

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**DETECÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS POR
Leishmania spp. E *Trypanosoma* spp. EM CÃES PELO
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO, PELA REAÇÃO
DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E REAÇÃO EM
CADEIA DE POLIMERASE**

Milena Araújo Viol
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS POR
Leishmania spp. E *Trypanosoma* spp. EM CÃES PELO
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO, PELA REAÇÃO
DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E REAÇÃO EM
CADEIA DE POLIMERASE**

**Milena Araújo Viol
Orientadora: Profa. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba – SP
2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: detecção de reações cruzadas por leishmaniasis spp. e tripanosomiasis spp em cães pelo ensaio imunoenzimático indireto, pela reação de imunofluorescência indireta e reação em cadeia de polimerase

AUTORA: MILENA ARAÚZ VIOL

ORIENTADOR: Dr.ª KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

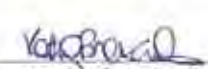
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. RENATO ANDREOTTI E SILVA


Dr.ª VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA


Dr.ª KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

DATA DA REALIZAÇÃO: 18 de agosto de 2011.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MILENA ARAÚZ VIOL – São Paulo – SP, 06 de dezembro de 1982. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no ano de 2006. Realizou residência médico-veterinária na área de patologia clínica no Hospital Veterinário Luis Quintiliano de Oliveira, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, com início em 2007 e término em 2009. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba – SP, em março de 2009, sob orientação da Professora Adjunta Katia Denise Saraiva Bresciani.

“Que eu jamais me esqueça de que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois a vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.”

Francisco Cândido Xavier

Aos meus pais, Angela e Jeziel, e à minha querida tia Edna, que muito me
incentivaram na busca deste título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me proporcionado tantas oportunidades nessa existência e me fortificado sempre quando precisei. Espero estar cumprindo todos os objetivos programados, sem me desviar durante a jornada.

Aos meus pais amados, Ângela e Jeziel, que sempre me ampararam em todo e em qualquer momento de dificuldade.

À minha querida tia Edna, sempre otimista e protetora, presença constante em minha vida.

À minha avó Antonia que, com certeza, ajudou muito na minha educação quando criança e ao meu avô Antonio, já falecido, mas que também participou do meu crescimento.

À querida amiga e orientadora Professora Katia, por todos os ensinamentos, por toda a paciência, dedicação, carinho e proteção que nunca deixou de me proporcionar. Considero um presente de Deus poder ter tido a oportunidade de tê-la como orientadora.

À Professora Valéria, por ter-me passado muitos conhecimentos, por ter cedido o laboratório de imunologia, pela atenção e dedicação e por me ensinar a ser persistente.

À Professora Caris e à Érica, que muito me ajudaram no processamento das amostras.

À Professora Sílvia, muito atenciosa e prestativa, me auxiliando sempre quando precisei.

À Professora Mary, por toda a orientação oferecida no exame de qualificação geral.

À Professora Suely, sempre muito prestativa, me aconselhando com muita calma nos momentos em que precisei.

Ao Rafael e Tatiana, que durante a residência me ajudaram, sempre me incentivando a prosseguir na carreira acadêmica.

À minha querida amiga Monally, companheira nas pesquisas, conselheira em vários assuntos, extremamente dedicada e competente.

Obrigada por todas as horas que passamos juntas nos experimentos, foram momentos de muito trabalho, mas também de muita alegria.

À Mariana, Larissa, Tatiana, Juliana e Denise, por toda a ajuda e conhecimento transmitidos no laboratório de imunologia.

À Gabriela e Izabela, alunas de iniciação científica, que me ajudaram na colheita das amostras.

À Christiane, Milena e Giuliana, por me auxiliarem na obtenção de amostras para o experimento.

Ao Diego Generoso, sempre muito prestativo, por me ajudar no precessamento das amostras.

À minha amiga Lívia, por todas as horas gastas me ajudando na montagem da apresentação e na formatação da dissertação, sempre com muita paciência e capricho, além dos vários momentos que passamos juntas, que foram com toda a certeza inesquecíveis. Tê-la conhecido foi muito importante para mim.

À minha amiga Patrícia, por me ouvir nos momentos difíceis, pela paciência e por estar sempre pronta a ajudar.

À Tati e à Ju também pelos conselhos e força.

À minha irmã Ana Carolina, amiga de infância, que me acompanhou desde o início do mestrado, me auxiliando sempre que necessário.

À querida Dona Júlia, por todas as preces e conselhos imprescindíveis nesta fase da minha vida.

À Angela que me ajudou a superar as dificuldades, sempre me encorajando a persistir.

À Lurdinha, pelas orações e conselhos sábios e elucidativos.

À Zilma, por toda a dedicação, carinho e preocupação.

À Isabel pelas correções bibliográficas.

À Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba, pelo acolhimento e suporte.

À Fapesp, pela confiança e financiamento.

A todos os cães envolvidos no estudo, por servirem para o aprimoramento e evolução da ciência. Em especial, meu cãozinho Tommy, sempre prestativo.

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1 Importância e aspecto zoonótico.....	13
2 Leishmaniose Visceral Canina.....	15
2.1 Etiologia.....	15
2.2 Epidemiologia.....	15
2.3 Ciclo Evolutivo.....	18
2.4 Sinais Clínicos.....	18
2.5 Diagnóstico.....	19
3 Doença de Chagas.....	20
3.1 Etiologia.....	20
3.2 Epidemiologia.....	20
3.3 Ciclo Evolutivo.....	21
3.4 Sinais Clínicos.....	22
3.5 Diagnóstico.....	22
4 Reações cruzadas entre <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> existentes na utilização de provas sorológicas.....	23
OBJETIVO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO.....	43
1 Introdução.....	44
2 Material e métodos.....	45
3 Análise estatística.....	48
4 Resultados.....	49
5 Discussão.....	52
6 Conclusão.....	55
REFERÊNCIAS.....	57

**DETECÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS POR *Leishmania* spp. E
Trypanosoma spp. EM CÃES PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
INDIRETO, PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E
REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE**

RESUMO - O objetivo deste estudo foi detectar reações cruzadas por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Assim, foram colhidas 408 amostras sanguíneas de cães domiciliados no município de Araçatuba, SP, de ambos os sexos, de diversas raças e com idade a partir de seis meses. Em relação à *Leishmania* spp., pela RIFI, 14,95 % (61/408) foram reagentes. A positividade por meio do ELISA, foi de 20,10% (82/408) e pela PCR, 29,66% (121/408), com diferença significativa para o sexo e a idade destes animais ($p < 0,05$). Para *Trypanosoma* spp., a ocorrência de anticorpos pelo ELISA foi de 10,54% (43/408) e pela PCR, 2,45% (10/408) cães foram positivos. Pela RIFI, 10,29% (42/408) dos animais foram considerados positivos e somente o sexo apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Neste trabalho, constatou-se que 10,54% (43/408) dos animais foram soropositivos por ELISA para *Trypanosoma* spp., sendo que 79,07% (34/43) obtiveram resultados positivos no diagnóstico molecular para *Leishmania* spp. e dos 10,29% (42/408) positivos por RIFI, 95,24% (40/42) dos cães confirmaram a infecção por este parasita. Por meio dos resultados obtidos, pode-se inferir que foram evidenciadas reações cruzadas nos ensaios sorológicos para ambos os protozoários, nos animais analisados neste trabalho.

Palavras-chave: Biologia molecular, Leishmaniose visceral, Ocorrência, Tripanossomíase canina

DETECTION OF CROSS INFECTION BY *LEISHMANIA* SPP. AND *TRYPANOSOMA* spp. IN DOGS BY INDIRECT IMMUNOSORBENT ASSAY, INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY AND POLYMERASE CHAIN REACTION

SUMMARY - The aim of this study was to detect cross-infection by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. by indirect immunosorbent assay (ELISA), by Indirect Immunofluorescence (IFA) and by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Thus, blood samples were collected from 408 domestic dogs of both sexes, different races and ages from six months. For *Leishmania* spp. by IFA, 14.95% (61/408) were positive. Positive by ELISA, was 20.10% (82/408), and PCR 29.66% (121/408), with significant difference for sex and age of animals ($p < 0.05$). For *Trypanosoma* spp., the occurrence of antibodies by ELISA, was 10.54% (43/408), and PCR, 2.45% (10/408) dogs were positive. By IFA, 10.29% (42/408) of the animals were considered positive and only sex was significant difference ($p < 0.05$). In this work it was found that 10.54% (43/408) animals were seropositive by ELISA for *Trypanosoma* spp., 79.07% (34/43) had positive results in molecular diagnostic for *Leishmania* spp. and 10.29% (42/408) positive by IFA, 95.24% (40/42) dogs confirmed the infection by this parasite. Through the results obtained can be inferred that cross-infection were observed by both protozoa in animals of this paper.

Keywords: Molecular biology, Visceral leishmaniasis, Trypanosomiasis canine, Serology

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Importância e aspecto zoonótico

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose distribuída mundialmente, que atinge as áreas tropicais e subtropicais, sendo que 90% dos casos humanos ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil (LINDOSO; GOTO, 2006). No nosso país, essa enfermidade ocorre em zonas rurais, periurbanas e urbanas, atingindo as cinco regiões brasileiras (SÃO PAULO, 2006).

A Organização Mundial da Saúde classifica a leishmaniose como segunda protozoose mais importante da atualidade, sendo que, na América Latina, já foi descrita em vários países, com 90% dos casos concentrados no Brasil, especialmente na região nordeste, representando um sério problema em saúde pública (WHO, 2005).

No período entre 2003 e 2009, foram registrados 34.583 casos de leishmaniose visceral no País; em 2009, a região nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões norte com 19,2%, sudeste com 17,4%, centro-oeste com 7,4% e, por último, a região sul, com 0,2% das pessoas infectadas (BRASIL, 2010).

A doença atinge ambientes de baixo nível sócio econômico e tem sido considerada como reemergente, caracterizando um processo de transição epidemiológica, com incidências crescentes e expansão geográfica em estados do sul do País e em áreas urbanas onde a doença não ocorria anteriormente (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

O município de Araçatuba, SP, localiza-se numa região endêmica para a leishmaniose visceral canina onde, em 1998 foi diagnosticada pela primeira vez no estado de São Paulo (LUVIZOTTO et al., 1999).

Dados obtidos na Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) desta localidade indicaram que 3227 animais estavam infectados no período de 2006 a 2010. Na Secretaria de Saúde deste Estado, foram registrados

um total de 1512 casos humanos e 138 óbitos de 1999 a 2009, sendo que, em 2008, 291 pessoas foram diagnosticadas com a doença, e destas, 23 faleceram (BEPA, 2010).

Importante salientar que, no ano de 2007, 50% dos óbitos foram relacionados ao vírus do HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida). Pacientes submetidos a quimioterapia também são mais susceptíveis e, quando não se recorre ao tratamento, a doença é letal em 95% dos casos (BRASIL, 2006).

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, também é uma protozoose de grande importância na América Latina, possuindo variações de morbidade e mortalidade em diferentes países ou regiões. Esta foi descoberta por Carlos Chagas em 1908, no Brasil, disseminou-se progressivamente na América latina, afetando milhões de pessoas do meio rural, com alto impacto na morbidade e mortalidade (DIAS et al., 2002).

Atualmente, estima-se que aproximadamente 100 milhões de indivíduos estão susceptíveis à infecção; cerca de 16 a 18 milhões já estão infectados e mais que 50.000 mortes ocorre anualmente devido a essa doença (ROSYAL et al., 2007).

No Brasil, estima-se que haja uma prevalência de seis milhões de infectados com o *T. cruzi* e que, a cada ano, surjam 33 mil novos casos da doença. A maior incidência está no norte do País, onde em 0,4% da Amazônia Legal, composta pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, e parte dos Estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, existem populações acometidas (NOGUEIRA, 2005).

Essa enfermidade, tanto em humanos com nos cães, está concentrada em zonas rurais e áreas pobres dos grandes centros urbanos, onde a proliferação do vetor transmissor ocorre com maior frequência, devido à baixa condição social e, conseqüentemente, condições de moradia precárias (DIAS et al., 2002).

2 Leishmaniose Visceral Canina

2.1 Etiologia

As leishmanioses são doenças enzoóticas e zoonóticas causadas por protozoários morfologicamente similares, do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, sendo classificadas em forma tegumentar e visceral (MONTEIRO et al., 2005).

A leishmaniose visceral (LV) tem como agente etiológico as *Leishmanias* do complexo *donovani*, que compreendem a *Leishmania (Leishmania) donovani*, na Ásia e África, *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas (LAISON et al., 1987).

Em um estudo sobre a evolução e a distribuição geográfica do complexo *Leishmania donovani*, Lukes et al. (2007), utilizando técnicas biomoleculares, verificou que a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é da mesma espécie que a *Leishmania (Leishmania) infantum*, por possuírem similaridades moleculares e bioquímicas.

Os reservatórios do parasito são mamíferos, sendo a raposa o principal reservatório do ambiente rural e o cão, do urbano (SÃO PAULO, 2006).

2.2 Epidemiologia

A doença canina, mais prevalente, tem precedido a ocorrência de casos humanos (PARANHOS-SILVA et al., 1996). Em ambas as espécies, são observadas taxas de infecção por *Leishmania* de 1 a 36%, variando conforme a região do país (SILVA et al., 2001).

Inúmeros autores têm relatado a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, como pode ser observado nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, notificada por diversos autores, em vários estados brasileiros

Ano	Autor (es)	Local	Técnica	Número de cães examinados	Número de cães reagentes	Positividade (%)
2001	Nunes et al.	Mato Grosso do Sul	RIFI	97	23	23,7
2001	Silva et al.	Minas Gerais	RIFI	644	139	21,6
2002	Gontijo et al.	Minas Gerais	PCR	644	70	10,9
2002	Gontijo et al.	Minas Gerais	RIFI	148	30	20,3
2003	França-Silva et al.	Minas Gerais	RIFI	33.937	3.300	9,7
2003	Savani et al.	São Paulo	RIFI	2.104	12	0,6
2004	Cortada et al.	Mato Grosso	RIFI	73	55	75,3
2004	Guerra et al.	Roraima	RIFI	3.773	390	10,4
2005	Guimarães	Maranhão	RIFI	43	9	21,0
2005	Monteiro et al.	Minas Gerais	RIFI	4.795	236	5,0
2005	Silva et al.	Rio de Janeiro	RIFI	120	25	20,8
2006	Silva et al.	Minas Gerais	PCR	98	28	28,6
2006	Dantas-Torres et al.	Pernambuco	RIFI	322	130	40,4
2007	Ferreira et al.	Minas Gerais	RIFI	234	121	51,7
			ELISA			63,2
2007	Malaquias et al.	Minas Gerais	ELISA	175	24	13,7
			RIFI	49	8	18,2
2007	Rosypal et al.	São Paulo	RIFI	107	05	4,7
2008	Azevedo et al.	Mato Grosso	RIFI	1.112	87	7,8
2008	Rondon et al.	Ceará	ELISA	750	197	26,2
2009	Almeida et al.	Mato Grosso	RIFI	468	16	3,4
2009	Andrade et al.	Mato Grosso do Sul	RIFI	303	91	30,0
2009	Silva et al.	Rio de Janeiro	RIFI	60	25	41,7
2009	Falqueto et al.	Espírito Santo	ELISA	109	62	57,0
			RIFI	106	12	11,0
2009	Troncarelli et al.	São Paulo	RIFI	200	65	32,5
2010	Dantas-Torres et al.	Pernambuco	RIFI	41	12	29,3
2010	Figueiredo et al.	Rio de Janeiro	ELISA	305	19	6,2
			RIFI		111	36,4
2010	Frehse et al.	Paraná	ELISA	364	01	0,0027
2010	Oliveira et al.	Bahia	ELISA	312	21	4,9
			RIFI		10	3,2
2010	Santos et al.	Pernambuco	RIFI	256	41	16,0
2011	Coura-Vital et al.	Minas Gerais	ELISA	1.443	230	15,9
			PCR		356	24,7
2011	Dias et al.	Minas Gerais	ELISA	6.295	267	4,2
2011	Felipe et al.	Maranhão	RIFI	138	66	47,8

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA= Ensaio Imunoenzimático Indireto;
PCR= Reação em cadeia de polimerase

Quadro 2 – Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, notificada por diversos autores, em outros países

Ano	Autor (es)	Local	Técnica	Número de cães examinados	Número de cães reagentes	Positividade (%)
1991	Rachamin et al.	Portugal	RIFI	43	22	51,2
			ELISA		26	60,5
1996	Sideris et al.	Grécia	RIFI	1.175	569	48,4
2000	Natami et al.	Marrocos	ELISA	323	54	16,7
2002	Abdeen et al.	Israel	ELISA	308	17	5,5
2002	Headington et al.	Reino Unido	PCR	60	37	62,0
			RIFI		12	20,0
2002	Leontides et al.	Grécia	RIFI	73	9	12,3
			PCR		46	63,0
2003	Dereure et al.	Sudão	RIFI	35	25	71,4
2003	Grosjean et al.	Estados Unidos da América	RIFI	957	18	1,9
2003	Harrat & Belkaid	Algéria	RIFI	1.800	666	37,0
2003	Rami et al.	Marrocos	RIFI	257	48	18,7
			ELISA		54	21,0
2004	Amusategui et al.	Espanha	RIFI	479	18	3,7
2005	Ertabaklar et al.	Turquia	PCR	160	57	35,6
2006	Fernandez et al.	Colômbia	ELISA	610	171	28,1
2006	Nasereddin et al.	Palestina	ELISA	148	10	6,8
2007	Rosypal, et al.	Colômbia	RIFI	258	4	1,6
2008	Tamer et al.	Turquia	RIFI	65	2	3,0
2009	Balcioğlu et al.	Turquia	RIFI	176	24	13,6
2009	Charqui et al.	Tunísia	RIFI	67	8	12,0
			PCR		14	20,9
2009	Hassan et al.	Sudão	PCR	87	2	2,3
2009	Otranto et al.	Itália	RIFI	831	79	9,5
2009	Otranto et al.	Itália	ELISA	837	143	17,1
2009	Maresca et al.	Itália	RIFI	100	8	8,0
2009	Romero et al.	Colômbia	RIFI	270	185	68,5
2009	Toz et al.	Turquia	RIFI	140	29	20,7
2010	Cabézon et al.	Espanha	PCR	48	21	43,8
2010	Cruz et al.	Argentina	RIFI	102	40	39,2
2010	Faye et al.	Senegal	PCR	160	57	35,6
2010	Khanmohamadi et al.	Irã	RIFI	384	33	11,8
2011	Kovalenko et al.	Uzabequistão	PCR	116	10	8,6
2011	Kovalenko et al.	Uzabequistão	ELISA	162	51	31,5

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA= Ensaio Imunoenzimático Indireto; PCR= Reação em cadeia de polimerase

2.3 Ciclo evolutivo

No Brasil, o principal inseto relacionado com a transmissão da leishmaniose é a *Lutzomia longipalpis*, porém, recentemente o *Lutzomyia cruzi* foi identificado como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006).

O vetor se infecta ingerindo durante o repasto sanguíneo, formas amastigotas do parasito, presentes nas células do sistema monocítico fagocitário encontradas na derme do hospedeiro infectado. No tubo digestivo do inseto, transformam-se em promastigotas, que se multiplicam após três a quatro dias do primeiro repasto. Sequencialmente, a fêmea do flebotomíneo infectado inocula essas formas infectantes, contaminando o hospedeiro; estas, então, são fagocitadas por macrófagos, retornando à forma amastigota, onde se multiplicam, causando rompimento da célula. Desta maneira, ocorre disseminação hematogênica para os tecidos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea (LAINSON et al., 1987).

2.4 Sinais Clínicos

No homem, o período de incubação varia entre dez dias a 24 meses, sendo, em média, dois a seis meses. No cão, a variação é maior, entre três meses a vários anos, tendo média de três a sete meses (BRASIL, 2006).

A leishmaniose manifesta-se no cão de maneira variável: enquanto alguns animais demonstram poucos sintomas, como raras lesões dermatológicas, outros apresentam-se caquéticos, com manifestações cutâneas, descamação, nódulos e úlceras, que são freqüentes nas bordas das orelhas, podendo ser encontradas distribuídas por toda a superfície corpórea. Casos de conjuntivite, blefarite, edema de focinho, onicogribose, paresia das patas posteriores e caquexia têm sido relatados. Nas fases adiantadas da doença, ocorrem esplenomegalia, linfadenopatias, diarreias e hemorragia intestinal (FEITOSA et al., 2000; SILVA et al., 2001).

2.5 Diagnóstico

Para a realização do diagnóstico são utilizadas provas sorológicas, porém, cães infectados podem ser soronegativos, ou animais soropositivos podem não apresentar a doença. Esse fato pode ser devido à proximidade filogenética existente entre *Leishmania* spp. e outros hematozoários, principalmente o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que pertencem a mesma família Tripanosomatidae, propiciando a ocorrência de reações cruzadas à sorologia (TRONCARELLI et al., 2008).

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos como punção hepática, esplênica e o raspado cutâneo (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) começou a ser utilizada a partir de 1960 em humanos (ALVES; BEVILACQUA, 2004), além de ser um teste rápido, fácil de se executar e de baixo custo (IKEDA-GARCIA; FEITOSA, 2006).

O teste ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) representa um método simples e rápido para pesquisa desta infecção canina (LIMA et al., 2005; SCALONE et al., 2002.), com a possibilidade de processamento de considerável número de amostras em curto intervalo de tempo (MAIA; CAMPINO, 2008).

O Ministério da Saúde preconiza como técnica sorológica de triagem o ELISA e a RIFI, como teste confirmatório da doença. Os animais soropositivos, apresentando sintomas ou assintomáticos, devem ser eutanasiados (BRASIL, 2006).

Com o desenvolvimento da técnica de PCR (reação em cadeia polimerase), é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do cinetoplasto do parasita, sendo uma técnica mais específica e sensível (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

3 Doença de Chagas

3.1 Etiologia

Seu agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), pertencente ao subfilo Mastigophora, do filo Sarcomastigophora, classe Kinetoplastidae e ordem Kinetoplastida (SOUZA et al., 1984).

Existem vários outros tripanosomas que parasitam animais e homens, como o *T. congolensis*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. brucei*, *T. evansi* e *T. rangeli* (HERRERA et al., 2005).

Anteriormente, era considerada uma enfermidade de caráter enzoótico, pois seu ciclo se restringia a mamíferos e triatomíneos de hábitos silvestres. Devido ao desequilíbrio do ecossistema, os vetores invadiram os abrigos de animais domésticos e do homem, propiciando a transmissão do *T. cruzi* para esses hospedeiros susceptíveis (BARRETO, 1965).

Os veiculadores mais importantes epidemiologicamente são os do gênero *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*, conhecidos popularmente como bicho barbeiro. Atualmente, as espécies destes vetores presentes no estado de São Paulo são predominantemente peridomiciliares, destacando-se, entre elas, o *Rhodnius neglectus* encontrado na região de Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e Araçatuba, SP (SILVA et al., 2001).

Vários mamíferos são importantes reservatórios de *T. cruzi*, porém no ambiente doméstico, o cão apresenta destaque, devido à preferência alimentar do vetor para essa espécie (CRISANTE et al., 2006) e também devido à grande proximidade existente entre homem e cão, assumindo enorme relevância epidemiológica nesta zoonose, bem como sob o aspecto zoonótico (ELOY; LUCHEIS, 2009).

3.2 Epidemiologia

O Quadro 3 representa a ocorrência de *T. cruzi* detectada no continente americano.

Quadro 3 – Ocorrência de *Trypanosoma cruzi* em cães descrita por diversos autores, no continente americano

Ano	Autor (es)	Local	Técnica	Número de cães examinados	Número de cães reagentes	Positividade (%)
1991	Barr et al.	Estados Unidos da América	ELISA	85	4	4,7
1995	Garcia-Vazquez et al.	México	ELISA	500	121	24,2
1998	Lauricella et al.	Argentina	RIFI	182	74	41,0
2002	Montenegro et al.	Costa Rica	RIFI	54	14	25,9
			ELISA		14	25,9
2004	Shadomy et al.	Estados Unidos da América	ELISA	356	53	14,9
2006	Crisante et al.	Venezuela	RIFI	565	382	67,6
2006	Estrada-Franco et al.	México	ELISA	114	24	21,0
2009	Cruz-Chan et al.	México	ELISA	143	16	11,2
2009	Nieto et al.	Estados Unidos da América	RIFI	122	27	22,1
2009	Souza et al.	Brasil	RIFI	75	34	45,3
			ELISA		18	24,0
2009	Troncarelli et al.	Brasil	RIFI	200	4	2,0
2010	Jiménez-Coelho et al.	México	RIFI	35	12	34,0
2011	Balan et al.	México	RIFI	262	20	7,6
2011	Barbosa-Pilego et al.	México	ELISA	102	25	24,5
2011	Tome et al.	Brasil	RIFI	689	3	0,4

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA= Ensaio Imunoenzimático Indireto;

3.3 Ciclo Evolutivo

Os vetores, em qualquer estágio de sua vida, infectam-se ao ingerirem as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro

vertebrado infectado, durante o hematofagismo. Estas mesmas formas, que se multiplicam no intestino do triatomínio, são eliminadas em suas fezes, durante ou logo após o repasto sanguíneo (LEVINE, 1985).

3.4 Sinais Clínicos

A fase aguda da doença pode ser sintomática ou não, com duração de aproximadamente dois meses, acometendo cães jovens entre cinco a seis meses de idade; infecções generalizadas, com lesões no miocárdio e sistema nervoso central, anorexia, linfadenopatias, diarreia, miocardite, ou até morte por arritmias cardíacas podem ser evidenciadas. A fase crônica, após oito a 36 meses da infecção inicial, se caracteriza por apresentar arritmias ventriculares e dilatação do miocárdio. Sinais de insuficiência cardíaca aparecem, inicialmente, no lado direito do coração, progredindo para uma insuficiência biventricular (LAPPIN, 2004).

3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da tripanossomíase pode ser feito pela pesquisa do parasito em esfregaço sanguíneo, xenodiagnóstico, cultura de sangue, amostras de punção de medula óssea e linfonodo (LUCHEIS et al., 2005), além de provas indiretas onde ocorre a pesquisa por anticorpos da doença. Os métodos sorológicos utilizados são o ELISA e RIFI (LAURICELLA et al., 1998).

Dessa forma, são necessárias pesquisas que padronizem, comparem e aperfeiçoem os métodos de diagnósticos para as duas zoonoses, facilitando o controle nos reservatórios e, conseqüentemente, nos humanos. Especialmente para leishmaniose, os programas de vigilância devem preconizar um diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade para que os cães sejam diagnosticados precocemente, evitando a realização da eutanásia inutilmente, ou a permanência do cão positivo como fonte de infecção para o homem (TRONCARELLI, 2008).

4 Reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* existentes na utilização de provas sorológicas

A reação cruzada entre *T.cruzi* e *Leishmania* spp. em exames sorológicos é freqüente, devido à proximidade filogenética existente entre os dois parasitos (SUNDAR; RAI, 2002).

Em um estudo comparativo da RIFI em amostras de sangue de cães experimentalmente infectados com diferentes tripanosomatídeos, Costa et al. (1991) observaram reação cruzada entre a leishmaniose visceral com a doença de Chagas em 83,3% (MAYWALD et al., 1996).

Em um estudo realizado por Zanette et al. (2006) na região de Araçatuba, SP, foi verificado que dos 14 cães positivos para leishmaniose, 9 foram positivos para tripanossomíase, utilizando o método de ELISA.

Troncarelli et al. (2009) utilizando RIFI, PCR e exame parasitológico direto de fígado e baço, observaram que 16,5% (33/200) dos cães apresentaram títulos para ambas as zoonoses, sendo que em 90,9% (30/33) foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos esfregaços e todos os animais apresentaram PCR negativo para *T.cruzi*.

Em casos onde ocorre reação cruzada, deve-se levar em conta o resultado sorológico, sinais clínicos e fatores epidemiológicos e também realizar outra forma diagnóstica comprobatória (LUCIANO et al., 2009).

OBJETIVO

Considerando- a reconhecida similaridade filogenética entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. (SUNDAR; RAI, 2002), o consequente risco de resultados falso-positivos para estes parasitos (ZANETTE, 2006), a elevada ocorrência de cães eutanasiados devido à leishmaniose visceral nesta área endêmica (NUNES et al., 2008) e a inexistência de levantamentos epidemiológicos sobre a tripanossomose canina na região, foi elaborado este estudo com o objetivo de detectar reações cruzadas por estes dois protozoários no município de Araçatuba, SP.

REFERÊNCIAS

ABDEEN, Z.A.; SAWALHA, S.S.; EISENBERGER, C.L.; KHANFAR, H.M.; GREENBLATT, C.L.; YOUSEF, O.; SCHNUR, L.F.; AZMI, K.; WARBURG, A.; BADER, K.A.; JAFFE, C.L.; BANETH, G. Epidemiology of visceral leishmaniasis in the Jenin district, West Bank: 1989-1998. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 66, n. 4, p. 329-333, 2002.

ALMEIDA, A.B.P.F.; FARIA, R.P.; PIMENTEL, M.F.A.; DAHROUG, M.A.A.; TURBINO, N.C.M.; SOUSA, V.R.F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, p.156-159, 2009.

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

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1026, p. 154-157, 2004.

ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; ARRUDA, C.C.P.; SANTOS, M.F.C.; ROCCA, M. E.G.; AQUINO, R.B. Estudo epidemiológico das leishmanioses em áreas de turismo ambiental e ecoturismo, Estado de Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** v. 42, n. 5, p. 488-493, 2009.

AZEVEDO, M.A.; DIAS, A.K.; DE PAULA, H.B.; PERRI, S.H.; NUNES, C.M. Canine visceral leishmaniasis evaluation in Poxoréu, Mato Grosso State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 17, n. 3, p. 123-127, 2008.

BALAN, L.U.; YERBES, I.M.; PIÑA, M.A.N.; BALMES, J.; PASCUAL, A.; HERNÁNDEZ, O.; LOPEZ, R.; MONTEÓN, V. Higher seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs than in humans in an area of Campeche, Mexico. **Vector-Borne and Zoo. Dis.** v. 11, n.7, p. 843-844, 2011.

BALCIOGLU, I.C.; ERTABAKLAR, H.; PASA, S.; OZBEL, Y.; TOZ, S.O. Natalia ili ve ilçelerindeki Dört Köpek Barinagında leishmaniasis seroprevalansinin Arastirilmesi. **Türkiye Parazitoloji Dergisi.** V.33 n. 1, p. 4-7, 2009.

BARBOSA-PILEGO, A.; GIL, P.C.; HERNÁNDEZ, D.O.; APARICIO-BURGOS, J.E.; OCA-JIMÉNEZ, R.M.; MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, J.S.; OCHOA-GARCÍA, L.; GUZMÁN-BRACHO, C.; ESTRADA-FRANCO, J.G.; GARG, N.J.; CHAGOYÁN, J.V. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in Dogs (*Canis familiaris*) and Triatomines During 2008 in a Sanitary Region of the State of Mexico, Mexico. **Vector-Borne and Zoo. Dis.** v. 11, n. 2, p. 151-156, 2011.

BARR, S.C.; DENNIS, V.A.; KLEI, T.R. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine populations of southern Louisiana. **Am. J. Vet. Res.** v. 52, n. 4, p. 570-573, 1991.

BARRETO, M. P. Tripanossomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação como o agente etiológico da doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 7, p. 305-315, 1965.

BEPA. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010 **Bol. Epidemiol. Paul.**, v. 7, p. 21-40, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral**. 2010. Disponível em : (<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>). Acesso em 19 de jul. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: M S., 2006 p. 9-18.

CABEZÓN, O.; MILLÁN, J.; GOMIS, M.; DUBEY, J.P.; FERROGLIO, E.; ALMERÍA, S. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. **Parasitol. Res.** v. 107, p. 1505-1508, 2010.

CHARQUI, N.; HAOUAS, N.; GORCII, M.; LAHMAR, S.; GUESMI, M.; BEN ABDELHAFIDH, A.; MEZHOUD, H.; BABBA, H. Use of PCR, IFAT and in vitro culture in the detection of *Leishmania infantum* infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. **Parasite**. v. 16, n. 1, p. 65-69, 2009.

CORTADA, V.M.C.L.; DOVAL, M.E.C.; SOUZA LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.V.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.F.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Vet. Res. Comm.** v. 28, p. 365-374, 2004.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, p. 21-25, 1991.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; BRAGA, S.L.; MORAIS, M.H.F.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M.A. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil ad identified by molecular methods. **PLos. Negl. Trop. Dis.** v. 5, n. 8, 1291 p., 2011.

CRISANTE, G.; ROJAS, A.; TEIXEIRA, M.M.; AÑEZ, N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. **Acta Trop.**, v. 98, p. 247-254, 2006.

CRUZ, I.; ACOSTA, L.; GUTIÉRREZ, M.N.; NIETO, J.; CAÑAVATE, C.; DESCHUTTER, J.; BORNAY-LLINHARES, F.J. A canine leishmaniasis pilot suervey in na emergind focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Miniones, Argentina). **Infectious Diseases.** v. 10, 342p., 2010.

CRUZ-CHAN, J.V.; BOLI-GONZÁLEZ, M.; COLÍN-FLORES, R.; RAMIREZ-SIERRA, M.J.; QUIJANO-HERNANDEZ, I.; DUMONTEIL, E. Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 162, p. 151-155, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological suervey on canine leishmaniasis among dogs from an urban área of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 140, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L.A.; MELO M.F.; SILVA, F.J.; SILVA, A.L.; ALMEIDA, E.L.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 170, p. 313-317, 2010.

DEREURE, J.; EL-SAFI, S.H.; BUCHETON, B.; BONI, M.; KHEIR, M.M.; DAVOUST, B.; PRATLONG, F.; FEUGIER, E.; LAMBERT, M.; DESSEIN, A.; DEDET, J.P. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationship. **Microbes and Infection**. v. 5, p. 1103-1108, 2003.

DIAS, E.S.; REGINA-SILVA, S.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PAZ, G.F.; MICHALSKY, E.M.; ARAÚJO, S.C.; VALADÃO, J.L.; DE OLIVEIRA LARA-SILVA, F.; DE OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; FORTES-DIAS, C.L. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban área of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 176, n. 2-3, p. 101-111, 2010.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas Disease control in latin América- a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p.603-12, 2002. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2011.

ELOY, L.J.; LUCHEIS, S.B. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, v. 15, p. 589-611, 2009.

ERTABAKLAR, H.; TOZ, S.O.; OZKAN, A.T.; RASTGELDI, S.; BALCIOGLU, I. C.; OZBEL, Y. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Abatolia, Turkey: Corum province. **Acta. Trop.** v. 93, p. 239-246, 2005.

ESTRADA-FRANCO, J.G.; BHATIA, V.; DIAZ-ALBITER, H.; OCHOA-GARCIA, L.; BARBABOSA, A.; VAZQUEZ-CHAGOYAN, J.C.; MARTINEZ-PEREZ, M.A.; GUZMAN-BRACHO, C.; GARG, N. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, México. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p.624-630, 2006.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PORROZZI, R.; COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR, G. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 80, n. 4, p. 559-565, 2009.

FAYE, B.; BAÑULS, A.L.; BUCHETON, B.; DIONE, M.M.; BASSANGANAM, O.; HIDE, M.; DEREURE, J.; CHOISY, M.; NDIAYE, J.L.; KONATE, O.; CLAIRE, M.; SENGHOR, M.W.; FAYE, M.N.; SY, I.; NIANG, A.A.; MOLEZ, J.F.; VICTOIR, K.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KNECHT, R.; MELLUL, S.; DIEDHIOU, S.; GAYE, O. Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? **Microbes and Infection.** v. 12, p. 1219-1225, 2010.

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

FELIPE, I.M.A.; AQUINO, D.M.C.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M.D.C.; RANGEL, M.E.S.; BARBOSA, D.S.; BARRAL, A.; WERNECK, G.L.; CALDAS, A.J.M. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERNÁNDEZ, J.; BELLO, F.; LÓPEZ, M.C.; MONCADA, L.I.; VARGAS, J.J.; AYALA, M.S.; NICHOLLS, R.S.; LOZANO, C.A. Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in sector 8 of Neiva and in four municipalities of Huila, Colombia. **Biomedica.** v. 1, p. 121-130, 2006.

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 diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet. Parasitol.** v., 146, p. 235-241, 2007.

FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F.; NASCIMENTO, L.D.; ABRANTES, T.R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S.R.L.; SCHUBACH, T.M.P. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.52, n. 4, p. 193-196, 2010.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol.** v., 111, p. 161-173, 2003.

FREHSE, M.S.; GRECA JÚNIOR, H.; ULLMANN, L.S.; CAMOSSO, L.G.; MACHADO, J.G.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, p.62-64, 2010.

GARCIA-VAZQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; MIRANDA-MIRANDA, E.; DOMINGUEZ-MARQUEZ, A. Serological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs or two urban áreas of México. **Prev. Vet. Med.**, v. 25, p.1-6, 1995.

GONTIJO, C.M.F.; SILVA, E.S.; FUCCIO, M.B.; SOUSA, M.C.A.; PACHECO, R.S.; DIAS, E.S.; ANDRADE FILHO, J.D.; BRAZIL, R.P.; MELO, M.N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta. Tropica.** v. 81, p. 143-150, 2002.

GROSJEAN, N.L.; VRABLE, R.A.; MURPHY, A.J.; MANSFIELD, L.S. Seroprevalence of antibodies against *Leishmania* spp. among dogs in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 222, n. 5, p. 603-606, 2003.

GUERRA, J.A.O.; BARROS, M.L.B.; FÉ, N.F.; GUERRA, M.V.F.; CASTELLON, E.; PAES, M.G.; SHERLOCK, I. A. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

GUIMARÃES, K.S.; BATISTA, Z.S.; DIAS, E.L.; GUERRA, R.M.S.N.C.; COSTA, A.D.C.; OLIVEIRA, A.S.; CALABRESE, K.S.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; ZAVERUSCHA DO VALE, T.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; ABREU-SILVA, A.L. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 131, p. 305-309, 2005.

HARRAT, Z.; BELKAID, M. Leishmaniasis in Algiers: epidemiologic data. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** v.96, n. 3, p. 212-214, 2003.

HASSAN, M.M.; OSMAN, O.F.; EL-RABAA, F.M.A.; SCHALLIG, H.D.F.H.; ELNAIEM, D.E.A. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. **Parasites & Vectors.** v. 2, 26p., 2009.

HEADINGTON, C.E.; BARBARA, C.H.; LAMBSON, B.E.; HART, D.T.; BARKER, D.C. Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 96, n. 1, p. 195-197, 2002.

HERRERA, L.; D'ANDREA, P.S.P.; XAVIER, S.C.C.; MANGIA, R.H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park "Serra da Capivara" and its surroundings (Piauí, Brazil), an

area endemic for Chagas disease. **Transac. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, p. 379-388, 2005.

IKEDA-GARCIA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnostico da leishmaniose visceral canina. **Clin. Vet.**, v. 62, p.32-38, 2006.

JIMENÉZ-COELHO, M.; GUZMÁN-MARÍN, E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ACOSTA-VIANA, K.Y. Serological survey of American trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Mérida Yucatàn, México. **Transbound. Emerg. Dis.** v. 57, p. 33-36.

KHANMOHAMMADI, M.; FALLAH, E.; RAHBARI, S.; SOHRABI, I.; FARSHCHIAN, M.; HAMZAVI, F.; ASL, A.M. Study on seroprevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL) in ownership dogs of Sarab, East Azerbaijan, Province, Northwest of Iran with indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and its health importance in 2008-2009. **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 9, p.139-143, 2010.

KOVALENKO, D.A.; RAZAKOV, S.A.; PONIROVSKY, E.N.; WARBURG, A.; NASYROVA, R.M.; PONOMAREVA, V.I.; FATULLAEVA, A.A.; NASEREDDIN, A.; KLEMENT, E.; ALAM, M.Z.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L.; SCHONIAN, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis and its relationship to human visceral leishmaniasis in Eastern Uzbekistan. **Parasites & Vectors.** v. 4, 58p., 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 517, 1987.

LAPPIN, M.R. Infecções protozoárias e mistas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Veterinária Interna** : Moléstias do cão e do gato. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 437-438.

LAURICELLA, M.A.; CASTANERA, M.B.; GURTLE, R.E.; SEGURA, E.L. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas'Disease) infection in naturally infected dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 93, n.4, p.501-507, 1998.

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

LEVINE, N.D. In: _____. The hemoflagellates. **Veterinary protozoology**.1 ed. Iowa: Iowa State University Press; 1985, p. 42-45.

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

LINDOSO, J.A.L.; GOTO, H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. **Bol. Epidemiol. Paul.**, v.3, n.26, 2006.

LUCHEIS, S.B.; DA SILVA, A.V.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; LANGONI, H.; MEIRA, D.A.; MARCONDES-MACHADO, J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, v. 11, p. 492-509, 2005.

LUCIANO, R.M.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de

imunofluorescência indireta (RIFI). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 46, p. 181-187, 2009.

LUKES, J.; MAURICIO, I.L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K.W.Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATIONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F.J.; MILES, M.A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PNAS.**, v.104, n.22, p.9375-9380, 2007.

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

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v. 158, p. 274-287, 2008.

MALAQUIAS, L.C.C.; ROMUALDO, R.C.; ANJOS JR, J.B.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. **Parasitol. Res.** v. 100, p. 233-239, 2007.

MARESCA, C.; SCOCCIA, S.; BARIZZONE, F.; CATALANO, A.; MANCINI, S.; PAGLIACCI, T.; PORRINI, M.; PRINCIPATO, M.; VENDITTI, G.; GRELLONI, V. A survey on canine leishmaniasis and phlebotomine sand flies in central Italy. **Res. Vet. Sci.** v. 87, p. 36-38, 2009.

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

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.D. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 147-152, 2005.

MONTENEGRO, V.M.; JIMÉNEZ, M.; DIAS, J.C.P.; ZELEDÓN, R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 4, p. 491-494, 2002.

NASEREDDIN, A.; EREGAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C.L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J. Parasitol.** v. 92, n. 1, p. 178-183, 2006.

NATAMI, A.; SAHIBIB, H. LASRIB, S.; BOUDOUA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSIC, N.; RHALEMB, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the khemisset province, Morocco. **Vet. Res.** v. 31, p. 355-363, 2000.

NIETO, P.D.; BOUGHTON, R.; DORN, P.L.; STEURER, F.; RAYCHAUDHURI, S.; ESFANDIARI, J.; GONÇALVES, E.; DIAZ, J.; MALONE, J.B. Comparison of two immunochromatographic assays and the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in south central Louisiana. **Vet. Parasitol.**, v. 165, p. 241-247, 2009.

NOGUEIRA, S. **Consumidor deve ficar atento**. 2005. Disponível em: <<http://www.unb.br/acs/unbagencia/ag0405-03.htm>>. Acesso em: 19 jun.2011.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.F.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in na área endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 19-23, 2008.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B.; ZINEZZI, R.O.; SAVANI, E.S.M.M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M.C.G.O.; DAURIA, S.R.N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H.C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 299-300, 2001.

OLIVEIRA, L.C.P.; ARAÚJO, R.R.; ALVES, C.R.; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J.A.; MENDONÇA-LIMA, F.W. Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina na área endêmica de Dias D'ávila, Estado da Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.** v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; CAPRARIIS, D.; STANNECK, D.; TESTINI, G.; GRIMM, F.; DEPLAZES, P.; CAPELLI, G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in na área where leishmaniasis is endemic. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, p. 337-343, 2009.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JUNIOR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 39-44, 1996.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C.L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.; SCHNUR, L.F.; JACOBSON, R.L. Serodiagnosis of canine visceral

leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

RAMI, M.; ATARHOUCHE, T.; SABRI, M.; CADI, S.M.; BENAZZOU, T.; DAKKAK, A. Canine leishmaniasis in the Rif mountains (Moroccan Mediterranean coast): a seroepidemiological survey. **Parasite.** v. 10, n. 1, p. 79-85, 2003.

ROMERO, M.H.; LÓPEZ, M.C.; SANCHEZ, J.A. Búsqueda active de casos de leishmaniasis visceral zoonótica em población infantil indígena y canina colombiana. **Rev. Salud. Públ.** v. 11, n. 6, p. 944-951, 2009.

RONDON, F.C.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R.; ALCÂNTARA, A.C.; DINIZ, A.T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 155, p. 24-31, 2008.

ROSYPAL, A.C.; CORTE´S-VECINO, J.A.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; TIDWELL, R.R.; LINDSAY, D.S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 172-177, 2007.

SANTOS, J.M.L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M.R.F.; LINO, F.R.L.; ANDRADE, L.S.S.; SOUZA, R.C.A.; BRITO, F.L.C.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães de Garanhuns, agreste de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 41-45, 2010.

SAO PAULO (ESTADO). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças –

CCD. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo.** São Paulo, 2006. 158p.

SAVANI, E.S.M.; SCHIMONSKY, B.V.; CAMARGO, C.O.M.; DAURIA, S.R.N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Rev. Saúde Pública.**, v. 37, p. 260-262, 2003.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Parasitol.**, v. 104, p. 275-285, 2002.

SHADOMY, S.V.; WARING, S.C.; CHAPPELL, C.L. Combined use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Flow Cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. **Clin. Diag. Lab. Immun.** v. 11, n.2, p. 313-319, 2004.

SIDERIS, V.; KARAGOUNI, E.; PAPADOPOULOU, G.; GARIFALLOU, A.; DOTSIKA, E. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. **Parasite.** v. 3, n. 2, p. 125-130, 1996.

SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Vet. Parasitol.**, v.97, p.199-207, 2001.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública.**, v. 21, p. 324-328, 2005.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; PEREIRA, D.P.; BRAZIL, R.P.; CARREIRA, J.C.A. Canine leishmaniasis in Brazil: serological follow-up of a dog population in na endemic area of American visceral leishmaniasis. **J. Parasitol. Res.** 6p., 2009.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R.P. Short report: detection of *leishmania* dna by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 6, p. 896–898, 2001.

SILVA, E.S.; ROSCOE, E.H.; ARRUDA, L.Q.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; BRAZIL, R.P. Leishmaniose visceral canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 23, n. 3, p. 111-116, 2001.

SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; GONTIJO, C.M.F.; SCHALLIG, H.D.F.H.; BRAZIL, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic área of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Vet. Res. Comm.** v. 30, p. 637-643, 2006.

SOUZA, A.G.; BURALLI, G.M.; WANDERLEY, D.M.V.; ANDRADE, J.C.R. Consolidation of the control of Chagas'disease vectors in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.79, p.125-131, 1984.

SOUZA, A.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; CAMACHO, A.A. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n. 2, p. 150-152, 2009.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 951-958, 2002.

TAMER, G.S.; POLAT, E.; TÖZ, S.O.; ALTAS, K. Kocaeli Sokak Köpeklerinde visseral leishmaniasis seroprevalansı. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**. V. 32, n. 3, p. 183-186, 2008.

TOME, R.O.; GAIO, F.C.; GENEROSO, D.; MENOZZI, B.D.; LANGONI, H. Active surveillance of canine visceral leishmaniasis and american trypanosomiasis in rural dogs from non endemic area. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 20, n. 1, p. 64-66, 2011.

TOZ, S.O.; SAKRU, N.; ERTABAKLAR, H.; DEMIR, S.; SENGUL, M.; OZBELI, Y. Serological and entomological survey of zoonotic visceral leishmaniasis in Denizli Province, Aegean region, Turkey. **New Microbiologica**. v. 32, p. 93-100, 2009.

TRONCARELLI, M.Z. **Infecção por *Leishmania* spp. elou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina**. 2008. 112f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic áreas for canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 164, p. 118-123, 2009.

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

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution. 2005. WHO/CTD. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>>. Acesso em 27 de jul. 2010.

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

CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS POR *Leishmania* spp. E *Trypanosoma* spp. EM CÃES POR MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES

RESUMO - O objetivo deste estudo foi detectar reações cruzadas por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. por métodos sorológicos e moleculares. Assim, foram colhidas 408 amostras sanguíneas de cães domiciliados no município de Araçatuba, SP, de ambos os sexos, de diversas raças e com idade a partir de seis meses. Estas foram processadas pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo esta última considerada como teste-ouro. Em relação à *Leishmania* spp., pela RIFI, 14,95 % (61/408) foram reagentes. A positividade por meio do ELISA, foi de 20,10% (82/408) e pela PCR, 29,66% (121/408), havendo diferença significativa em relação aos machos adultos ($p < 0,05$). Para *Trypanosoma* spp., a ocorrência de anticorpos pelo ELISA, foi de 10,54% (43/408) e, pela PCR, 2,45% (10/408) dos cães foram positivos. Pela RIFI, 10,29% (42/408) dos animais foram considerados positivos e somente o sexo apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Neste trabalho, constatou-se que 10,54% (43/408) dos animais foram soropositivos por ELISA para *Trypanosoma* spp., sendo que 79,07% (34/43) obtiveram resultados positivos no diagnóstico molecular para *Leishmania* spp. e dos 10,29% (42/408) positivos por RIFI, 95,24% (40/42) dos cães confirmaram a infecção por este parasita. Por meio dos resultados obtidos, pode-se inferir que foram evidenciadas reações cruzadas por ambos os protozoários nos animais analisados neste trabalho.

Palavras-chave: Biologia molecular, Leishmaniose visceral, Sorologia, Tripanossomíase canina

1 Introdução

No estado de São Paulo (SP), infecção por *Trypanosoma cruzi* já foi detectada em cães (LUCHEIS et al., 2005; TRONCARELLI et al., 2009), mas não existem registros de casos no município de Araçatuba, SP. Dados obtidos na Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) desta localidade indicaram que 3227 animais estavam infectados por *Leishmania* spp. no período de 2006 a 2010. Na Secretaria de Saúde deste Estado, foram registrados um total de 1512 casos humanos e 138 óbitos de 1999 a 2009, sendo que, em 2008, 291 pessoas foram diagnosticadas com leishmaniose e destas, 23 faleceram (BEPA, 2010).

O Ministério da Saúde preconiza como técnica de triagem o Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como teste confirmatório da doença. Os animais soropositivos, apresentando sinais clínicos ou assintomáticos, devem ser eutanasiados (BRASIL, 2006). Por meio da Reação em Cadeia Polimerase (PCR), é possível identificar e ampliar seletivamente o DNA do cinetoplasto do parasita, sendo uma técnica mais específica e sensível que os métodos sorológicos (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Considerando a reconhecida similaridade filogenética entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. (SUNDAR; RAI, 2002), o consequente risco de resultados falso-positivos para estes parasitos (ZANETTE, 2006), a elevada ocorrência de cães eutanasiados devido à leishmaniose visceral nesta área endêmica (NUNES et al., 2008) e a inexistência de levantamentos epidemiológicos sobre a tripanossomose canina na região, foi elaborado este estudo, com o objetivo de detectar reações cruzadas por estes dois protozoários no município de Araçatuba, SP.

2 Material e Métodos

Este trabalho foi conduzido com aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia (FOA) UNESP, protocolo número 2008-009611.

População de estudo: 408 cães domiciliados, de ambos os sexos, independente da raça e idade a partir de seis meses.

Variáveis: raça, sexo e idade dos animais envolvidos no estudo. Em relação às faixas etárias, foram considerados jovens, adultos e idosos, de seis a 12, de 13 a 84 e acima de 85 meses, respectivamente. Um banco de dados foi elaborado, utilizando-se as variáveis com os respectivos resultados de cada cão.

Colheita e processamento do sangue: Cinco a oito mililitros de sangue foram colhidos da veia cefálica de 408 cães provenientes do Município de Araçatuba, SP. As referidas amostras foram armazenadas em tubos sem anti coagulante e foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para a obtenção dos soros. Alíquotas de sangue total foram armazenadas em tubos contendo citrato de sódio para a PCR. Todas estas amostras foram congeladas a -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos ou moleculares.

Exames sorológicos

A técnica de RIFI foi realizada conforme Camargo (1966), com utilização de lâminas de imunofluorescência impregnadas com antígenos de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*, com ponto de corte 1:40 e 1:20, respectivamente.

Para a preparação do antígeno, ambos os parasitas foram mantidos em cultura a 26°C em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis U.S.A.). A preparação do antígeno e o procedimento do ensaio ELISA para *Leishmania* spp. foram

realizados como descrito por Lima et al. (2003). Para a realização do ELISA para detecção de anticorpos anti *T.cruzi* foi realizada titulação em bloco para determinação da diluição do soro, do anticorpo anti Ig G conjugado a peroxidase e também definição da concentração do antígeno. Para este fim foram utilizadas amostras negativas de cães saudáveis fora da área endêmica e amostras positivas de cães infectados com *T.cruzi*. Os melhores resultados que discriminaram as amostras positivas das negativas foram utilizadas no ensaio. Desta maneira, uma placa de poliestireno foi coberta com 4 µg/ml de antígeno total do parasito (LIMA et al., 2003; RIERA et al., 1999), em 4,5 ml de tampão carbonato 0,05M, pH 9,6. Após, incubação a 4°C por toda a noite. Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS com 0,05% Tween 20 e bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente, com 150 µl por poço de uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino. A placa ficou em repouso por 1 hora, em temperatura ambiente coberta com papel filme. Após nova lavagem com PBS com 0,05% Tween 20, as amostras de soro foram diluídas a 1:400 em PBS com 10% de soro fetal bovino e 0,05% Tween 20; foram adicionadas 100 µl em cada poço e incubadas por 3 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBS com 0,05% Tween 20 e foram adicionados 100 µl por poço de anticorpo anti-IgG de cão conjugados à peroxidase (Sigma, St. Louis, U.S.A.), na diluição de 1: 2000. Em seguida, esta foi lavada novamente (PBS com 0,05% de Tween 20) e foram adicionados 100 µl da solução contendo 0,4mg/ml O-phenylenediamine (OPD , Sigma, St. Louis, U.S.A.) em uma solução de H₂O₂ 0,4 µl/ml, 0.1M ácido cítrico, 0.2M fosfato de sódio dibásico. A reação foi bloqueada com 50 µl de HCl. A densidade óptica (DO) foi avaliada utilizando o leitor Spectra CountTM (Packard Bio Science Company, U.S.A.). O ponto de corte foi determinado com o soro de cães saudáveis, de área não endêmica, utilizando como referência a média, mais 4 vezes o desvio-padrão obtido no grupo.

Caracterização molecular

Extração de DNA

A purificação de DNA do sangue periférico dos cães foi realizada após digestão com proteinase K (0,5 µg), extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol (SAMBROOK et al., 1989).

PCR para *Leishmania* spp.

A região conservada de kinetoplasto de *Leishmania* sp. de 120pb foi amplificada, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 13A (5' GTGGGGGAGGGGCGTTCT 3') e 13B (5' ATTTTACACCAACCCCCAGTT 3') descrito por Rodgers et al. (1990).

A amplificação foi realizada em volume de 25 µL contendo 20 nanogramas de DNA genômico, 1,5mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 0,2mM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de *Taq* polimerase platinum (Invitrogen®). As amostras foram amplificadas usando-se o aparelho termociclador (MJ Research Thermal cycler®); neste, as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguido por 63°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, realizada em voltagem constante (100 v) por período de três horas. Após a corrida, o gel foi corado com solução de nitrato de prata. Em todas as reações foram incluídos controle positivo (amostra de DNA de cão com diagnóstico sorológico positivo e sinais clínicos de leishmaniose), controle negativo (DNA de cão com diagnóstico sorológico negativo e sem sinais clínicos de leishmaniose) e controle negativo da reação (sem DNA).

PCR para *Trypanosoma spp.*

Utilizamos os iniciadores P35 (5'AAATAATGTACGGGGAGATGCATGA3') e P36 (5'GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT 3'), segundo protocolo de Sturm et al., 1989, que amplificou um fragmento de 330 pares de base do minicírculo do cinetoplasto do *Trypanosoma spp.* A reação de PCR foi realizada utilizando o kit comercial Platinum Blue PCR Supermix (Invitrogen®), 0,5 µl dos iniciadores P35 (concentração de 10 µM/µl), 0,5 µl dos iniciadores P36 (concentração de 10 µM/µl) e 1,0 µl de DNA.

A amplificação foi realizada em Termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf®), com aquecimento inicial de 96°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 60°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos e o produto final foi armazenado a -20°C até análise.

Para cada reação, foi adicionado um controle negativo (sem DNA), um controle positivo com DNA extraído da cultura de *Trypanosoma spp.* e dois pesos moleculares.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, seguido por coloração com brometo de etídio e visualização em luz UV.

Os iniciadores foi testado nas mesmas condições com o DNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

3 Análise estatística

Para verificar a associação entre as variáveis estudadas e os resultados dos testes diagnósticos empregados, utilizou-se o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Também foi calculada a sensibilidade, especificidade e o coeficiente Kappa para cada teste, considerando a PCR como teste padrão ouro.

4 Resultados

Por meio da análise estatística descritiva, observou-se que, do total de animais, 32,6% (133/408) eram de padrão racial determinado (PRD) e 67,4% (275/408) sem raça definida (SRD), com 47,30% (193/408) de machos e 52,7% (215/408) de fêmeas, sendo que 13,48% (55/408) eram jovens, 75,49% (308/408) adultos e 11,03% (45/408) idosos.

Os oligonucleotídeos P35 e P36, não demonstraram amplificação da banda quando testados para o DNA de *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) chagasi*.

Em relação à *Leishmania* spp., por meio do ELISA, 20,10% (82/408) foram positivos e houve diferença significativa entre machos adultos ($p < 0,05$). Pela RIFI, 14,95 % (61/408) foram reagentes, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis. Pela PCR, 29,66% (121/408) apresentaram amplificação do DNA de *Leishmania chagasi*, sendo que machos adultos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Para *Trypanosoma* spp., a ocorrência de anticorpos pelo ELISA, foi de 10,54% (43/408). Nenhuma variável foi considerada estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Pela RIFI, 10,29% (42/408) dos animais foram considerados positivos e os machos apresentaram maior ocorrência com diferença significativa ($p < 0,05$). Pela PCR, 2,45% (10/408) dos cães foram positivos, não sendo estatisticamente significante ($p > 0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas, como pode ser observado na Tabela1.

Tabela1 - Positividade para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., por meio do ELISA, RIFI e PCR, de acordo com as variáveis raça, idade e sexo de cães do município de Araçatuba, São Paulo.

Variável	Categoria	Positividade <i>Leishmania</i> spp.						Positividade <i>Trypanosoma</i> spp.					
		ELISA		RIFI		PCR		ELISA		RIFI		PCR	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Raça	RD (N=133)	2 5	18,8	17	12,8	35	26,3	12	9,0	13	9,8	6	4,5
	SRD (N=235)	5 7	20,7	44	16,0	86	31,3	31	11, 3	29	10,6	4	1,5
	P	0,6483 ⁽¹⁾		0,3929 ⁽¹⁾		0,3042 ⁽¹⁾		0,4878 ⁽¹⁾		0,8102 ⁽¹⁾		0,0852 ⁽²⁾	
Idade	Jovem (N=55)	4	7,3	4	7,3	5	9,1	3	5,5	4	7,3	2	3,6
	Adulto (N=308)	6 5	21,1	47	15,3	99	32,1	35	11, 4	32	10,4	7	2,3
	Idoso (N=45)	1 3	28,9	10	22,2	17	37,8	5	11, 1	6	13,3	1	2,2
	P	0,0184 ⁽¹⁾		0,1084 ⁽¹⁾		0,0012 ⁽¹⁾		0,4177 ⁽¹⁾		0,6075 ⁽¹⁾		0,7495 ⁽²⁾	
Sexo	Macho (N=193)	4 7	24,4	35	18,1	67	34,7	26	13, 5	27	14,0	5	2,6
	Fêmea (N=215)	3 5	16,3	26	12,1	54	25,1	17	7,9	15	7,0	5	2,3
	P	0,0422 ⁽¹⁾		0,0875 ⁽¹⁾		0,0341 ⁽¹⁾		0,0676 ⁽¹⁾		0,0199 ⁽¹⁾		1,0000 ⁽²⁾	

⁽¹⁾ teste qui-quadrado ⁽²⁾ teste exato de Fisher

N= número

Dos 10,54% (43/408) animais positivos por ELISA para *Trypanosoma* spp. e dos 10,29%(42/408) sororeagentes por RIFI para esta mesma doença, 79,07% (34/43) e 95,24%(40/42) também foram positivos por PCR para *Leishmania* spp., respectivamente.

Dos 2,45% (10/408) cães positivos na PCR para *Trypanosoma* spp., 3,66%(3/82) foram positivos por ELISA para *Leishmania* spp. e 3,25%(2/61) por RIFI para *Leishmania* spp. Pela PCR 0,74% (3/408) dos animais foram positivos para os dois protozoários.

Seis animais foram sorologicamente positivos para *Leishmania* spp. e/ou *Trypanosoma* spp. e negativos na PCR para ambos os protozoários.

Do total de animais, 8,33% (34/408) e 7,60% (31/408) apresentaram positividade para ambas as doenças pelo teste de ELISA e RIFI, respectivamente. Por ambos os métodos, 13,73% (56/408) apresentaram soropositividade para *Leishmania* spp. e 4,17% (17/408) para *Trypanosoma* spp..

Nas Tabelas 2 e 3, podem ser constatados os resultados referentes à positividade e negatividade de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. das duas técnicas sorológicas utilizadas, em comparação ao método molecular.

Tabela 2 - Positividade e negatividade da infecção por *Leishmania* spp. pelo ELISA e RIFI em relação a PCR, em cães no município de Araçatuba, São Paulo.

Teste sorológico	Categoria	PCR					
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	%	
ELISA	Positivo	78	19,1	4	1,0	82	20,1
	Negativo	43	10,5	283	69,4	326	79,9
	Total	121	29,6	287	70,4	408	100,0
RIFI	Positivo	57	14,0	4	1,0	61	15,0
	Negativo	64	15,6	283	69,4	347	85,0
	Total	121	29,6	287	70,4	408	100,0

N= número

Tabela 3 - Positividade e negatividade da infecção por *Trypanosoma* spp. pelo ELISA e RIFI em relação a PCR, em cães no município de Araçatuba, São Paulo.

Teste sorológico	Categoria	PCR					
		Positivo		Negativo		Total	
		N	%	N	%	N	%
ELISA	Positivo	3	0,7	40	9,8	43	10,5
	Negativo	7	1,7	358	87,7	365	89,5
	Total	10	2,4	398	97,5	408	100,0
RIFI	Positivo	4	1,0	38	9,3	42	10,3
	Negativo	6	1,5	360	88,2	366	89,7
	Total	10	2,5	398	97,5	408	100,0

A sensibilidade do ELISA e RIFI em relação à PCR para *Leishmania* spp. foi de 64,5% e 47,1% e a especificidade foi de 98,6% e 98,6%, respectivamente. No caso do *Trypanosoma* spp., a sensibilidade e a especificidade do ELISA, comparativamente ao teste molecular, foi de 30,0% e 90,0% e, para RIFI, 40,0% e 90,5%, respectivamente.

Em relação à concordância entre as provas sorológicas para *Leishmania* spp. e para *Trypanosoma* spp., o coeficiente Kappa foi de 73,84% e 33,02%, respectivamente. O índice de Kappa do ELISA e do RIFI para *Leishmania* spp. com o método de PCR foi de 69,55% e 53,37%, respectivamente. A mesma avaliação foi feita em relação à *Trypanosoma* spp., e o coeficiente Kappa observado foi de 7,65% para o ELISA e 11,90% para a RIFI.

5 Discussão

Os machos adultos apresentaram maior ocorrência de infecção por *Leishmania* spp., tanto pelo ELISA, como pela PCR ($p < 0,05$). Anuradha et al. (1990), avaliando a modulação hormonal em infecções sistêmicas por *Leishmania donovani* entre hamsters de ambos os sexos, verificaram que o nível de testosterona influenciou na susceptibilidade ao parasita. Mancianti et al. (1995), França-Silva et al. (2003), Almeida et al. (2009) e Dantas-Torres et al. (2010) não observaram, pela RIFI, diferença significativa entre as variáveis

estudadas em relação à ocorrência de anticorpos contra este protozoário. Isto contradiz os achados de Zaffaroni et al. (1999) e Dantas-Torres et al. (2006), que também notaram maior proporção de machos adultos infectados. Achados semelhantes a este estudo foram apontados como fator de risco por Queiroz et al. (2009), com o uso do método de ELISA. Esta predisposição sexual pode ser atribuída ao fato de haver uma preferência pela criação de machos para atividades de guarda ou caça, havendo, assim, maior chance de exposição a eventuais picadas do inseto, como também por apresentar maior acesso à rua (QUEIROZ et al., 2009; ZAFFARONI et al., 1999). Isto também justifica a maior positividade evidenciada neste estudo em machos para *Trypanosoma* spp. por RIFI e, no ELISA, por Garcia-Vasquez et al. (1995), enquanto que Jiménez-Coelho et al. (2010) e Pineda et al. (2011) não verificaram pela ELISA e RIFI nenhuma diferença significativa entre as variáveis analisadas.

Seis cães foram sorologicamente positivos para *Leishmania* spp. e/ou *Trypanosoma* spp. e negativos pela PCR para os dois agentes. Isto pode ser explicado, em parte, devido ao fato que o diagnóstico molecular da leishmaniose e da tripanossomíase canina, com utilização de sangue periférico, sabidamente demonstra menores índices parasitêmicos em animais infectados, reduzindo a sensibilidade da referida técnica. Porém, é importante ressaltar que o método de colheita dessas amostras é prático e menos invasivo (FISA et al., 2001; MANNA et al., 2004; NUNES et al., 2007).

Neste trabalho, foi constatada a reação cruzada entre os dois parasitos, pois 10,54%(43/408) dos animais positivos por ELISA para *Trypanosoma* spp., 79,07%(34/43) obtiveram resultados positivos no diagnóstico molecular para *Leishmania* spp. e dos 10,29% (42/408) positivos por RIFI, 95,24% (40/42) dos cães confirmaram a infecção por este parasita. Em um estudo comparativo da RIFI em amostras de sangue de cães experimentalmente infectados com diferentes tripanosomatídeos, Costa et al. (1991) observaram reação cruzada entre anticorpos produzidos na leishmaniose visceral e a doença de Chagas em 83,3%. Troncarelli et al. (2009) utilizando RIFI, PCR e exame parasitológico

direto de fígado e baço, observaram que 16,5% (33/200) dos cães apresentaram títulos para ambas as zoonoses, sendo que em 90,9% (30/33) deles foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* spp. nos esfregaços e todos os animais apresentaram PCR negativo para *T. cruzi*. Em contraste, Rosypal et al. (2007) não detectaram pela RIFI qualquer reação cruzada entre estes dois parasitos.

Na zona urbana do município de Araçatuba, SP, Zanette (2006) verificou, por meio de ELISA e RIFI, que 50 cães positivos para *Leishmania* spp. foram negativos para *Trypanosoma cruzi*. Quando foram analisadas amostras de cães sabidamente positivos para *Trypanosoma cruzi*, 64,3% (9/14) e 42,9% (6/14) destas foram positivas para *Leishmania* spp. por ELISA e RIFI respectivamente.

Umezawa et al. (2009) em avaliação de 50 cães provenientes de Araçatuba, SP, com comprovação parasitológica para *Leishmania* spp., constatarem 4% (2/50) de positividade para *Trypanosoma* spp., com emprego do TESA-ELISA baseado no princípio do uso de antígeno secretado e excretado pela forma tripomastigota deste protozoário. Neste estudo a proporção de soropositivos para *Trypanosoma* spp. pelo ELISA foi 8,33%(34/121), com utilização do antígeno total bruto e a reação molecular de PCR como teste ouro.

Dos dez animais positivos por PCR para *Trypanosoma* spp., três foram positivos por ELISA e PCR e dois por RIFI para *Leishmania* spp., representando, assim, uma possível infecção concomitante.

Os iniciadores utilizado para a realização da PCR para tripanossomíase foi, originalmente, designado para a amplificação do DNA de *T. cruzi* (STURM et al. 1989), contudo, dependendo da proporção do parasito no sangue, pode ocorrer a detecção de DNA de *Trypanosoma rangeli* (LUCHEIS et al., 2005; VALLEJO et al., 1999). Deve-se considerar a possibilidade da ocorrência do *Trypanosoma caninum*, pois, recentemente, Madeira et al. (2009), isolaram em cães esta outra espécie sem patogenicidade aparente. Esta nova espécie não foi encontrada em triatomíneos, sugerindo a possibilidade de outros vetores

estarem envolvidos no ciclo, como o carrapato, mosquitos, pulgas e flebotomíneos, sendo o último vetor o responsável pela transmissão da leishmaniose visceral canina (MADEIRA et al., 2009; PINTO et al., 2010).

Neste estudo foi verificada baixa sensibilidade do ELISA e da RIFI em relação à PCR para *Leishmania* spp., o que também foi evidenciado por Ashford et al. (1995) e por Santos et al. (2010), respectivamente. Por outro lado, foram constatadas porcentagens maiores de sensibilidade em outros trabalhos, que utilizaram como teste ouro o exame parasitológico (METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006), o que impossibilita tecer comparações, pois difere do delineamento experimental adotado no presente trabalho.

Quanto à sensibilidade e especificidade para *Trypanosoma* spp. do RIFI em relação à PCR, esta foi comparativamente menor em relação ao trabalho de Troncarelli et al. (2009), que utilizaram para o teste molecular fragmentos de baço e fígado, diferindo do presente trabalho, onde foram processadas amostras de sangue total.

De acordo com Pereira (2001), os testes de ELISA e de RIFI para *Leishmania* spp. apresentaram uma boa concordância, enquanto, para *Trypanosoma* spp., esta foi sofrível. Comparado com o padrão ouro adotado neste trabalho, os resultados de ELISA e RIFI para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. obtiveram uma concordância considerada boa e fraca, respectivamente.

6 Conclusão

Por meio dos resultados obtidos, pode-se inferir que foram evidenciadas reações cruzadas por ambos os protozoários nos animais analisados neste trabalho.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (processo 2009/50425-2) e pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2008/56676-4).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.B.P.F.; FARIA, R.P.; PIMENTEL, M.F.A.; DAHROUG, M.A.A.; TURBINO, N.C.M.; SOUSA, V.R.F. Inquérito soroprevalencial de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v.42 p.1-8, 2009.

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

ANURADHA, D.; PAL, R.; KATIYAR, J.C. Sex influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamster. **Indian. J. Exp. Biol.** v. 28, p. 876-879, 1990.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR, R. H.; BADARÓ, R.; DAVID, J.R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. **Comitê de leishmaniose visceral americana da secretaria de estado da saúde**. São Paulo, SP, Brasil. v.7, p.21-40, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p. 9-18, 2006.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 8, p.227-234, 1966.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, p. 21-25, 1991.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 140, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L.A.; MELO, M.F.; SILVA, F. J.; SILVA, A.L.; ALMEIDA, E.L.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 170, p. 313-317, 2010.

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

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161-173, 2003.

GARCIA-VAZQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; MIRANDA-MIRANDA, E.; DOMINGUEZ-MARQUEZ, A. A serological survey of *Trypanosoma cruzi*

infection in dogs or two urban áreas of México. **Prev. Vet. Med.**, v. 25, p. 1-6, 1995.

JIMÉNEZ-COELHO, M.; GUZMÁN-MARÍN, E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ACOSTA-VIANA, K.Y. Serological survey of american trypanossomiasis in dogs and their owners from an urban área of Mérida Yucatán, México. **Transb. Emerg. Dis.**, v. 57, p. 33-36, 2010.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 485-489, 2003.

LUCHEIS, S.B.; DA SILVA, A.V.; ARAUJO JUNIOR, J.P.; LANGONI, H.; MEIRA, D.A.; MARCONDES-MACHADO, J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 4, p. 492-509, 2005.

MADEIRA, M.F.; SOUSA, M.A.; BARROS, J.H.S.; FIGUEIREDO, F.B.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; DE PAULA, C.C.; FAISSAL, B.N.S.; FONSECA, T.S.; THOMA, H.K.; MARZOCHI, M.C.A. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol.**, v. 136, p. 411-423, 2009.

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

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRIONGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p. 251-262, 2004.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-linked immnosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstic and gel test) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbial.**, v. 43, p. 5515-5519, 2005.

NUNES, C. M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B.; AZEVEDO, M.A. A.; LIMA, V.F.M.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 16, p. 5-9, 2007.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.F.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in na área endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 19-23, 2008.

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

PINEDA, V.; SALDAÑA, A.; MONFANTE, I.; SANTAMARÍA, A.; GOTTDENKER, N.L.; YABSLEY, M.J.; RAPOPORT, G.; CALZADA, J.E. Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. **Vet. Parasitol.**, v. 178, p. 360-363, 2011.

PINTO, A.G.S.; SCHUBACH, T.M.P.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; FAGUNDES, A.; BARROS, J.H.S.; DE PAULA, C.C.; TOMA, H.K.; MADEIRA,

M.F. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol.**, v. 137, p. 1653-1660, 2010.

QUEIROZ, P.V.S.; MONTEIRO, G.R.G.; MACEDO, V.P.S.; ROCHA, M.A.C.; BATISTA, L.M.M.; QUEIROZ, J.W.; JERÔNIMO, S.M.B.; XIMENES, M.F.F.M. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural áreas of northeast Brazil. **Res. Vet. Sci.**, v. 86, p. 267-273, 2009.

RIEIRA, C.; VALLADARES, J.E.; GÁLLEGO, M. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Vet. Parasitol.**, v. 84, p. 33-47, 1999.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp. Parasitol.**, v.71, p. 267-275, 1990.

ROSYPAL, A.C.; CORTE´S-VECINO, J.A.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; TIDWELL, R.R.; LINDSAY, D.S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 172-177, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANTOS, J.M.L.; DANTAS-TORRE, F.; MATTOS, M.R.F.; LINO, F.R.L.; ANDRADE, L.S.S.; SOUZA, R.C.A.; BRITO, F.L.C.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, agreste de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 1, p. 41-45, 2010.

STURM, N.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 33, p. 205-214, 1989.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 951-958, 2002.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic áreas for canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 164, p. 118-123, 2009.

UMEZAWA, E.S.; SOUZA, A.I.; PINEDO-CANCINO, V.; MARCONDES, M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; CAMACHO, A.A.; STOLF, A.M.S.; TEIXEIRA, M.M.G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Trop.**, v. 11, p. 15-20, 2009.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Trop.**, v. 72, p. 203-212, 1999.

ZAFFARONI, E.; RUBAUDO, L.; LANFRANCHI, P.; MIGNONE, W. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in western Liguria (Italy). **Vet. Parasitol.**, v. 81, p.11-19, 1999.

ZANETTE, M.F. **Comparação entre métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose**

visceral canina. 2006. 70f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.