilização de até 1  $\mu\text{g}$  de DNA alvo em uma reação de PCR realizada com célula de eucarioto. Baseado nesta recomendação, apesar de haver diferenças quanto a quantidade de DNA extraído nas três, a princípio, todos estão dentro da concentração esperada.

**Tabela 3** - Concentração de DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtido a partir de sangue total das raposas extraído com kit comercial, isopropanol e sílica e medida por fotometria.

<b>TÉCNICAS</b>			
<b>ANIMAL</b>	<b>KIT</b>	<b>SÍLICA</b>	<b>ISOPROPANOL</b>
Nº 01	5,7	2,5	1,8
Nº 02	3,4	2,6	0,3
Nº 03	3,6	23,0	0,6
Nº 04	3,0	10,5	0,7
Nº 05	4,1	38,5	1,2
Nº 06	2,8	7,4	1,7
Nº 07	3,4	3,4	1,4
CN-01	3,2	2,3	2,5
CN-02	3,4	3,5	1,5
CN-03	5,9	49,5	2,0
CN-04	4,9	5,3	0,7
<b>MÉDIA</b>	<b>3,9</b>	<b>13,5</b>	<b>1,3</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>1,1</b>	<b>16,4</b>	<b>0,7</b>



**Figura 8** - Concentração das médias obtidas pela extração de DNA de sangue total utilizando o kit comercial, a sílica e o isopropanol.

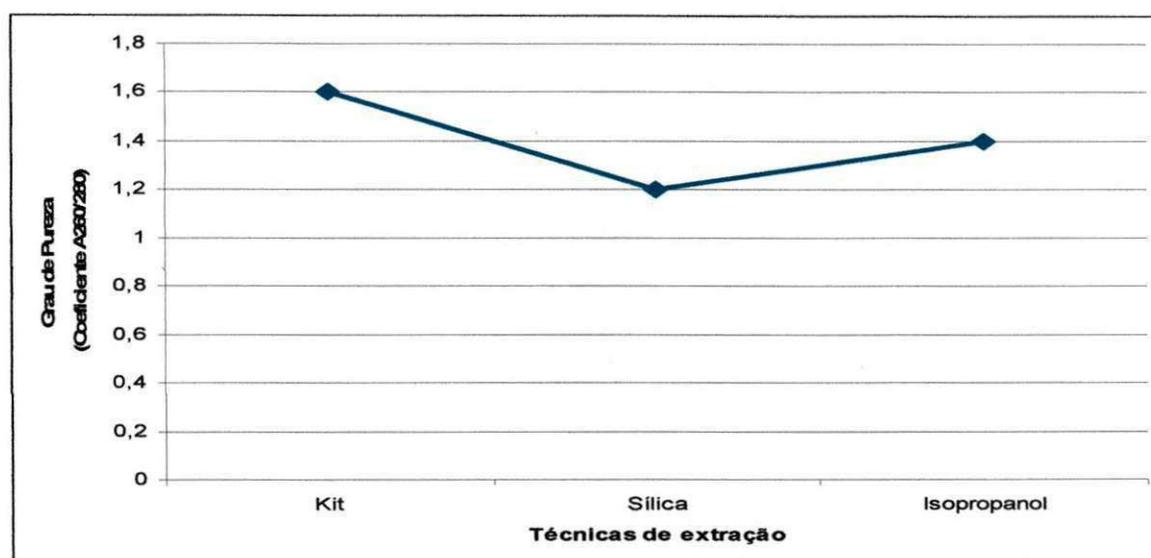
**Tabela 4** - Valores relativos ao grau de pureza do DNA de amostras de sangue total das raposas extraído com kit comercial, técnica de isopropanol e da sílica e medido por fotometria (A260:A280).

ANIMAL	TÉCNICAS		
	KIT	SÍLICA	ISOPROPANOL
Nº 01	1,34	1,30	1,10
Nº 02	1,34	1,28	----
Nº 03	1,65	1,14	1,95
Nº 04	2,06	1,18	2,27
Nº 05	1,39	1,14	1,33
Nº 06	2,17	1,15	1,20
Nº 07	1,88	1,19	1,17
CN-01	1,58	1,28	1,20
CN-02	1,64	1,17	1,19
CN-03	1,49	1,13	1,14
CN-04	1,17	1,23	1,71
<b>MÉDIA</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>

Em relação ao grau de pureza, baseados na média dos três protocolos as melhores

respostas em relação a absorvância foram alcançadas com o kit (Figura 9). Com base na relação A260/A280, Glasel (1995) interpreta que valores abaixo de 1,8 significa a contaminação das amostras por proteínas o que poderia explicar o alto valor da concentração de DNA obtido com a sílica que pode ser explicado pela grande concentração de proteínas contaminando as amostras, cujo problema pode ter ocorrido durante a etapa de precipitação das proteínas com acetato de potássio no momento da realização da técnica da extração.

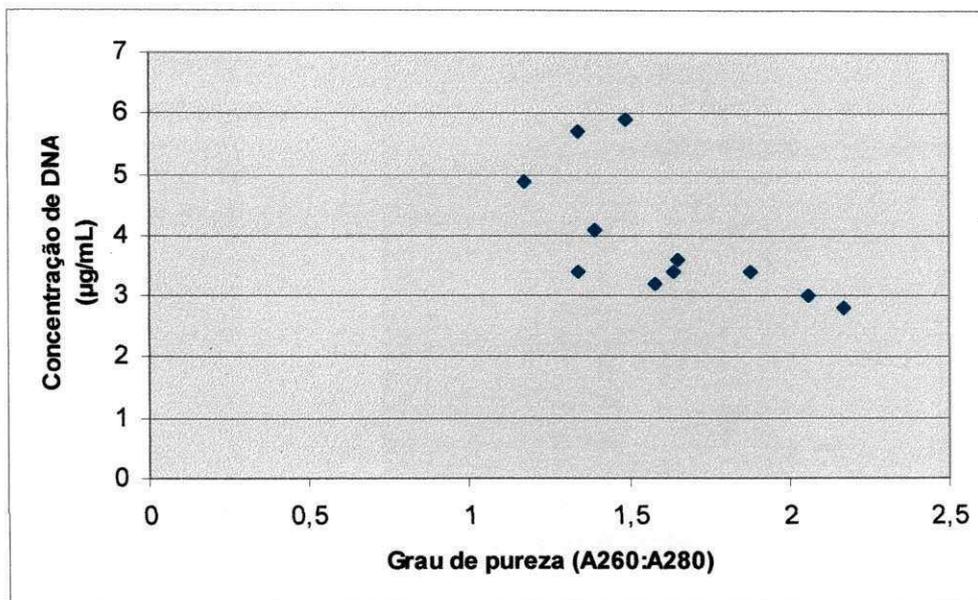
Nóbrega et al (2009) também analisou a pureza das amostras e a técnica de isopropanol foi a que obteve o melhor grau médio de pureza.



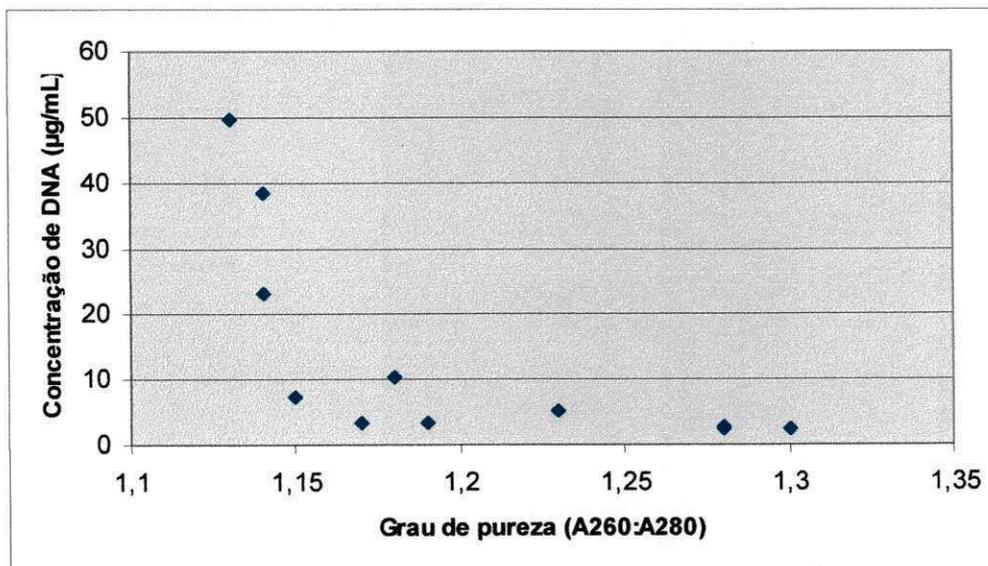
**Figura 9** - Média do grau de pureza de DNA das amostras de sangue total obtido nas três técnicas pela relação de A260:A280.

Ao analisar os gráficos de tendência (Figuras 10, 11 e 12 respectivamente), observa-se que a alta concentração de DNA é inversamente proporcional ao grau de pureza. Nos casos em que o grau de pureza obtido foi inferior a 1,8, supõe-se que o aumento da concentração foi devido à contaminação por proteínas. Percebe-se que o pior desempenho foi obtido na extração pela sílica, provavelmente na etapa de precipitação das proteínas com acetato de potássio.

Os dados corroboram com os de Nóbrega et al (2009), que mostraram ter o método da sílica o pior desempenho na extração de DNA de tecidos e sangue de cão.



**Figura 10** - Tendência entre concentração de DNA e pureza das amostras após a extração com kit comercial.



**Figura 11** - Tendência entre concentração de DNA e pureza das amostras após extração com sílica.

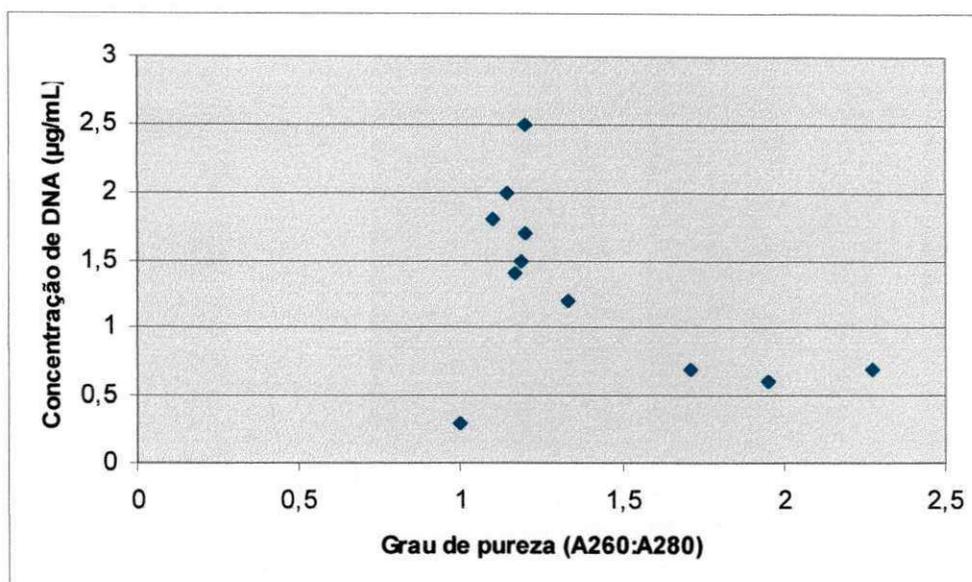


Figura 12 - Tendência entre concentração de DNA e pureza das amostras após extração com isopropanol.

## 4.2 Cães

### 4.2.1 Sorologia

Entre as 113 amostras de cães, 23 apresentaram soropositividade ao teste de ELISA S7, resultando em uma prevalência de 19,65%. Batista (2008) avaliando a sorologia de cães do CCZ de Caicó-RN, encontrou uma prevalência de 8,5%, enquanto que a do município, no mesmo período, foi de 5%. A diferença entre a prevalência do município e dos animais do CCZ foi justificada pelo fato destes, em sua maioria, serem provenientes das ruas, onde se encontram mais expostos ao vetor ou porque são doados pelos proprietários por manifestarem algum sinal relacionado ao calazar.

Em 1974, Guedes et al ao avaliarem a prevalência do calazar em áreas litorâneas de João Pessoa obtiveram resultado de 3,8%

Apesar da amostra do CCZ poder tendenciar resultados positivos, não deve-se subestimar o aumento da prevalência do calazar em João Pessoa. O aumento dos casos em clínicas veterinárias do município tem sido comprovado por análises laboratoriais.

O aumento da prevalência também foi observado por Batista (2008), em Caicó/RN, ao comparar dados fornecidos pela FUNASA em 2003 (prevalência de 1,3%) e o inquérito de 2008 (5% de prevalência).

Em Patos/PB, também foi verificado aumento da prevalência em inquéritos

realizados em 2000 e 2010 de 1,4% para 7,2%, respectivamente (Marcia Almeida de Melo, 2010, dados não publicados).

#### **4.2.2 Sinais clínicos**

Em função da rotina do CCZ, não foi possível relacionar os sinais clínicos por animal, apenas assinalando nas fichas se havia ou não sintomas. De uma forma geral, animais com sinais clínicos sugestivos apresentavam: onicogribose, alopecia, úlceras na pele, emaciação, ceratoconjuntivite, esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatia do poplíteo. Estes sinais também foram vistos por Troncarelli et al. (2009) e Batista (2008).

No total dos 113 animais coletados 53 (46,9 %) dos animais apresentavam pelo menos um dos sinais clínicos e que dos 23 animais soropositivos no ELISA S7, 12 (57,17%) foram caracterizados com alguma manifestação clínica descrita, diferente do obtido por Batista (2008) que de 16 amostras reagentes apenas 2 (12,5%) cães apresentaram sinais de LV e de Troncarelli et al. (2009) que em 65 animais, 64 (98,46%) tinham sintomas da doença. Essa variação observada deve estar associada aos diferentes aspectos clínicos que a doença pode se apresentar dependendo da resposta de cada hospedeiro ao parasita (LANOTTE et al., 1979).

A resposta imune protetora e o aparecimento de sintomas também estão associados à condição de estresse. Os cães deste trabalho e os de Troncarelli et al. (2009) habitavam em municípios com 359.429 e 702.235 habitantes, respectivamente (IBGE, 2009). O município de Caicó-RN possui, atualmente, 63.006. Possivelmente, as condições ambientais e sociais as quais os cães são submetidos em municípios com maiores densidades populacionais podem proporcionar uma maior prevalência de cães sintomáticos em animais encaminhados ao CCZ.

#### **4.2.3 Raça**

Com relação a raça dos animais, 77 (68,14 %) deles eram Sem Padrão de Raça Definido, 11 (9,73 %) eram da raça Poodle, 5 (4,42 %) da raça Pastor Alemão, 4 (3,53 %) da raça Pinsher, 4 cães (3,53 %) da raça Pit Bull, 3 (2,65 %) Doberman, 2 (1,76 %) Cocker Spaniel, 2 (1,76 %) Pastores Belga, 1 (0,88 %) Piquinês, 1 (0,88 %) Rotwiller, 1 (0,88 %) Dog Alemão, 1 (0,88 %) Daschund e 1 (0,88 %) Chow Chow. Do total de 23 animais

positivos, a maioria dos animais eram sem um padrão de raça definida (SPRD), como mostra a Tabela 5. Em Batista (2008), os 6 cães reagentes eram SPRD. Como observado por ALMEIDA (2009), não houve predisposição de raça para o calazar canino.

**Tabela 5** - Prevalência dos animais soropositivos em relação ao total de animais caracterizados quanto ao padrão da raça.

<b>Raça</b>	<b>Soropositivos/Total de cães</b>	<b>Prevalência (%)</b>
<b>Chow Chow</b>	<b>0/1</b>	<b>0,0</b>
<b>Cocker Spaniel</b>	<b>0/2</b>	<b>0,0</b>
<b>Daschund</b>	<b>0/1</b>	<b>0,0</b>
<b>Doberman</b>	<b>0/3</b>	<b>0,0</b>
<b>Dog Alemão</b>	<b>0/1</b>	<b>0,0</b>
<b>Pastor Alemão</b>	<b>1/5</b>	<b>20,0</b>
<b>Pastor Belga</b>	<b>0/2</b>	<b>0,0</b>
<b>Pinsher</b>	<b>0/4</b>	<b>0,0</b>
<b>Piquinês</b>	<b>1/1</b>	<b>100,0</b>
<b>Pit Bull</b>	<b>1/4</b>	<b>25,0</b>
<b>Poodle</b>	<b>1/11</b>	<b>9,0</b>
<b>Rotwiller</b>	<b>0/1</b>	<b>0,0</b>
<b>SPRD</b>	<b>19/77</b>	<b>24,6</b>
<b>TOTAL</b>	<b>23/113</b>	<b>20,3</b>

#### **4.2.4 Sexo**

Quanto ao fator sexo, mostrou que dos 23 animais reagentes 12 (52,1%) eram fêmeas e 11 (47,1%) eram machos em um total de 58 (51,3 %) fêmeas e 55 (48,7 %) machos. Os dados corroboram com Cabrera et al. (2003), Naveda et al. (2006), Batista (2008) e Almeida et al. (2009) por não haver predisposição da doença por sexo.

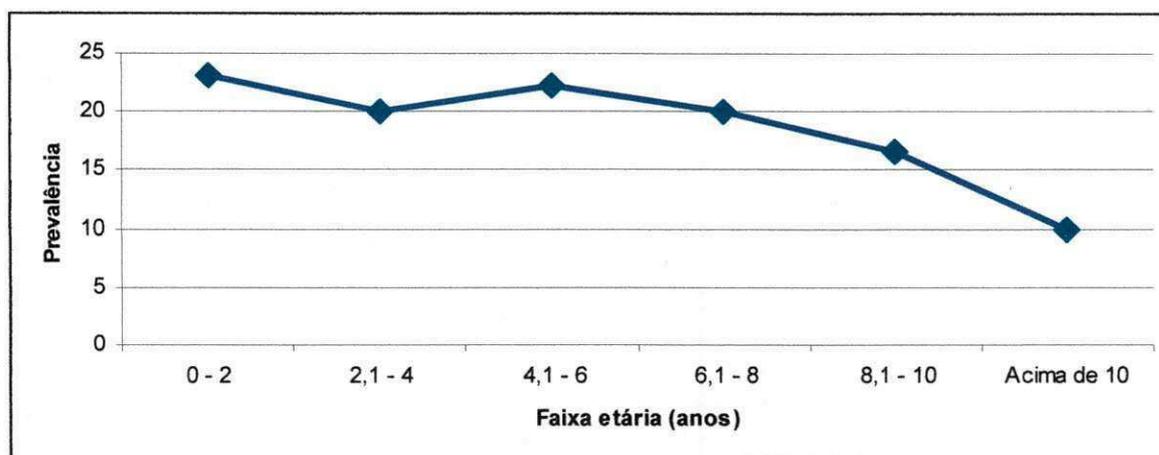
#### **4.2.5 Idade**

Como mostra a Tabela 5, não houve variação em relação a faixa etária. Animais com idade inferior a 3 meses pode apresentar exame positivo devido a presença de

anticorpos maternos. Nos trabalhos de Naveda et al. (2006) em relação a idade verificaram a maior frequência principalmente entre 1 e 3,9 anos.

**Tabela 6** - Prevalência dos animais soropositivos em relação ao total de animais quanto à faixa etária.

Faixa etária (anos)	Soropositivos/Total de cães	Prevalência (%)
0 - 2	10/43	23,2
2,1 - 4	5/25	20,0
4,1 - 6	4/18	22,2
6,1 - 8	2/10	20,0
8,1 - 10	1/6	16,6
Acima de 10	1/10	10,0
<b>TOTAL</b>	<b>23/113</b>	<b>20,3</b>



**Figura 10** - Distribuição dos animais soropositivos ao ELISA S7 de acordo com a faixa etária (anos) analisados quanto a prevalência (%).

#### 4.2.6 Bairros

De acordo com a Tabela 6, os locais onde foram diagnosticados casos da doença são os bairros de Água Fria, Alto do Mateus, Bancários, Centro, Funcionários II, Gramame, Jardim Planalto, Manaíra, Mangabeira IV, Mangabeira VIII, Novais, Paratibe, Treze de maio e Valentina I. Quando os casos foram distribuídos no mapa, percebe-se uma tendência maior de ocorrência na região sudeste do município.

**Tabela 7** - Prevalência da leishmaniose visceral canina do Centro de Controle de Zoonoses de acordo com os bairros avaliados nos meses de janeiro/fevereiro de 2010 com base no diagnóstico sorológico através do ELISA S7.

<b>Bairros</b>	<b>Soropositivos/Total de cães</b>	<b>Prevalência (%)</b>
Água Fria	2/2	100,0
Alto do Mateus	1/2	50,0
Bancários	1/6	16,6
Brisamar	0/1	0,0
Cabo Branco	0/1	0,0
Centro	2/2	100,0
Cidade Verde	0/1	0,0
Cidade Universitária	0/2	0,0
Cristo	0/2	0,0
Cruz das Armas	0/2	0,0
Estados	0/2	0,0
Expedicionários	0/1	0,0
Funcionários I	0/1	0,0
Funcionários II	1/1	100,0
Geisel	0/1	0,0
Gramame	3/7	42,8
Hernany Sátyro	0/2	0,0
Indústrias	0/2	0,0
Jardim Planalto	1/4	25,0
José Américo	0/9	0,0
Manaíra	1/5	20,0
Mangabeira I	0/6	0,0
Mangabeira II	0/3	0,0
Mangabeira III	0/1	0,0
Mangabeira IV	1/1	100,0
Mangabeira VI	0/1	0,0
Mangabeira VII	0/5	0,0
Mangabeira VIII	4/7	57,1
Monsenhor Magno	0/1	0,0
Nova Mangabeira	0/1	0,0

<b>Bairros</b>	<b>Soropositivos/Total de cães</b>	<b>Prevalência (%)</b>
<b>Novais</b>	<b>1/1</b>	<b>100,0</b>
<b>Padre Zé</b>	<b>0/2</b>	<b>0,0</b>
<b>Paratibe</b>	<b>1/2</b>	<b>50,0</b>
<b>Roger</b>	<b>0/2</b>	<b>0,0</b>
<b>Torre</b>	<b>0/1</b>	<b>0,0</b>
<b>Treze de maio</b>	<b>1/2</b>	<b>50,0</b>
<b>Valentina I</b>	<b>2/6</b>	<b>33,3</b>
<b>Valentina II</b>	<b>0/3</b>	<b>0,0</b>
<b>Procedência desconhecida</b>	<b>1/7</b>	<b>17,2</b>
<b>TOTAL</b>	<b>23/100</b>	<b>20,3</b>



## 5 CONCLUSÃO

Em função dos resultados da sorologia das raposas do zoológico, pode se concluir que dois animais evidenciaram uma soroconversão aparente, após análise pelo ELISA-S7. As avaliações das técnicas de extração mostraram que ambas estão dentro do esperado quanto a concentração de DNA e pureza. Quanto à sorologia dos cães evidenciaram a alta taxa de animais positivos para LV que dão entrada no CCZ-JP. Das amostras positivas, 12 cães apresentaram pelo menos um dos sinais clínicos sugestivos da doença e 86,9 % eram animais sem padrão de raça definida (SPRD), e pelos dados não há predisposição da doença por sexo ou faixa etária, com relação aos bairros apresentou que há uma maior ocorrência na região sudeste da cidade.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHID, S.M.M. **Apostila Didática em Protozoologia Veterinária**. Mossoró-UFERSA: 4. ed. 2009. 43 p.
- ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; SANTOSA, S. L.; VOLPINID, Â. C.; MARQUES, M. J. M.; ROMANHAA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 231–238, 2006.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**. v. 127, p. 227–232, 2005.
- ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. Short protocols in molecular biology. 5 ed., **Wiley**, v. 2, 2002. 1512 p.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, Sep. 2004.
- BATISTA, M.G. N. **Prevalência de Leishmaniose Visceral Canina no Município de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil**: Soroprevalência, fatores de Risco e Isolamento do Agente. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.
- BONAMIGO, R.A.; OLIVEIRA.G. Diagnóstico parasitológico de *leishmania* sp. em animais silvestres. Iniciação Científica CNPq – PIBIC. 2008/09. Disponível em <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=425> : Acesso em: 15-01-10
- BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Imprensa Nacional. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministério.
- BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**: uma introdução. 4 ed. Artmed. Porto Alegre. p. 47. 2003.

CABRERA, M.A.A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* cunha & chagas, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ**: Estudo de possíveis variáveis preditoras. Tese (Magister Scientiae em Saúde Pública)- Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro, 1999.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.M. & JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista Instituto Medicina tropical**. São. Paulo, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; JUNIOR, C. P. Avaliação da Efetividade da Utilização de Coleiras Impregnadas com Deltametrina a 4% para o Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Resultados Preliminares. **Boletim Epidemiológico Paulista**, ISSN 1806-4272, Ano 1, n. 12, 2004.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; SANTUCCI S. G. Leishmaniose Visceral Americana. Sucen, p.1-2, 2000-2001. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br>>. Acesso em: 02 de abril de 2010.

CERQUEIRA, E. J. L.; SILVA, E. M., MONTE-ALEGRE, A. F.; SHERLOCK, Í. A. Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cercopithecus thous* (Canidae) da área endêmica de leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 1, p. 91-93, 2000.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo, da leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v. 50, p. 221-222, 1936.

CORRÊA, S.H.R.; PASSOS, E.C. Wild animals and public health. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa University Press, p. 493-499, 2001.

COURTENAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A. B. VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 498-502, 1996.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, p. 407- 414, 2002.

CURI, N.H.A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p.149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 320-325, 2007.

DEANE, L. Leishmaniose visceral neotropical. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 315-321, 1938.

DIPINETO, L.; MANNA, L.; BAIANO, A.; GALA, M.; FIORETTI, A.; GRAVINO, A. E.; MENNA, L. F. Presence of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 518–520, 2007.

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses. In: Fundamentos da Parasitologia Humana. 1. ed, **Manole**. Barueri, São Paulo, c. 5, p. 37-46, 2003.

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**. v. 146, p. 235–241, 2007.

FERREIRA, S.; ITUASSU, L.; MELO, M.; ANDRADE, A. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257-263, 2008.

FRASER, C. M. Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária. 9 ed., **Roca**, São Paulo, p. 543-544, 2008.

FUNASA. **Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle.** Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ano. 02, n. 06, 2002.

GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. Parasitologia Humana. **Atheneu**, São Paulo, c. 10, p. 56-72, 2000.

GLASEL, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280nm absorbance ratios. Circle Reader Service, v. 18, n. 1, 1995. Disponível em: <<http://www.colorado.edu/chem/chem4761/biolab2000/A260%20Absorption%20-%20Glasel.pdf>> Acesso em: 30 jun de 2009.

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

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p.338-349, 2004.

GUEDES, G. E.; MAROJA, A.; CHAVES, E.; ESTÉLIO, J.; CUNHA, M. J. Calazar no litoral do estado da Paraíba, Brasil. Encontro de 70 casos humanos e 16 caninos. **Revista do Instituto de Medicina tropical**. São Paulo. v. 16, n. 5, p. 265 – 269, 1974.

JÚNIOR, V. A. R.; PESSUTTI, C.; CHIEREGATTO, C. A. F. S. **Guia de Identificação dos Canídeos Silvestres Brasileiros**. Joy Joy Studio Ltda - Comunicação Ambiental, 2003. 35 p.

HELD, P. G. The nucleic acid "A260/A280" ratio measurment. Disponível em: <<http://www.mnstate.edu/chastain/BCBT%202008%20website/Introduction%20280-260.pdf>> Acesso em: 30 jun. 2009.

HERMONT, V. J. Leish-Tec. Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. Manual Técnico.1 ed., 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades @. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm>>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2009.

KREUTZER, R. D.; SOURATY, N.; SEMKO, M. E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 36, p. 22-32, 1987.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 741-745, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L.; POVOA, M. M.; et al. A Leishmania e as Leishmanioses. In: Lainson R, organizador. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Serviços de saúde pública. Belém: **Instituto Evandro Chagas**. v. 1, p. 83-124, 1986.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis-distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 135-137, 1990.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 54, p. 277-295, 1979.

LAZARI, P. **Manual de Vigilância e Controle das Leishmanioses**. Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso Superintendência de Vigilância em Saúde Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental Gerência de Vigilância de Vetores e Antropozoonoses. Cuiabá, 2007. 25 p.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 55, n. 1/2, p. 146-151, 2008.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, suplemento 1, p. 41-45, 2004.

MANCIANTI, F.; MIGNONE, W.; GALASTRI, F. Serologic Survey for Leishmaniasis in Free-living Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30(3), 1994, p. 454-456, Wildlife Disease Association, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. Leishmaniose Visceral (Calazar). **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 41, p. 69-84, 1981.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. Parasitologia Médica. **Atheneu**, São Paulo, c. 10, v. 1, p. 67-83, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1 ed., série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF. 2006. 62 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA**. Brasília; 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. Portaria N° 1.399, DE 15 DE DEZEMBRO DE 1999. Disponível em: <[http://www.funasa.gov.br/internet/arquivos/legislacao/portariasMinisteriais/Pm\\_1399\\_1999.pdf](http://www.funasa.gov.br/internet/arquivos/legislacao/portariasMinisteriais/Pm_1399_1999.pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2010.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

NAVEDA, L. A. B.; MOREIRA, E. C.; MACHADO, J. G.; MORAES, J. R. C.; MARCELINO, A. P. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 988-993, 2006.

NOÉ, P. **Infecção por *Leishmania* sp. em gatos (*Felis domesticus*) na cidade de Campo Grande, MS, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2008.

NÓBREGA, G. D.; ARAÚJO, K. N.; MELO, M. A.; ANDRADE, P. P.; BATISTA, M.G. N.; CAMBOIM, E. K. A.; CORDEIRO, A. A.; AZEVEDO, S. A. Diagnóstico do calazar canino: tecido versus protocolo de extração de DNA. Qual a melhor opção?. In: VI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande- PIBIC/CNPq/UFCG-2009. 13 p.

NOGUEIRA, J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde Pública: uma zoonose reemergente. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VII – n.13, Garça/SP, 2009

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da Leishmaniose Visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

PUMAROLA, M.; BREVIK, L.; BADIOLA, J.; VARGAS, A.; DOMINGO, M.; FERRER, L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 105, p. 279–286, 1991.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses. *Lutzomyia longipalpis* e a Eco-Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil. c. 6, p. 310-336, 2003.

RESOLUÇÃO RDC nº. 33, de 25 de fevereiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

REY, L. O complexo "Leishmania donovani" e a Leishmaniose Visceral. In.: **Parasitologia. Parasitos e Doenças Parasitárias do homem nas Américas e na África.** 3 ed., Guanabara Koogan, c. 19, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 3 ed, 2003.

SHAW, J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SIDDIG, R.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D.C.; PETERS, E.A. Visceral leishmaniasis in Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 1, p. 66-8, 1988.

SILVA, J.C.R. Zoonoses e Doenças Emergentes Transmitidas por Animais Silvestres. Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens/ABRAVAS – 2004. Disponível : <http://www.abravas.com.br>. Acesso em: 30-01-10

SILVA, D.G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Santa Catarina, 2008.

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

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, p. 287-292, 1995.

TRONCARELLI, M.Z.; LUCHEIS, S.B.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J. G.; LANGONI, H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP, com vistas ao diagnóstico da leishmaniose visceral (LV). **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 343-353, 2009.

WHO. World Health Organization. Control of leishmaniasis. In: SIXTIETH WORLD HEALTH ASSEMBLY.12.3, A60/10, 2007.

ZRZAVY, J; RICANKOVA, V. Phylogeny of recent canidae (Mammalia, Carnivora): relative reliability and utility of morphological and molecular datasets. **Zool Scripta**, v.33, p. 311-333, 2004.