UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. E/OU POR *Trypanosoma cruzi* EM CÃES PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA E NÃO ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

MARCELLA ZAMPOLI TRONCARELLI

Botucatu – SP
JUNHO 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. E/OU POR *Trypanosoma cruzi* EM CÃES PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA E NÃO ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

MARCELLA ZAMPOLI TRONCARELLI

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

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Co-Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Troncarelli, Marcella Zampoli.
Infecção por *Leishmania* spp. e/ou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina / Marcella Zampoli Troncarelli. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.
Orientadora: Simone Baldini Lucheis
Co-Orientador: Helio Langoni
Assunto CAPES: 50502034

1. Cão - Doenças 2. Leishmaniose visceral canina

CDD 636.70896

Palavras-chave: Cão; Diagnóstico; *Leishmania* spp; *Trypanosoma cruzi*

Nome do Autor: Marcella Zampoli Troncarelli

Título: INFECÇÃO POR *Leishmania* spp. E/OU POR *Trypanosoma cruzi* EM CÃES PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA E NÃO ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Presidente e Orientadora
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

_____
Profa. Ass. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani
Membro Titular
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal
FOA – Curso de Medicina Veterinária - UNESP - Araçatuba

_____
Prof. Ass. Dr. Antonio Carlos Paes
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

_____

Prof. Titular Helio Langoni
Membro suplente
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
Membro suplente
Departamento de Parasitologia
IB – UNESP - Botucatu

Prof. Ass. Dr. Paulo Francisco Domingues
Membro suplente
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 20 de junho de 2008.

"O importante não é estar aqui ou ali, mas ser, e ser é mais uma ciência delicada, feita de pequenas grandes observações do cotidiano, dentro e fora da gente. Se não executamos essas observações, não chegamos a ser. Apenas estamos e desaparecemos"

Carlos Drummond de Andrade

Ao meu marido Luiz Alberto (Beto) e aos meus filhos Pedro e Tiago, que são os grandes amores da minha vida ...

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre iluminar meus caminhos e me abençoar com tantas dádivas;

Ao meu marido Luiz Alberto Troncarelli (Beto), pelo amor, compreensão e companheirismo. Sou muito feliz ao seu lado.

Aos meus amados filhos Pedro e Tiago, meus anjinhos de luz que tornam a minha vida cheia de encanto e ternura.

Aos meus sogros Odila e Edmundo, pelo infinito amor e pela ajuda com as crianças. Vocês contribuíram muito para que tudo isso fosse possível.

À minha mãe Zenaide, por toda a ajuda e amor e ao meu pai José Antonio, pela preocupação e palavras de apoio, mesmo de longe;

À minha querida irmã Gabriella, pelo carinho, amizade e apoio infinitos;

Ao meu irmão Victor Hugo, pelas palavras de incentivo;

À minha orientadora, Dra. Simone Baldini Lucheis, pela amizade sincera e apoio. Você é um exemplo de profissional, mulher e mãe.

Ao Prof. Helio Langoni, meu co-orientador, pelos ensinamentos e companheirismo em todos esses anos de convivência. O senhor é um líder nato. Agradeço também pelo suporte com os materiais que foram utilizados no estudo.

À equipe do Centro de Controle de Controle de Zoonoses de Bauru, em especial aos médicos veterinários Cláudia Gomieri e Neto; aos funcionários de recolhimento de animais; e à equipe do Canil Municipal de Botucatu, em especial ao médico veterinário Paulo Peguinelli; à Tereza e aos funcionários de recolhimento animal, por toda disponibilidade e apoio técnico durante as

colheitas de material. Às Secretarias de Saúde de ambos municípios, que autorizaram a realização das colheitas.

A todos os cães que foram utilizados no estudo, por quem tenho extremo respeito. Apesar de muitos estarem doentes, foi bastante triste acompanhar as eutanásias destes animais.

Ao Prof. Márcio Garcia Ribeiro, pelos direcionamentos e apoio constante, além da ajuda com o Currículo Lattes;

Aos professores Antonio Carlos Paes e Paulo Francisco Domingues pelo apoio e estímulo contínuos, além das contribuições fornecidas durante o exame geral de qualificação;

Ao Prof. Paulo Eduardo Martins Ribolla e ao amigo Alberto Wagner Delmondes Cabral pelas valiosas explicações sobre PCR e pela sua boa vontade em ajudar;

À amiga Juliana Giantomassi Machado, pela amizade sincera e incansável paciência e disponibilidade em ajudar. Você é uma pessoa especial que merece muito sucesso.

À amiga Janaína Biotto Camargo, por toda amizade, presteza e companheirismo durante todo este trabalho;

Ao amigo Rodrigo Costa da Silva, por toda ajuda, especialmente no quesito "Biologia Molecular";

Aos meus "irmãos de orientação" Audrey Braga, Luciano Eloy e Priscila Barbante, pelo companheirismo e troca de experiências. Contem sempre comigo!

Ao amigo André Antonio Cutolo, pela parceria na realização de estudos sobre leishmanioses e saúde pública;

À amiga Patrícia Yoshida Faccioli, pela fiel participação em estudos de vigilância de leishmanioses;

À amiga Amanda Keller Siqueira, pela amizade e troca de experiências sobre casos caninos de leishmaniose;

À amiga Walkiria Delnero Almeida Prado pelos ensinamentos na área de educação em saúde;

À amiga Deolinda Carneiro, pela força, alegria e energia positiva;

À eterna amiga Alessandra Defendi, sempre presente mesmo à distância.

Aos então residentes (aprimorandos) da área de Zoonoses e Saúde Pública da FMVZ, Luciana Bonato, Juliano Hoffmann, Veruska Maia, Patrícia Yoshida, Haroldo Greca, Lucilene Camossi, Leila Ulmann e Felipe Guimarães, pela confecção das lâminas de imunofluorescência e pela permissão da utilização das dependências do laboratório de rotina, para a realização das sorologias.

Aos funcionários Benedito e Marcos, pela ajuda no preparo dos materiais;

A todos os professores e colegas da Pós-graduação, pelo companheirismo durante esta caminhada;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter concedido a bolsa, acreditando na importância do trabalho;

A todas as pessoas que estiveram comigo e que me ajudaram de alguma maneira, muito obrigada!

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Seqüência de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados... 58

Quadro 2 - Seqüência de oligonucleotídeos para *Trypanosoma cruzi* e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados..... 60

Tabela 1 - Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp., em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo o resultado do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008..... 62

Tabela 2 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2008..... 63

Tabela 3 – Distribuição dos resultados obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e/ou anti-*T. cruzi* em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008..... 64

Tabela 4 – Distribuição comparativa entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e/ou anti-Trypanosoma *cruzi* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008..... 65

Tabela 5 - Resumo descritivo e comparação entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*Trypanosoma cruzi* detectados pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008..... 65

Tabela 6 - Resultados do exame parasitológico direto de fígado de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu, 2008..... 67

Tabela 7 - Resultados do exame parasitológico direto de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008..... 67

Tabela 8 - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa dos exames parasitológicos diretos de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2008..... 68

Tabela 9 - Resultados da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008..... 70

Tabela 10 - Resultados da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008..... 71

Tabela 11 - Resultados da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP,
2008..... 71

Tabela 12 - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2008..... 72

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1 - Dispersão entre os títulos de anticorpos contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008..... 66

Figura 1 - *Imprint* de fígado de cão demonstrando presença de formas amastigotas. Coloração Giemsa, aumento 1000X. Botucatu-SP, 2008..... 69

Figura 2 - Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de PCR, a partir de amostras de baço de cães de Bauru-SP. Amostras amplificadas utilizando-se os iniciadores LIN19 e LINR4. Gel de agarose 2%. Botucatu-SP, 2008..... 73

Figura 3 - Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Trypanosoma cruzi*, pela técnica de PCR, a partir de amostras de fígado de cães de Botucatu-SP. Amostras amplificadas utilizando-se os iniciadores P35 e P36. Gel de agarose 2%. Botucatu-SP, 2008..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – por cento

Ac – acurácia

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

CEEA – Câmara de Ética em Experimentação Animal

DHVSP – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAses – enzimas degradadoras de DNA

dNTPs – desoxinucleotídeos-trifosfatos

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

Esp – especificidade

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

et al. – e colaboradores

HAI – hemaglutinação indireta

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IgG – imunoglobulina G

L. – Leishmania (gênero)

LIT – Liver Infusion Tryptose

LV – leishmaniose visceral

LVC – leishmaniose visceral canina

LT – leishmaniose tegumentar

Lu. – Lutzomyia

(L.) – Leishmania (subespécie)

M – Molar

mg% – miligrama por cento

MIX-PCR – mistura dos reagentes para PCR

mL – mililitro

µL – microlitros

mm – milímetro

mmol – milimol

nm – nanômetro

NNN – Novy-MacNeal- Nicolle

NUPEZO – Núcleo de Pesquisas em Zoonoses

°C – graus Celsius

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – nível descritivo (estatístico)

pb – pares de bases

PBS – Phosphate buffer saline (solução salina tamponada)

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

pH – unidade de acidez/acalinidade

PM – peso molecular

pmol – picomol

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA – ácido ribonucléico

RNAses – enzimas degradadoras de RNA

rpm – rotações por minuto

Sens – sensibilidade

spp. – gênero

SUCEN – Superintendência para o Controle de Endemias

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tampão Tris Borato-EDTA

T.cruzi – Trypanosoma cruzi

TRIS – Tris (hidroximetil)-amino-metano

TRIS HCl – Tris (hidroximetil)-amino-metano, com ácido clorídrico

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UV – ultravioleta

V – volts

Vpn – valor preditivo negativo

Vpp – valor preditivo positivo

(V.) – Viannia (subespécie)

X – sinal de multiplicação (vezes)

SUMÁRIO

		Página
RESUMO		xxvi
ABSTRACT		xxviii
1	INTRODUÇÃO	30
2	REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1	As leishmanioses	32
2.2	Aspectos epidemiológicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar (LT)	33
2.3	Aspectos epidemiológicos e diagnósticos da leishmaniose visceral (LV)	35
2.4	A doença de Chagas	38
2.5	Reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* ao exame sorológico de amostras caninas	41
2.6	Exames parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose e tripanossomíase caninas	42
2.7	A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para o diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase	43
2.8	A importância das leishmanioses e da doença de Chagas no município de Bauru-SP	46
2.9	A importância das leishmanioses e da doença de Chagas no município de Botucatu-SP	47
3	OBJETIVOS	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Autorização para realização do estudo	52
4.2	Locais de execução dos procedimentos laboratoriais	52
4.3	Animais	52
4.4	Colheita de amostras de sangue	53
4.5	Colheita de amostras de fígado e baço	53
4.6	Exames parasitológicos diretos	54
4.7	Exames sorológicos	55
4.7.1	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp	55
4.7.1.1	Antígeno	55

4.7.1.2 Preparação das lâminas de imunofluorescência com o antígeno..... 55
4.7.1.3 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp..... 56
4.7.2 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*..... 57
4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) 57
4.8.1 Preparo das amostras para extração do DNA..... 57
4.8.2 Extração do DNA..... 57
4.8.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp..... 58
4.8.4 Eletroforese..... 58
4.8.5 Limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... 59
4.8.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Trypanosoma cruzi*..... 59
4.8.7 Limiar de detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... 60
5 RESULTADOS..... 62
5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp..... 62
5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*..... 64
5.3 Reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... 64
5.4 Exames parasitológicos diretos de fragmentos de fígado e baço..... 66
5.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp..... 70
5.5.1 Limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... 73

5.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de Trypanosoma *cruzi*..... 73
5.6.1 Limiar de detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... 74
5.7 Metodologia de análise estatística..... 75
5.7.1 Análise de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... 75
5.7.2 Avaliação da acurácia das técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), exames parasitológicos diretos e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... 75
6 DISCUSSÃO..... 77
6.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... 77
6.1.1 Reações cruzadas..... 79
6.2 Exames parasitológicos diretos..... 82
6.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp..... 83
6.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para diagnóstico da infecção por *Trypanosoma cruzi*..... 86
6.5 Diagnóstico elucidativo para leishmaniose e tripanossomíase americana em cães frente às reações cruzadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... 87
7 CONCLUSÕES..... 90
8 BIBLIOGRAFIA..... 92
9 Anexos..... 106
10 Apêndice..... 114
11 TRABALHO CIENTÍFICO..... 118

RESUMO

TRONCARELLI, M.Z. **Infecção por *Leishmania* spp. e/ou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral canina**. Botucatu-SP, 2008. 117p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Devido à proximidade filogenética entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), podem ocorrer reações cruzadas e resultados falso-positivos à sorologia. O objetivo do presente estudo foi contribuir com o diagnóstico elucidativo da leishmaniose e da tripanossomíase caninas, utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o exame parasitológico direto e a pesquisa de DNA, tanto de *Leishmania* spp., quanto de *T.cruzi*, pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em amostras de fígado e baço. Para tanto, foram utilizados 100 cães eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Bauru-SP, onde a leishmaniose visceral é endêmica, e 100 cães eutanasiados no canil municipal da cidade de Botucatu-SP, área indene. Sessenta e cinco amostras de soros dos cães de Bauru foram positivas pela RIFI para *Leishmania* spp. e 40 foram positivas para *T.cruzi*, enquanto que todas as 100 amostras de cães de Botucatu foram negativas pela RIFI para leishmaniose e somente quatro amostras foram positivas para *T. cruzi*. Do total de 200 soros testados, 33 (16,5%) apresentaram resultado positivo à sorologia para ambos parasitos. Em 30 amostras de fígado e/ou de baço dos 33 cães que apresentavam anticorpos contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi*, tanto o exame parasitológico direto como a PCR para *Leishmania* spp. resultaram positivos, indicando a verdadeira infecção por este parasito. Nenhuma amostra de fígado e baço dos 200 cães de Bauru e Botucatu foi positiva pela PCR para *T. cruzi*. Estes resultados reforçam a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *T. cruzi* pela RIFI, bem como a necessidade da realização do exame parasitológico direto e/ou da PCR para o diagnóstico elucidativo da leishmaniose e das tripanossomíases caninas.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi,* diagnóstico, cão.

ABSTRACT

TRONCARELLI, M.Z. **Dogs' infection by *Leishmania* spp. and/or by *Trypanosoma cruzi* in endemic and non-endemic areas for canine visceral leishmaniasis.** Botucatu-SP, 2008. 117p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Due *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) phylogenetical closely, some serological cross-reactions and false-positives results can occur. The objective of this study was to contribute with the elucidative canine leishmaniasis and trypanossomiasis' diagnosis, using Indirect Immunofluorescence (IIF) serologic test, direct parasitological exam and *Leishmania* spp. and *T.cruzi* DNA investigation by Polimerase Chain Reaction (PCR) in liver and spleen samples. For this purpose, it were used 100 culled dogs of Zoonosis Control Center in Bauru-SP where Visceral Leishmaniasis (VL) is endemic, and 100 culled dogs of the municipality kennel in Botucatu-SP where VL is non-endemic. Sixty-five (65%) serum samples of dogs from Bauru were positive by IFI for *Leishmania* spp. and 40 (40%) were positive for *T. cruzi*. All serum samples (100%) of dogs from Botucatu were negative by IFI for leishmaniasis and only 4 samples were positive for *T. cruzi*. Of a total of 200 tested serum samples, 33 (16.5%) showed serologic positive results for both parasites. In 30 liver and/or spleen samples of 33 dogs that presented antibodies anti-*Leishmania* spp. and anti-*T.cruzi*, both direct parasitological exam and PCR for *Leishmania* spp. resulted positive, indicating the true dog's infection by this parasite. No liver and spleen samples of 200 dogs from Bauru and Botucatu were positive by PCR for *T. cruzi*. These results reinforce the occurrence of antibodies cross reactions for *Leishmania* spp. and *T. cruzi* by IFI, and also confirm the necessity of a parasitological exam and/or a PCR test for the canine leishmaniasis and trypanosomiasis elucidative diagnosis.

Key words: *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, diagnosis, dog.

1 – INTRODUÇÃO

As leishmanioses e a doença de Chagas são zoonoses de grande impacto em saúde pública, caracterizadas por elevadas taxas de morbidade e letalidade (BRASIL, 2006). São doenças infecto-parasitárias de ampla diversidade epidemiológica, devido à variabilidade de possíveis espécies de hospedeiros, de vetores e de ambientes onde podem se estabelecer (CHIARAMONTE et al., 1996).

A leishmaniose visceral (LV) tem apresentado significativa expansão geográfica, assim como aumento do número de casos humanos, devido a mudanças em seu padrão de transmissão. Inicialmente, a doença predominava em ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, em centros urbanos (LINDOSO e GOTO, 2006).

O cão é o principal reservatório doméstico de *Leishmania* spp., por apresentar intenso parasitismo cutâneo, contato estreito com humanos e atrair a presença do vetor (MACHADO, 2004). Uma das medidas de controle preconizadas no Brasil pelo Ministério da Saúde é a eliminação dos reservatórios caninos (BRASIL, 2006). Para tanto, são realizados inquéritos epidemiológicos, especialmente em áreas endêmicas, para a identificação dos cães sorologicamente positivos, que devem ser destinados à eutanásia.

Os métodos sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* spp. em cães apresentam alta sensibilidade e especificidade. No entanto, cães infectados podem ser soronegativos (COSTA et al., 1991), representando risco à saúde pública, pois permanecem como reservatórios. Por outro lado, nem sempre um resultado soropositivo pode ser conclusivo de doença ativa. Devido à proximidade filogenética entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), ambos pertencentes à família Tripanosomatidae, é possível a ocorrência de reações cruzadas à sorologia, determinando resultados falso-positivos (TRONCARELLI et al., 2008).

Com efeito, para um melhor refinamento diagnóstico, faz-se necessário o uso de técnicas complementares, como o exame parasitológico, considerado padrão-ouro, e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, pela detecção do DNA do parasito.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida), estreitamente correlacionados aos tripanossomas. São doenças endêmicas em 88 países (DESJEUX, 1996), especialmente em regiões tropicais e subtropicais, tais como o leste e sudeste da Ásia, Oriente Médio, norte e leste da África, sul da Europa (Mediterrâneo) e Américas Central e do Sul (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leishmaniose como a segunda protozoose mais importante da atualidade, estando entre as seis principais enfermidades infecto-parasitárias do mundo (BRASIL, 1994). No entanto, é doença negligenciada, sendo que 80% dos casos ocorrem em populações de baixa renda, que sobrevivem com menos de dois dólares por dia (DESJEUX, 2004).

No Norte e Leste da África, na Índia e na China, ocorre principalmente a leishmaniose visceral (LV) ou calazar, enquanto que no Oriente Médio ocorre principalmente a leishmaniose tegumentar (LT). Cerca de 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a infecção e 12 milhões estão infectadas (DESJEUX, 1996). Um milhão e meio de novos casos são reportados todo ano, sendo que 500.000 deles tratam-se de LV (SUNDAR e RAI, 2002).

Na América Latina, as leishmanioses já foram descritas em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos de LV concentram-se no Brasil, especialmente na região Nordeste, constituindo grave problema de saúde pública (BRASIL, 2006).

Os vetores das leishmanioses são dípteros da família Phychodidae, sub-família Phlebotominae, especialmente os do gênero *Lutzomyia,* conhecidos genericamente como flebotomíneos. No Brasil, são popularmente denominados de mosquito-palha, tatuquira, birigüi, entre outras denominações regionais.

A fêmea do flebotomíneo se alimenta de sangue de hospedeiros animais ou humanos para o desenvolvimento dos ovos (BRASIL, 2002). Após oito a vinte dias do repasto sanguíneo, as formas amastigotas de *Leishmania* spp.

evoluem para formas promastigotas no tubo digestivo dos insetos, tornando-se infectantes. Desta forma, ao se alimentarem novamente, em novo hospedeiro, os vetores regurgitam as formas promastigotas juntamente com a saliva, no tecido cutâneo. As formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocítico monocitário do hospedeiro mamífero e transformam-se em amastigotas. Estas, por mecanismos intrínsecos permanecem viáveis e se multiplicam por divisão binária. Devido à intensa multiplicação do agente, as células parasitadas podem ser lisadas e as formas amastigotas são liberadas no meio extracelular, quando então podem ser fagocitadas por outros macrófagos (MURRAY et al., 2005).

No ambiente silvestre, os principais reservatórios são as raposas, *Dusicyon vetulus,* os cachorros-do-mato, *Cerdocyon thous*, os marsupiais (gambás) *Didelphis albiventris* (SANTIAGO et al., 2007) e os roedores. O cão é o principal reservatório do agente no âmbito doméstico, pelo elevado parasitismo cutâneo, contato estreito com humanos e atração do vetor. Apesar da doença nos cães e em humanos ser de freqüência variável, os parasitos de ambos hospedeiros são idênticos (MATHIS e DEPLAZES, 1995).

As transformações no ambiente provocadas pelo intenso processo migratório, pressões econômicas ou sociais, pauperização, processo de urbanização crescente, negligência no saneamento básico, entre outros fatores, acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno leva a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias (REIS, 2001; BRASIL, 2006). Neste padrão, tem-se discutido a possível adaptação de vetores e parasitos a ambientes modificados e a reservatórios (BRASIL, 2000).

A transmissão da leishmaniose entre os animais silvestres, domésticos e o homem é um fato de grande importância na cadeia epidemiológica desta enfermidade e motivo de estudos pela sua relevância em saúde pública.

2.2 Aspectos epidemiológicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar (LT)

A LT e a leishmaniose mucocutânea são doenças infecto-parasitárias de distribuição mundial, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil estão descritas seis espécies principais: *Leishmania (Viannia)*

braziliensis, Leishmania (Leishmania) amazonensis, *Leishmania (Leishmania) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni, Leishmania (Viannia) shawi e Leishmania (Viannia) naiffi* (HEPBURN, 2000).

A doença distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil tem sido assinalada em todos os estados. O número de casos vem aumentando progressivamente nos últimos 20 anos, sendo o Brasil o país de maior ocorrência, com mais de trinta mil casos anuais (BRASIL, 2000).

Sua importância reside não somente na sua elevada incidência e ampla distribuição geográfica, mas também por constituir uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido à sua magnitude e pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem, como também pelo envolvimento psicológico do indivíduo, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2000).

Inúmeras espécies de mosquitos flebotomíneos atuam como vetores da doença, especialmente os do gênero *Lutzomyia*, que estão relacionados ao ciclo de transmissão. As principais espécies vetoras no Brasil são *Lu.intermedia, Lu.pessoai, Lu.wellcomei* e *Lu.whitmani* (BRASIL, 2000).

Na LT existe uma diversidade de espécies animais que atuam como reservatórios do parasito, especialmente roedores silvestres, edentados e marsupiais, além dos eqüídeos. A disseminação hematógena do parasito em cães foi demonstrada por Reithinger et al. (1999), que detectaram DNA de *Leishmania braziliensis* em amostras de sangue e vísceras de cães com LT, indicando que estes animais também parecem desempenhar algum papel na manutenção do ciclo de vida do protozoário, atuando como reservatórios e amplificadores da epizootia em surtos envolvendo os seres humanos (MADEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2005).

Há relatos de infecção canina por *Leishmania (V.) braziliensis* em todos os estados brasileiros, com prevalência elevada (em torno de 10 a 13%), especialmente em áreas endêmicas como o estado do Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 1999; MADEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2005).

A apresentação clínica da LT cutânea constitui-se de lesões de pele de forma localizada, única ou múltipla, bem como a forma disseminada, com

lesões muito numerosas em várias áreas do corpo, além da forma difusa. Já a apresentação mucosa da LT é, na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente, meses ou anos após a resolução das lesões de pele. São mais freqüentemente acometidas as cavidades nasais, seguidas de faringe, laringe e cavidade oral. Pode ocorrer destruição parcial ou total da pirâmide nasal e outras estruturas acometidas na boca (BRASIL, 2000).

Nos cães a apresentação das lesões é semelhante à que ocorre em humanos, com formas ulceradas localizadas e/ou nodulares disseminadas, além da forma mucosa (MADEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2005).

O diagnóstico é feito por exame parasitológico, a partir de escarificação da lesão, biópsia com impressão por aposição ou punção aspirativa. Métodos imunológicos também podem ser utilizados, como a intradermoreação de Montenegro (para pacientes humanos), e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ou Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para pacientes humanos ou caninos (BRASIL, 2000).

A ocorrência de reações cruzadas ao exame sorológico entre espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar com espécies causadoras de leishmaniose visceral e com outros tripanossomatídeos é bastante freqüente. Para a melhoria da acuidade diagnóstica, devem ser realizadas técnicas complementares, altamente sensíveis e específicas, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir de material de biopsias de lesões cutâneas (REITHINGER, et al., 2003; MASSUNARI, 2007). Esta técnica tem sido utilizada não somente para o diagnóstico de casos ativos, como também para o controle de cura em pacientes humanos e como método diagnóstico para inquéritos de massa, para a detecção do parasito em hospedeiros vertebrados e vetores (REITHINGER, et al., 2003).

2.3 Aspectos epidemiológicos e diagnósticos da leishmaniose visceral (LV)

A LV é causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani,* sendo classicamente reconhecidas três espécies envolvidas na etiologia da doença: *L. (L.) donovani* (ROSS, 1903) e *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908) presentes na Europa, África e Ásia; e *L. (L.) chagasi* (LAINSON e SHAW, 1987) presente nas Américas. No entanto, em estudo sobre a história evolutiva e geográfica do

complexo *L. donovani*, realizado por Lukes et al. (2007), utilizando técnicas biomoleculares específicas, apresentou-se a hipótese de que *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* são a mesma espécie, em função de semelhanças bioquímicas e moleculares. Sugere-se ainda que a linhagem primordial de *Leishmania* spp. tenha sido originada na América do Sul.

A LV é uma das doenças mais importantes da atualidade, principalmente em crianças, portadores do vírus da imunodeficiência adquirida e pacientes submetidos à quimioterapia. A LV é letal em aproximadamente 95% dos casos, na ausência de tratamento (BRASIL, 2006).

No Brasil, duas espécies de insetos, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*. A primeira é considerada a principal transmissora de *L. chagasi* no Brasil e, recentemente, *Lu. cruzi* foi identificada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006).

O ambiente favorável à ocorrência de LV é o de baixo nível socioeconômico, pobreza e promiscuidade, prevalentes em grande parte no meio rural e na periferia das grandes cidades. Entretanto, estas características vêm se modificando, principalmente nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, onde a LV se encontra urbanizada (LUZ et al., 2001; BRASIL, 2006). Condições sócio-ambientais, como o desmatamento, reduziram a disponibilidade de animais que serviam como fontes de alimentação para o mosquito transmissor, colocando o cão e o homem como fontes de alimentação alternativas acessíveis (BRASIL, 2002).

O registro do primeiro caso humano de LV ocorreu em 1913, quando Migone identificou formas amastigotas em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança-MT (ALENCAR et al., 1991). Até os anos 90, aproximadamente 90% dos casos notificados no Brasil eram provenientes da região Nordeste. Em 2001, a região Nordeste ainda destacava-se com o maior número de casos de leishmaniose (81,7%), seguido pela região Norte (8,8%), Sudeste (7,6%) e Centro-Oeste (1,9%). Em 2003, a doença ocorreu em 58% dos estados da região Nordeste, 15% no Norte, 7% no Centro-Oeste e 19% no Sudeste (GONTIJO e MELO, 2004; LINDOSO e GOTO, 2006). Nos últimos anos, a doença tem apresentado aumento significativo, tanto em incidência quanto na distribuição geográfica (LINDOSO e GOTO, 2006).

As prevalências de leishmaniose canina são também bastante elevadas, atingindo taxas de 1-36% em diferentes regiões do país (SILVA et al., 2001a). No Estado de São Paulo, a leishmaniose visceral canina (LVC) foi diagnosticada pela primeira vez em 1998, na cidade de Araçatuba (LUVIZOTTO et al., 1999). Atualmente, quarenta e um municípios apresentam a enzootia canina e em 28 municípios a transmissão em seres humanos já foi notificada com prevalências em torno de 10 a 15% (CAMARGO-NEVES, 2005).

Na área urbana, o cão é o principal reservatório, apresentando-se infectado em quase todos os focos brasileiros de LV humana (MACHADO, 2004). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

A capacidade de infectar os mosquitos é similar, tanto em portadores assintomáticos como em cães que apresentam algum grau de sintomatologia (VEXENAT et al., 1994; ZIVICNJAK et al., 2005).

O período de incubação no homem varia de dez dias a 24 meses, sendo em média de dois a seis meses. Já nos cães, é bastante variável, com início dos sinais clínicos entre três meses a vários anos após a infecção, com média de três a sete meses (BRASIL, 2006).

As alterações clínicas de LV mais freqüentemente observadas em cães são a linfadenopatia, alterações dermatológicas, hepato e esplenomegalia, emaciação e onicogrifose. Anemia, lesões oculares, hipertermia, emese, diarréia, sinais respiratórios, epistaxe, comprometimento renal e hepático, artrites e alterações neurológicas também podem ser constatados (FEITOSA et al., 2000). Podem estar associados quadros de demodicose, piodermite, hemoparasitos e outras manifestações decorrentes de infecções secundárias à imunossupressão (SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

Em alguns cães, a doença pode permanecer latente, levando inclusive à cura espontânea. No Brasil, a forma assintomática da doença geralmente representa 40 a 60% de uma população soropositiva, e há evidências que as taxas de prevalência são maiores que as obtidas por estudos sorológicos. A existência de cães assintomáticos parasitados com ou sem anticorpos tem sido observada em infecções naturais e experimentais (FARRELL, 2002).

A detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* spp. em cães, utilizando técnicas sorodiagnósticas, constitui um instrumento essencial no diagnóstico da LVC. De acordo com a recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), os laboratórios credenciados devem utilizar o teste de ELISA como triagem diagnóstica em inquéritos caninos e a RIFI como técnica de confirmação. Os animais soropositivos, sintomáticos ou não, devem ser eutanasiados.

A RIFI apresenta de 90 a 100% de sensibilidade e de 80 a 100% de especificidade (ALVES e BEVILACQUA, 2004), além de ser de fácil execução, fornecer diagnóstico rápido e a custo reduzido (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006). Entretanto, nem sempre um resultado positivo pela RIFI pode ser conclusivo de doença ativa, da mesma forma que cães infectados podem ser soronegativos (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006). Podem ocorrer reações cruzadas com outros tripanossomatídeos ou mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes, produzindo resultados falso-positivos (ROSÁRIO, 2002; LUVIZOTTO, 2003).

Pode ocorrer ainda falha diagnóstica em estágios iniciais da doença, quando anticorpos da classe IgG ainda não são detectáveis. Por este motivo, a RIFI, quando utilizada de maneira isolada, pode subestimar a prevalência e a incidência, prejudicando os métodos de controle.

2.4 A doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana é uma zoonose essencialmente crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), de grande importância em saúde pública devido a sua elevada prevalência e ampla distribuição na América Latina, com diferentes padrões de morbi-mortalidade (DE LIMA et al., 2006).

Estima-se que a doença ocorra em 17 países da América Latina, com um contingente de 16 a 18 milhões de infectados. A população em risco de contrair esta enfermidade na América é superior a 100 milhões de habitantes (SCHOFIELD e DIAS, 1999), dos quais fundamentalmente habitam áreas rurais e suburbanas, dedicando-se aos trabalhos agrícolas ou pecuários e, na maioria dos casos, com grandes restrições econômicas (WHO, 2002). Causadora de mortes precoces em populações adultas, a doença de Chagas também gera

perdas na produtividade e por absenteísmo, além de apresentar custo médico-social elevado em termos de tratamento, internações hospitalares, cirurgias corretivas, utilização de marcapassos, etc.

Os vetores envolvidos na transmissão da doença são insetos triatomíneos, principalmente os dos gêneros *Triatoma, Panstrongylus e Rhodnius*. Há três ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*, sendo de maior importância epidemiológica o ciclo doméstico, já que perpetua a infecção em seres humanos, os quais constituem os principais reservatórios do parasito, além dos cães, gatos e, em alguns países, os cobaias. No ciclo silvestre, intervêm os triatomíneos silvestres que, uma vez contaminados, infectam os roedores, marsupiais e outros animais, exercendo, então, o papel de reservatórios. O terceiro ciclo é o peridoméstico, no qual intervêm mamíferos (roedores domésticos, marsupiais, gatos e cães) que, livremente, entram e saem pelas residências, bem como os triatomíneos silvestres, que são atraídos às casas, pela luz e alimento. O ciclo peridoméstico atua como elo entre os ciclos doméstico e silvestre (WHO, 1991).

Primitivamente, a doença de Chagas era uma enzootia, afetando exclusivamente mamíferos silvestres, sendo transmitida por triatomíneos. Com o desequilíbrio ecológico e posterior invasão dos abrigos de animais domésticos e das habitações humanas pelos insetos vetores, bem como a adaptação progressiva destes aos ecótopos artificiais, o *T.cruzi* passou a infectar o homem e os hospedeiros suscetíveis, particularmente os cães (BARRETO, 1965).

No âmbito doméstico, os cães são considerados os reservatórios mais importantes para tripanossomatídeos e, como ocorre na leishmaniose, devido a sua proximidade com o homem, a presença destes protozoários nestes animais representa um sinal de alerta para ações efetivas de controle dos vetores, no caso, os triatomíneos. A importância da infecção natural canina pelo *T.cruzi*, acentuada a princípio por Carlos Chagas (1909), foi constatada *a posteriori*, sendo o cão considerado reservatório natural importante de tripanossomas na maioria dos países latino-americanos e em algumas áreas dos Estados Unidos da América (BARR et al., 1991; GÜRTLER et al., 1998; MEURS et al., 1998; BRADLEY et al., 2000; MONTENEGRO et al., 2002; LUCHEIS et al., 2005).

Os cães também são sentinelas naturais em áreas onde a doença de Chagas ainda está presente, mesmo quando a campanha de controle de vetor é realizada (GÜRTLER et al. 1990, CASTAÑERA et al. 1998). A prevalência de cães e gatos infectados e o nível de contato entre estes animais e *Triatoma infestans* domiciliar explica a variação nos domicílios da proporção de triatomíneos infectados com *T. cruzi* (GÜRTLER et al., 1998).

As principais alterações verificadas na doença de Chagas são cardiomegalia, com espessamento da musculatura ventricular e conseqüente insuficiência circulatória, além de comprometimento do sistema digestório, como megaesôfago e megacólon, em alguns casos (WHO, 1991). Os sinais clínicos da doença em humanos e em cães são bastante similares, sendo que o cão tem sido utilizado inclusive como modelo experimental para o estudo da imunopatologia e evolução clínica da doença (ARAÚJO et al., 2002).

O diagnóstico da doença pode ser realizado pela pesquisa do parasito em esfregaço sangüíneo, e o protozoário poderá ser verificado especialmente no curso agudo (inicial) da doença. Outras provas que podem ser realizadas é o xenodiagnóstico artificial, além da cultura de sangue, material de punção de medula óssea e/ou de linfonodos, em meio LIT/NNN. A inoculação em animais de laboratório e a PCR podem ser utilizadas para diagnóstico, mas têm sido empregadas mais comumente em pesquisas (LUCHEIS et al., 2005).

Como métodos indiretos para o diagnóstico da tripanossomíase, têm sido utilizadas provas sorológicas como ELISA, HAI e RIFI (LAURICELLA et al., 1998). No entanto, devido à proximidade filogenética entre *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, tem sido constatada a ocorrência freqüente de reações cruzadas entre estes parasitos ao diagnóstico sorológico (TRONCARELLI et al., 2008), prejudicando a adoção de medidas em casos de pacientes humanos e caninos. Por este motivo, a realização de pesquisas que comparem, padronizem e melhorem os métodos diagnósticos, tanto para as leishmanioses, quanto para a doença de Chagas, são fundamentais para o controle da doença humana, que será alcançada a partir do controle da doença nos reservatórios. Para tanto, os programas de vigilância, especialmente no caso das leishmanioses, devem enfatizar o diagnóstico precoce com elevada sensibilidade e especificidade, para que os cães (principais reservatórios domésticos) sejam identificados o mais precocemente possível e de forma segura, evitando-se a

eutanásia de animais inutilmente, ou a permanência de fontes de infecção para o homem.

2.5 Reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* ao exame sorológico de amostras caninas

A reação cruzada entre *T.cruzi* e *Leishmania* spp. em exames sorológicos já havia sido descrita por Camargo e Rebonato, em 1969 e tem sido verificada continuamente por diversos pesquisadores (VEXENAT et al., 1996; LAURICELLA et al., 1998).

Em um estudo comparativo da RIFI em eluatos de sangue de cães experimentalmente infectados com diferentes tripanossomatídeos, Costa et al. (1991) observaram a ocorrência de reação cruzada com a leishmaniose tegumentar americana em 75% dos casos e com a doença de Chagas em 83,3%. Em outro estudo realizado por Zanette et al. (2006), utilizando o ELISA no diagnóstico da leishmaniose canina, verificou-se que, de 14 cães positivos para leishmaniose, nove (09) eram também positivos para *Trypanosoma cruzi*.

Duprey et al. (2006) verificaram ocorrência de reações cruzadas entre *T.cruzi* e *Leishmania* spp., produzindo resultados falso-positivos para LVC pela técnica de RIFI em amostras de soros de cães dos Estados Unidos e Canadá. Para identificar a real infecção dos animais, os pesquisadores realizaram a técnica de radioimunoprecipitação para *T.cruzi*, para testar amostras de 413 cães que apresentavam títulos de anticorpos anti-*Leishmania* superior a 32. Oitenta e seis (21%) destes cães resultaram positivos, sugerindo real infecção por *T.cruzi*. Os demais 326 cães (78,9%), negativos pela radioimunoprecipitação, foram considerados infectados por *L. infantum*. Os autores consideraram que os cães que apresentaram soropositividade contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi* poderiam estar infectados por ambos parasitos, no entanto os pesquisadores não puderam confirmar esta possibilidade, além de sugerir que a probabilidade de ocorrer a co-infecção seria baixa.

Ferreira et al. (2007), comparando a eficácia da RIFI, do ELISA e do teste de aglutinação direta (DAT) para o diagnóstico da LVC, examinaram amostras de soros de 234 cães de Belo Horizonte-MG. Foram incluídas nas análises algumas amostras de soros de animais infectados por outros agentes, como *T.cruzi* (n=7), *L.braziliensis* (n=5), *Toxoplasma gondii* (n=5) e *Ehrlichia*

canis (n=3). Os autores verificaram ocorrência de reações cruzadas contra *T.cruzi, L.braziliensis e Ehrlichia canis* nas três técnicas utilizadas, sendo que a RIFI produziu reações cruzadas em 11 amostras de soros, o ELISA em 08 amostras e o DAT em apenas uma amostra de soro.

Em estudos com pacientes humanos demonstra-se também que as reações cruzadas entre *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* comprometem o diagnóstico. Chiaramonte et al. (1996) verificaram 91,93% de reações cruzadas entre ambos protozoários pela RIFI, em amostra de soros de 62 pacientes com intradermorreação de Montenegro positiva (53 deles com exame parasitológico positivo). Quando os pesquisadores utilizaram antígeno específico Ag163B6, foi possível diferenciar pacientes chagásicos crônicos de pacientes com leishmaniose, pela técnica de ELISA.

Ressalta-se, por outro lado, que especialmente nos países da América Latina, há sobreposições de áreas endêmicas para leishmaniose e doença de Chagas, onde ocorrem casos de co-infecção em pacientes humanos e caninos. Chiaramonte et al. (1996), estudando o fenômeno da reatividade cruzada para *T.cruzi* em pacientes humanos da Argentina que apresentavam lesões típicas de leishmaniose cutânea ou mucocutânea por métodos sorológicos, verificaram que mais de 50% (32/62) destes demonstraram forte evidência de infecção mista por *Leishmania* spp. e por *T.cruz*i. Sendo assim, a RIFI é recomendada para levantamentos epidemiológicos, sendo que os dados não devem ser usados como indicadores da prevalência da leishmaniose visceral canina, mas sim como taxa de infecção por tripanossomatídeos. Posto isto, demonstra-se a importância do uso de técnicas complementares para que se faça o diagnóstico diferencial de ambas enfermidades.

2.6 Exames parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose e tripanossomíase caninas

Dentre os métodos utilizados para o diagnóstico etiológico da LVC, o exame parasitológico constitui-se método eletivo, considerado diagnóstico de certeza em regiões endêmicas (MOREIRA et al., 2002). A sensibilidade da técnica varia de acordo com o grau de parasitemia, tipo de material biológico colhido, experiência técnica e tempo de leitura da lâmina (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006).

Classicamente, o diagnóstico da doença é feito pela demonstração das formas amastigotas em aspirados de linfonodos, medula-óssea e baço, com sensibilidade de 58%, 70% e 96%, respectivamente (ZIJLSTRA et al., 2001). Quando se utiliza aspirado esplênico a sensibilidade da técnica aumenta, no entanto o risco de hemorragia é elevado (SINGH e SIVAKUMAR, 2003).

As amastigotas são estruturas de formas arredondadas ou ovais, com dois a três micrômetros de diâmetro, encontradas no interior de monócitos e macrófagos, ou no meio extracelular. Às colorações de Giemsa ou Leishman, o citoplasma do parasito apresenta-se em tom azul pálido, e o núcleo corado em vermelho. No mesmo plano do núcleo, há uma estrutura profundamente avermelhada ou violácea em forma de bastonete, denominada cinetoplasto (SUNDAR e RAI, 2002).

Em estudo realizado por ZIVICNJAK et al. (2005), *Leishmania* spp. foi detectada em tecidos de animais soropositivos que apresentavam alguns sinais clínicos, e também de animais assintomáticos. Esse aspecto é relatado por outros pesquisadores, e o resultado deve estar associado à carga parasitária, o que torna importante a associação de provas diagnósticas e levantamento epidemiológico detalhado, para a melhor interpretação de seus resultados.

Em estudo realizado por Vexenat et al. (1993) foram comparados os diagnósticos clínico, parasitológico e sorológico para a detecção de *L. chagasi* em 209 cães naturalmente infectados, no município de Teresina-PI. Apesar da sorologia ter apresentado maior sensibilidade, cães parasitologicamente positivos foram identificados entre indivíduos soronegativos. Em outro estudo realizado por Moreira et al. (2007), que compararam a RIFI, o exame parasitológico direto de material de punção aspirativa de linfonodos, e a PCR para o diagnóstico da LVC, verificaram que o exame parasitológico foi mais sensível que as demais provas, especialmente no caso de animais sintomáticos.

2.7 A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para o diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase

Dentre as técnicas de biologia molecular, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que permite identificar e amplificar seletivamente seqüências de DNA do parasito (SLAPPENDEL e FERRER, 1998), constitui

nova perspectiva para o diagnóstico da LV, apresentando sensibilidade e especificidade próximas a 100% (ASHFORD et al., 1995). Esta técnica possibilita a identificação do DNA parasitário em tecidos e fluidos provenientes de humanos e caninos infectados (STORINO e MILEI, 1994; LACHAUD et al., 2002a; MOREIRA et al., 2002), como medula óssea, biopsias cutâneas, aspirados de linfonodo, sangue, além de cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006).

O diagnóstico por PCR independe do status imunológico do animal e pode ser utilizado em caso de reações duvidosas, anergia ou de reações cruzadas correlacionadas a determinantes antigênicos em testes sorológicos convencionais. Além disso, a técnica pode ser utilizada em estudos epidemiológicos para auxiliar na determinação da prevalência em áreas onde a doença não está controlada. A PCR é capaz de detectar mais de 30% de infecções por *Leishmania* spp. em cães soronegativos (MILES et al., 1999) e é mais eficiente para detectar estágios iniciais da doença, enquanto que as técnicas sorológicas são mais eficazes para diagnosticar estágios avançados da infecção, embora muitos casos positivos possam se converter em soronegativos durante o curso da infecção (GRADONI, 2002). Estudos utilizando a PCR em cães de áreas endêmicas demonstraram prevalências maiores do que as obtidas em testes sorológicos clássicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

A principal desvantagem da biologia molecular é que são requeridos laboratórios bem equipados e habilidade técnica (BRASIL, 2006). Apesar do custo ainda ser elevado para realização da PCR, observa-se que há uma tendência de aumento de demanda e, com isso, é possível que ocorra redução de custos e a técnica torne-se mais acessível.

Para o diagnóstico da leishmaniose, os resultados também têm sido extremamente satisfatórios, utilizando-se a PCR a partir de amostras biológicas colhidas de pacientes humanos. Em estudo realizado por Osman et al. (1997), com 492 pacientes no Sudão, a PCR apresentou sensibilidade equiparável à de exames parasitológicos de aspirados de linfonodos e medula óssea. Entretanto, nos casos clinicamente suspeitos onde o parasito não foi detectado aos exames parasitológicos, a PCR resultou positiva em 12 de 23 (52,2%) aspirados de linfonodo e 8 de 12 (66,7%) aspirados de medula óssea,

confirmando o diagnóstico para LV. O uso da PCR também tem facilitado intensamente o diagnóstico definitivo da doença de Chagas em pacientes com infecção crônica, substituindo o ELISA como teste de escolha, e apresentando valores de sensibilidade e especificidades próximos aos da identificação microscópica (VALLEJO et al., 1999).

A PCR tem a vantagem de prover um diagnóstico mais específico que os proporcionados por métodos que detectam os parasitos flagelados em áreas onde outros parasitos, como o *T. rangeli*, possam estar presentes. Além disso, é um método diagnóstico importante para a determinação de microrganismos, já que proporciona a análise de diversas amostras em um curto período de tempo, além de detectar número reduzido de parasitos circulantes em pacientes cronicamente infectados com *T. cruzi* (LÓPEZ-ANTUÑANO et al., 2000). Sturm et al. (1989) utilizaram a região 120-pb do cinetoplasto de *T. cruzi* como alvo para amplificação em PCR. Quando o DNA purificado do parasito foi amplificado, foi possível detectar no mínimo 0,1% do genoma de um único parasito, mesmo na presença de bilhões de DNAs humanos. Além disso, a PCR detectou no mínimo 10 parasitos em 100µL de sangue de ratos infectados.

Em um outro estudo utilizando PCR para a detecção de *T. cruzi*, Moser et al., em 1989, amplificaram uma seqüência repetitiva nuclear de DNA 188-pb e foram capazes de detectar um mínimo de 0,05% de DNA em um único parasito. Além disso, oito parasitos em 100µL de sangue de rato foram facilmente detectados, e a presença de *T. cruzi* em conteúdos intestinais e urina de insetos reduvídeos infectados foi também demonstrada.

A PCR constitui ainda um método importante para a elucidação diagnóstica em casos de co-infecção por diferentes espécies de *Leishmania* spp. e/ou por outros tripanossomatídeos. Em estudo soro-epidemiológico para pesquisa de *Leishmania* spp., realizado por Savani et al. (2005), colheram-se amostras de soro de 129 animais. Nos 24 animais sororreagentes, realizou-se punção aspirativa de medula-óssea e nova colheita de soro. Um destes cães apresentava sinais sugestivos de leishmaniose visceral e duas amostras de soros foram reagentes pela técnica de ELISA. A primeira amostra de soro deste animal havia sido negativa pela RIFI, no entanto, a segunda amostra foi reagente com título 40. Já a primeira amostra submetida à RIFI utilizando

T.cruzi como antígeno, foi reagente com título 20 e a segunda amostra foi reagente com título 160, o que poderia indicar reação cruzada. No entanto, os autores observaram formas amastigotas e tripomastigotas em esfregaços de medula óssea do cão, corados pelo Giemsa. Com a realização da PCR e o seqüenciamento da amostra de aspirado de medula óssea, foi possível identificar o DNA de *Leishmania (L.) chagasi* e *Trypanosoma evansi*, indicando co-infecção por ambos parasitos.

Madeira et al. (2006) relataram o primeiro caso de co-infecção com *Leishmania (V.) braziliensis*, isolado a partir de lesões cutâneas, e *Leishmania (L.) chagasi*, isolado de sangue e linfonodo, em um cão naturalmente infectado no Rio de Janeiro-RJ. O método diagnóstico utilizado foi a PCR, utilizando iniciadores específicos e posterior hibridização molecular para identificação das espécies de *Leishmania* em fragmentos teciduais de baço e de linfonodos, enfatizando a importância da identificação de espécies de *Leishmania* pela técnica da PCR.

2.8 A importância das leishmanioses e da doença de Chagas no município de Bauru-SP

Novos casos de LV em caninos e humanos têm sido constantemente notificados em Bauru-SP, considerado município com transmissão canina e humana (SÃO PAULO, 2006).

Em 2003, quando foram diagnosticados os primeiros casos em cães (CAMARGO-NEVES, 2005), foram eutanasiados 528 animais no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru. Destes, 450 (85,2%) eram positivos em inquéritos sorológicos, realizados em parceria com o Instituto Adolfo Lutz (IAL). Em 2004, o número de eutanásias aumentou para 2.270, com 753 (33,2%) positivos aos exames sorológicos. No ano de 2005, 2.438 cães foram eutanasiados, sendo 598 (24,5%) sorologicamente positivos.

No total, em 2006 foram eutanasiados 4.452 cães, sendo que, destes, 1.151 (25,8%) apresentaram diagnóstico sorológico positivo para LVC. Já em 2007, devido a problemas com a falta de kits diagnósticos no IAL, houve redução dos inquéritos sorológicos, que identificaram 916 (21,2%) positivos dos 4.325 cães eutanasiados, e 2.491 (57,6%) foram identificados soropositivos em diagnóstico realizado em clínicas veterinárias particulares da cidade.

Em 2008, de janeiro a março, 768 cães foram eutanasiados, sendo 135 (17,6%) positivos pelo inquérito e 516 (67,2%) diagnosticados em clínicas veterinárias. Somente no mês de fevereiro, 12% dos cães eutanasiados tinham diagnóstico laboratorial para LV e 71% foram encaminhados ao CCZ por apresentar sintomatologia clínica sugestiva para a doença. Os 17% restantes foram destinados à eutanásia por motivos diversos, como atropelamento, animal invasor, feral ou outros.

Quanto à leishmaniose em pacientes humanos em Bauru-SP, em 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 e 2008 foram notificados 17, 29, 31, 71, 38 e 3 casos, e um, três, seis, quatro, sete e nenhum óbito, respectivamente (CCZ de Bauru, 2008, dados não publicados).

Não há dados disponíveis sobre a prevalência de doença de Chagas humana e canina em Bauru-SP.

2.9 A importância das leishmanioses e da doença de Chagas no município de Botucatu-SP

Os municípios do Estado de São Paulo foram classificados individualmente, no ano de 2006, pela Secretaria de Estado da Saúde e pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), de acordo com o perfil epidemiológico local da leishmaniose visceral. O município de Botucatu foi classificado como silencioso, não receptivo e vulnerável, ou seja, o município não apresenta confirmação de casos autóctones humanos ou caninos e não há presença conhecida do vetor (SÃO PAULO, 2006).

Em estudo de vigilância epidemiológica, realizado por Langoni et al. (2001), 781 amostras de soros caninos foram colhidas durante campanha de vacinação anti-rábica, para realização da técnica de RIFI para a pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* spp. Todos os soros resultaram negativos, contudo os autores reforçaram a importância de esforços contínuos na vigilância epidemiológica contra a leishmaniose, visando o diagnóstico precoce de casos autóctones, prevenindo-se conseqüentemente a disseminação do agente para o homem, cães e flebotomíneos.

Com relação à doença de Chagas, existem casos autóctones humanos, no entanto as taxas de infecção natural nos cães não são conhecidas. Lucheis et al. (2005) estudaram cinqüenta cães, 26 machos e 24 fêmeas, com idades

variáveis de dois meses a 15 anos, pertencentes a 30 indivíduos com doença de Chagas crônica, provenientes de 15 diferentes municípios da região oeste do Estado de São Paulo. Dos cães foi realizado o xenodiagnóstico artificial, hemocultura e PCR para *T.cruzi/T.rangeli*. Um total de 43 cães (86%) foi reagente a pelo menos um dos testes realizados, sendo 34 (68%) reagentes ao xenodiagnóstico, 30 (60%) a hemocultura e 25 (50%) a PCR para *T.cruzi /T.rangeli*. Ainda que não tenham sido encontrados triatomíneos no intra e no peridomicílio durante as inspeções das residências, os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de uma cadeia de transmissão de tripanossomas para os cães estudados, determinando, portanto, que os animais podem se infectar e exercer o papel de reservatórios de tripanossomatídeos.

3 – OBJETIVOS

Gerais

- Contribuir com o diagnóstico elucidativo da leishmaniose e da tripanossomíase americana (doença de Chagas) em cães procedentes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral.

Específicos

- Avaliar a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em amostras de soros caninos, pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Utilizar o exame parasitológico direto e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), como métodos complementares para a elucidação diagnóstica.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Autorização para realização do estudo

O presente delineamento experimental foi devidamente apresentado à Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, tendo sido aprovado no dia 19 de maio de 2006, protocolo n° 58/2006-CEEA (Anexo 1).

As colheitas de amostras biológicas dos cães foram oficialmente autorizadas pelos médicos veterinários responsáveis pelo CCZ de Bauru e pelo Canil Municipal de Botucatu.

4.2 Locais de execução dos procedimentos laboratoriais

As técnicas sorológicas e parasitológicas foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP/Botucatu-SP.

As PCRs para pesquisa do DNA de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi* foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Zoonoses, do DHVSP, FMVZ-UNESP/Botucatu-SP.

4.3 Animais

Foram utilizados no estudo 100 cães eutanasiados no Canil Municipal de Botucatu-SP, sendo 53 machos e 47 fêmeas, sem raça definida, de idades variadas. Estes animais foram encaminhados ao Canil Municipal para eutanásia por diferentes motivos, tais como: indesejados, doentes, agressivos, invasores, em sofrimento, maus-tratos, entre outros.

Foram utilizados também 100 cães eutanasiados no CCZ de Bauru, sendo 50 machos e 50 fêmeas, sem raça definida, de idades variadas. Estes animais foram encaminhados ao CCZ para eutanásia por diferentes motivos, tais como: sorologia positiva para leishmaniose em inquéritos realizados pelo IAL de Bauru; sinais clínicos sugestivos para leishmaniose visceral; indesejados; encontrados em vias públicas; em sofrimento, entre outros.

As colheitas foram realizadas em dias aleatórios, nos períodos compreendidos entre abril de 2006 a fevereiro de 2007 – CCZ de Bauru, e entre os meses de janeiro a abril de 2007 – Canil Municipal de Botucatu.

4.4 Colheita de amostras de sangue

Os cães foram removidos dos canis individualmente e adequadamente contidos pelos funcionários do serviço de recolhimento animal. As amostras de sangue foram obtidas por punção veno-jugular, em cães de menor porte, ou por punção veno-cefálica, em cães de maior tamanho ou agressivos. Foram utilizadas seringas e agulhas (ou scalpes) descartáveis, para colheita de cinco a dez mililitros de sangue por animal.

Ao final de cada colheita, os animais foram eutanasiados pelo médico veterinário oficial, com a administração de tiopental sódico e cloreto de potássio, por via intravenosa.

As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de vidro, identificados individualmente e vedados com tampa de borracha. Os tubos foram acondicionados em ráquis e mantidos em caixa de isopor, contendo gelo reciclável, até a chegada ao laboratório. Para a obtenção das amostras de soro, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. As amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, identificados individualmente, e congeladas a -20^{o}C para posterior realização da técnica de RIFI.

4.5 Colheita de amostras de fígado e baço

A obtenção de amostras de fígado e baço ocorreu imediatamente após a eutanásia do animal, utilizando-se materiais de necropsia para a abertura da cavidade abdominal e materiais cirúrgicos para a remoção dos fragmentos dos referidos órgãos. Foram colhidos, de cada órgão, fragmentos de aproximadamente 100g, acondicionados individualmente em papéis alumínios identificados e mantidos em caixa de isopor, contendo gelo reciclável, para transporte ao laboratório.

Em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com hipoclorito de sódio a 10% e esterilizada com luz UV por 15 minutos, procedeu-se a retirada de fragmentos menores (aproximadamente 1g) de cada órgão colhido, utilizando pinças e tesouras estéreis, individuais por órgão, para evitar a possibilidade de ocorrência de contaminações cruzadas entre amostras.

Os fragmentos foram acondicionados individualmente em microtubos estéreis de 1,5 mL, livres de DNAses e RNAses, devidamente identificados, contendo 1 mL de solução salina tamponada (PBS) 0,01M, pH 7,2 estéril (NICOLAS et al., 2002), e mantidos a -20^{o}C até o momento da extração do DNA para a realização da PCR.

4.6 Exames parasitológicos diretos

Fragmentos de fígado e baço de cada animal (contendo cápsula e parênquima) foram utilizados para realização de *imprints* em lâminas para microscopia com extremidades foscas, identificadas. Para remover o excesso de sangue dos fragmentos, estes foram levemente pressionados contra um papel filtro e, a seguir, realizaram-se as impressões em lâminas. Foram realizadas triplicatas, tanto para o fragmento de fígado, quanto para o fragmento de baço de cada cão. A seguir, as lâminas foram fixadas em metanol por cinco minutos e submetidas à coloração de Giemsa por 30 minutos. Após secagem das lâminas à temperatura ambiente, procedeu-se a pesquisa de formas amastigotas, em microscópio óptico, utilizando-se óleo de imersão e aumento de 1000X.

O critério para considerar um resultado positivo foi a identificação das três estruturas básicas da forma amastigota do parasito (núcleo, citoplasma e cinetoplasto), sendo que estas deveriam estar íntegras, independentemente da carga parasitária presente no tecido avaliado. Todas as lâminas processadas foram armazenadas em laminário.

4.7 Exames sorológicos

4.7.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

4.7.1.1 Antígeno

O antígeno utilizado foi preparado no NUPEZO, a partir de formas promastigotas de *Leishmania major,* mantidas em 10 mL de meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal- Nicolle (NNN), a 25°C, em tubos rosqueados estéreis. Para manutenção da viabilidade das formas promastigotas, foram realizados repiques semanais.

Em capela de fluxo laminar, retirou-se uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes, referentes ao repique da semana anterior, colocando-se entre lâmina e lamínula para observação ao microscópio óptico, em aumento 40X, para avaliação da viabilidade das promastigotas. Do tubo que apresentava parasitos com melhor motilidade e em maior concentração, repicou-se 0,5 mL para três novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos foram mantidos por uma semana em estufa a 25^{o}C, para a multiplicação das promastigotas. As mesmas foram novamente avaliadas e, posteriormente, centrifugaram-se 10mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e adicionaram-se de dois a três mililitros de solução salina tamponada 0,01M pH 7,2, centrifugando-se novamente a 3000 rpm por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por mais três vezes. Os parasitos foram quantificados com o auxílio de microscopia óptica. A concentração de antígeno ideal era obtida quando se observava de 20 a 30 parasitos por campo microscópico, em volume de 50 µL entre lâmina e lamínula de 24 x 60mm.

4.7.1.2 Preparação das lâminas de imunofluorescência com o antígeno

As lâminas de imunofluorescência foram preparadas pipetando-se 10 µL da suspensão de promastigotas em cada um dos orifícios, retirando-se em seguida por aspiração, restando somente uma fina película sobre cada orifício. As lâminas permaneceram sob secagem à temperatura ambiente, armazenadas em laminário e mantidas a -20^{o}C, até o momento do uso, por período máximo de duas semanas.

4.7.1.3 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966). Foram utilizadas microplacas para a diluição dos soros, pipetando-se 190 µL de PBS 0,01M, pH 7,2, e 10 µL do soro a ser testado no primeiro orifício, homogeneizando-se, perfazendo a diluição 1:20. Foram distribuídos 100 µL de PBS 0,01 M, pH 7,2 em outras cinco cavidades a partir da primeira diluição. Transferiu-se 100 µL da primeira diluição ao orifício seguinte, homogeneizando-se, repetindo até a quinta cavidade, desprezando-se os últimos. Com isso, as amostras foram diluídas a 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Da mesma forma, foram diluídas amostras de soros controles positivo e negativo.

Em lâminas impregnadas com o antígeno de *L. major,* foram distribuídos 10 µL de cada diluição nos orifícios, incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. A seguir, foram lavadas em *coplin* com PBS pH 7,2, por 10 minutos, por duas vezes consecutivas e, a seguir, secas em estufa.

O conjugado espécie-específico foi diluído, segundo seu título pré-estabelecido, em solução de Azul de Evans a 20 mg%, a qual foi previamente diluída em PBS 0,01M, pH 7,2 na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10 µL de conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se nova lavagem em *coplin* com PBS 0,01M, pH 7,2, por 10 minutos, duas vezes consecutivas, secando-se em estufa biológica a 37 °C. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula 24x60mm, e foram avaliadas em microscópio de imunofluorescência, no aumento 40 vezes. Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste. Foram consideradas positivas as amostras de soros com títulos iguais ou superiores a 40. Nos casos em que ocorresse fluorescência no título de 640, a amostra era então submetida à nova imunofluorescência, com diluições superiores, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

4.7.2 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

A técnica de RIFI para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* foi realizada de acordo com Camargo (1966), de maneira semelhante à descrita para *Leishmania* spp. Realizou-se diluição inicial da amostra em 1:20 com solução salina tamponada 0,01 M pH 7,2 e diluições seriadas de 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320. Os soros foram testados para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*, utilizando lâminas de imunofluorescência impregnadas com antígenos de *T.cruzi* (cepa "Y"), confeccionadas no NUPEZO. Foram consideradas positivas as amostras com títulos iguais ou superiores a 20. Nos casos em que ocorresse fluorescência no título de 320, a amostra era então submetida à nova imunofluorescência, com diluições superiores, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das epimastigotas.

4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.8.1 Preparo das amostras para extração do DNA

Os fragmentos de fígado e baço, que estavam armazenados a -20°C em microtubos contendo PBS pH 7,2 foram descongelados à temperatura ambiente. Em capela de fluxo laminar, previamente desinfetada com hipoclorito de sódio a 10% e esterilizada com luz UV durante 15 minutos, os fragmentos de órgãos foram macerados individualmente em cadinhos de porcelana (grals) estéreis. A seguir, adicionaram-se 4 mL de PBS estéril, 0,01M, pH 7,2, e homogeneizou-se cuidadosamente. O sobrenadante obtido de cada gral foi transferido para microtubo estéril, livre de DNAses e RNAses, devidamente identificado, e mantido a -20°C, até que se realizasse o procedimento de extração do DNA.

4.8.2 Extração do DNA

As amostras de fígado e baço que estavam congeladas em microtubos livres de RNAses e DNAses com PBS pH 7,2 foram descongeladas à temperatura ambiente. A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando-se o kit comercial **GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation**

Kit® (Amersham Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante, apresentadas no Anexo 2.

4.8.3 Reação em Cadeia pela Polimerase para pesquisa do DNA de *Leishmania* spp.

Para a elaboração do MIX-PCR, foram utilizados 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl), 8 µL de dNTPs, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 0,3 µL de *Taq*-polimerase, 5 µL de cada iniciador (com concentração de 10 pmol cada), 15,2 µL de água ultra pura e 10 µL da amostra a ser testada (produto de extração de DNA), em cada tubo de reação de 0,2 mL. Desta forma, cada tubo continha 50 µL de volume total.

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram seguidas conforme descritas por Ikonomopoulos et al. (2003), sendo a desnaturação inicial em um ciclo de 95ºC por 3 minutos, seguido de 32 ciclos a 95ºC durante 30 minutos, 58ºC durante 30 minutos e 72ºC durante um minuto, e uma extensão final de 72ºC durante sete minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores LINR4 e LIN19, descritos por Ikonomopoulos et al. (2003), apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1 – Seqüência de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados.

Iniciador	Seqüência	Tamanho do fragmento esperado em pares de bases
LIN19*	5´ CAGAACGCCCCTACCCG 3´	720**
LINR4*	5´ GGGTTGGTGTAAAATAGGG 3´	

*IKONOMOPOULOS et al., 2003

**Correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp. (ARANSAY et al., 2000).

4.8.4 Eletroforese

A identificação dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto, alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de solução de azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% em tampão Tris-

borato-EDTA (TBE) 0,5X, corado com 2 µL de brometo de etídeo. A corrida foi realizada a 100V durante 60 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300 nm. Os géis foram fotografados utilizando sistema de fotodocumentação com câmera Kodak Digital Science DC40®.

Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *L. major,* e como negativos água miliQ (controle negativo da extração) e o MIX-PCR (controle negativo da PCR). Para o padrão de peso molecular foi utilizado o DNA Ladder® (Invitrogen).

4.8.5 Limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O ensaio do limiar de detecção do parasito pela PCR foi realizado de acordo com metodologia descrita no Anexo 3. Para tanto, foi utilizada amostra de *Leishmania* spp. mantida em meio de cultura LIT e NNN, utilizada na rotina diagnóstica, gentilmente cedida pelo NUPEZO.

4.8.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa do DNA de *Trypanosoma cruzi*

Para a elaboração do MIX-PCR, foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item 4.8.3.

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram realizadas de acordo com Ávila et al. (1993), sendo um ciclo para desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos; desnaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 30 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C, respectivamente; e um ciclo a 72°C durante dez minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores P35 e P36, (STURM et al., 1989), apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2 – Seqüência de oligonucleotídeos para *Trypanosoma cruzi* e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados.

Iniciador	Seqüência	Tamanho do fragmento esperado em pares de bases
P35*	5' AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA 3'	330**
P36*	5' GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT 3'	

*STURM et al., 1989

**Correspondem à amplificação do fragmento contendo uma região específica do minicírculo de kDNA do *T.cruzi* (VALLEJO et al., 1999).

O procedimento de identificação dos produtos amplificados pela eletroforese em gel de agarose a 2% seguiu a mesma metodologia descrita para *Leishmania* spp.

Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa "Y" de *T.cruzi* amplificada, e como negativos água miliQ (controle negativo da extração) e o MIX-PCR (controle negativo da PCR). Para o padrão de peso molecular foi utilizado o DNA Ladder® (Invitrogen).

4.8.7 Limiar de detecção do DNA de *Trypanosoma. cruzi* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para determinar o limiar de detecção de *T. cruzi* pela PCR, realizou-se metodologia semelhante à empregada para a detecção do limiar de *Leishmania* spp. (Anexo 4). Para tanto, foram utilizadas epimastigotas da cepa "Y" de *T. cruzi*, mantidas em meio de cultura LIT, provenientes do NUPEZO, da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP.

5 – RESULTADOS

Os resultados obtidos pela RIFI, exames parasitológicos diretos e PCRs para o diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase americana nos cães avaliados encontram-se no Anexo 5.

Para avaliação da acuidade diagnóstica das técnicas, o exame parasitológico direto foi considerado como padrão-ouro. Considerou-se resultado positivo quando eram observadas formas amastigotas em ao menos um dos órgãos avaliados (fígado e/ou baço).

5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

Todas as amostras de soros dos 100 cães do Canil Municipal de Botucatu foram negativas (não reagentes) pela técnica de RIFI para *Leishmania* spp.

Em relação às amostras de soros dos 100 cães do CCZ de Bauru, verificou-se que 65 apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* spp., com títulos entre 40 e 2560.

Os resultados obtidos pela RIFI nas 200 amostras de soros testadas, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1 – Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp., em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo o resultado do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008.

		RIFI		Total
		Positivo	**Negativo**	
Exame parasitológico direto (fígado e/ou baço)	Positivo	55	11	**66**
	Negativo	10	124	**134**
	Total	**65**	**135**	**200**

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

TABELA 2 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2008.

Exame (nr/np/nt) [1]	***Sens*** [2] ***(%)***	***Esp*** [3] ***(%)***	***Vpp*** [4] ***(%)***	***Vpn*** [5] ***(%)***	***Ac*** [6] ***(%)***	***Kappa*** [7]	***p*** [8]
RIFI (66/65/200)	83,3%	92,5%	84,6%	91,1%	89,0%	0,751	<0,001*

(1) nr: número de resultados positivos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço; np: número de resultados positivos para *Leishmania* spp. pela RIFI; nt: total de exames;
(2) Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos);
(3) Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos);
(4) Estimativa do valor preditivo positivo (Percentual de diagnósticos positivos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço, dado que o diagnóstico foi positivo pela RIFI para *Leishmania* spp.);
(5) Estimativa do valor preditivo negativo (Percentual de resultados negativos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço, dado que o resultado foi positivo pela RIFI para *Leishmania* spp.);
(6) Estimativa da acurácia (Percentual de resultados corretos pela RIFI);
(7) Estimativa do coeficiente de concordância Kappa;
(8) Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

*Não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos testes diagnósticos, segundo o teste de McNemar ($p<0,001$), com coeficiente $\kappa=0,751$, indicando substancial concordância entre os resultados das provas (MACKINNON, 2000).

5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Das 100 amostras testadas de soros de cães de Botucatu-SP, apenas quatro foram positivas (reagentes) pela técnica de RIFI para *T. cruzi,* sendo uma amostra com título 40 e outras três com título 20.

Com relação às 100 amostras de soros colhidas de cães de Bauru-SP, 40 apresentavam anticorpos anti-*T.cruzi,* com títulos entre 20 e 1280.

5.3 Reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI detectou anticorpos contra ambos parasitos em trinta e três soros dos 100 cães de Bauru. Não houve detecção de anticorpos simultâneos contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi* nas 100 amostras avaliadas dos cães de Botucatu.

Na Tabela 3 são apresentadas as distribuições de resultados positivos e negativos pela RIFI para *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, considerando as 200 amostras de soros caninos avaliadas.

TABELA 3 – Distribuição dos resultados obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e/ou anti-*Trypanosoma cruzi* em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008.

Diagnóstico	**Freqüência absoluta**	**Percentual relativo**
(-) *Leishmania* spp. e (-) *T. cruzi*	120	60,0%
(+) *Leishmania* spp. e (-) *T. cruzi*	32	16,0%
(-) *Leishmania* spp. e (+) *T. cruzi*	15	7,5%
(+) *Leishmania* spp. e (+) *T. cruzi*	**33**	**16,5%**
Total	**200**	**100,0%**

(+) positivo para presença de anticorpos contra o parasito

(-) negativo para presença de anticorpos contra o parasito

A distribuição comparativa dos títulos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T.cruzi* detectados pela RIFI nas 200 amostras de soros caninos examinadas pode ser observada na Tabela 4.

TABELA 4 – Distribuição comparativa entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e/ou anti-*Trypanosoma cruzi* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008.

Títulos	Freqüência absoluta	Percentual relativo*	Percentual relativo**
Leishmania spp. > *T.cruzi*	22	66,7%	11%
Leishmania spp. < *T.cruzi*	4	12,1%	0,2%
Leishmania spp. = *T.cruzi*	7	21,2%	0,3%
Total	33	100,0%	16,5%

>-maior; <-menor; =-igual
*Percentual relativo ao total de reações cruzadas.
**Percentual relativo ao total de 200 amostras de soros testadas (de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP).

A relação entre títulos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T.cruzi* pode ser observada na Tabela 5.

TABELA 5 – Resumo descritivo e comparação entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*Trypanosoma cruzi* detectados pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008.

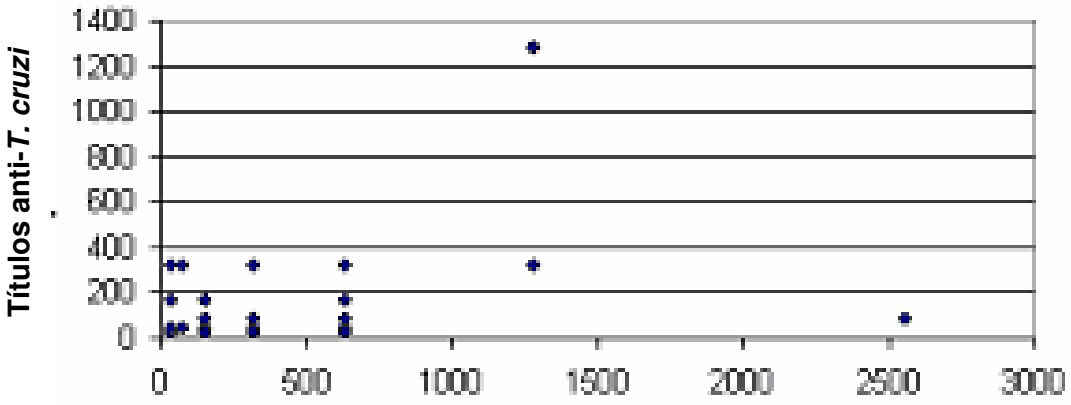
	RIFI para *Leishmania* spp. (n=33)	RIFI para *T. cruzi* (n=33)	*p*(*)
Título	320 (120; 640)	80 (40; 240)	<0,001

(*) Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (MACKINNON, 2000).

A probabilidade da RIFI para *Leishmania* spp. e para *T.cruzi* produzirem títulos com valores semelhantes, por mero acaso, é menor que 0,001 (0,1%), o que significa que os títulos de anticorpos detectados pela RIFI para *Leishmania* spp. foram significativamente superiores aos títulos obtidos para *T. cruzi*.

O Gráfico 1 representa a dispersão entre os títulos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* detectados pela RIFI nas amostras de soros caninos avaliadas.

GRÁFICO 1 – Dispersão entre os títulos de anticorpos contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, 2008.



Observa-se graficamente que não há indícios de correlação linear ou qualquer outra entre os títulos obtidos pela RIFI para *Leishmania* spp. e para *T. cruzi*, ou seja, o aumento dos títulos para *Leishmania* spp. não provocou aumento nem diminuição dos títulos obtidos para *T. cruzi*. A aparente correlação não significativa é confirmada pela estimativa do coeficiente de correlação linear de Spearman em 0,170 com p-valor associado de 0,344 (MACKINNON, 2000).

5.4 Exames parasitológicos diretos de fragmentos de fígado e baço

Não foram encontradas formas amastigotas nas 100 amostras de fígado e 100 amostras de baço colhidas de cães eutanasiados no canil municipal de Botucatu-SP, ou seja, os exames parasitológicos diretos resultaram negativos para todas as amostras analisadas.

Cinqüenta e nove amostras de fígado e 51 amostras de baço de cães eutanasiados no CCZ de Bauru-SP foram positivas ao exame parasitológico direto. Quarenta e quatro cães apresentaram formas amastigotas em ambos

órgãos. No total, 66 amostras de fígado e/ou baço foram positivas ao exame parasitológico direto.

Trinta amostras de fígado e/ou de baço dos 33 cães que apresentaram anticorpos contra *Leishmania* spp. e *T. cruzi* pela RIFI resultaram positivas ao exame parasitológico direto do fígado e/ou do baço.

Os resultados do exame parasitológico direto do fígado, utilizando o exame parasitológico como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 6.

TABELA 6 – Resultados do exame parasitológico direto de fígado de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu, 2008.

		Exame parasitológico direto de fígado		**Total**
		Positivo	**Negativo**	
Exame parasitológico direto (fígado e/ou baço)	Positivo	59	7	**66**
	Negativo	0	134	**134**
	Total	**59**	**141**	**200**

Os resultados do exame parasitológico direto de baço, utilizando o exame parasitológico direto como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 7.

TABELA 7 – Resultados do exame parasitológico direto de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008.

		Exame parasitológico direto de baço		**Total**
		Positivo	**Negativo**	
Exame parasitológico direto (fígado e/ou baço)	Positivo	51	15	**66**
	Negativo	0	134	**134**
	Total	**51**	**149**	**200**

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa dos exames parasitológicos diretos de fígado e de baço, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 8.

TABELA 8 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa dos exames parasitológicos diretos de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2008.

Exame (nr/np/nt)[1]	***Sens [2] (%)***	***Esp [3] (%)***	***Vpp [4] (%)***	***Vpn [5] (%)***	***Ac [6] (%)***	***Kappa [7]***	***p [8]***
Exame parasitológico direto de fígado (66/59/200)	89,3%	100%	100%	95,0%	96,5%	0,919	<0,001*
Exame parasitológico direto de baço (66/51/200)	77,2%	100%	100%	89,9%	92,5%	0,882	<0,001

(1) nr: número de resultados positivos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço; np: número de resultados positivos pelo exame em avaliação; nt: total de exames;
(2) Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos);
(3) Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos);
(4) Estimativa do valor preditivo positivo (Percentual de resultados positivos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço, dado que o resultado foi positivo pelo exame avaliado);
(5) Estimativa do valor preditivo negativo (Percentual de resultados negativos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço, dado que o resultado foi positivo pelo exame avaliado);
(6) Estimativa da acurácia (Percentual de resultados corretos pelo exame avaliado);
(7) Estimativa do coeficiente de concordância Kappa;
(8) Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

*Não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos testes diagnósticos, segundo o teste de McNemar (p<0,001), com coeficiente κ=0,919 (parasitológico do fígado) e κ=0,882 (parasitológico do baço), indicando substancial concordância entre os resultados das provas (MACKINNON, 2000).

A Figura 1 ilustra um exame parasitológico direto positivo, em amostra de fígado de cão de Bauru-SP, apresentando formas amastigotas acumuladas no interior do citoplasma de macrófago (ninho de amastigotas), e isoladas no espaço intercelular.

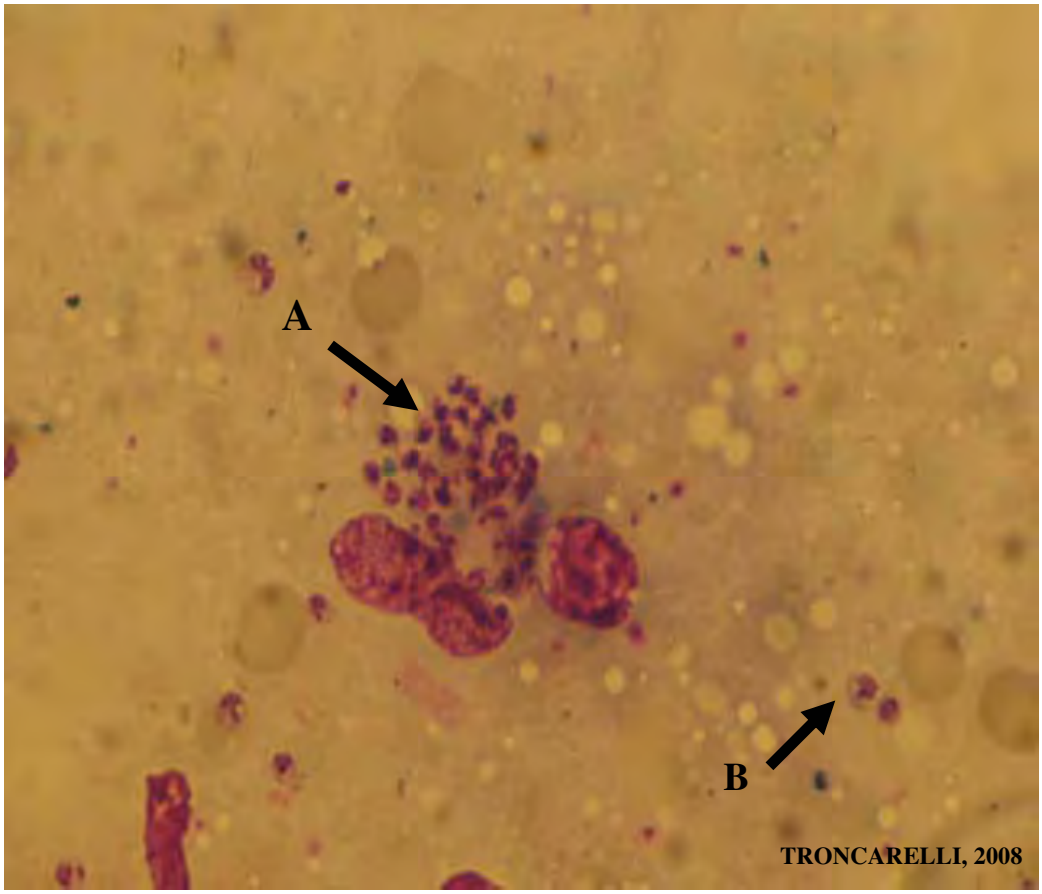


FIGURA 1 – *Imprint* de fígado de cão demonstrando presença de formas amastigotas. Coloração Giemsa, aumento 1000X. Botucatu-SP, 2008.

Legenda: A seta "A" indica acúmulo de formas amastigotas no interior do citoplasma de macrófago. A seta "B" indica forma amastigota isolada, apresentando as três estruturas principais avaliadas para diagnóstico (citoplasma, núcleo e cinetoplasto).

5.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Leishmania* spp.

Todas as 100 amostras de fígado e 100 amostras de baço colhidas de cães eutanasiados no canil municipal de Botucatu foram negativas à presença de DNA de *Leishmania* spp.

Setenta e seis amostras de fígado e 72 amostras de baço de cães eutanasiados no CCZ de Bauru foram positivas pela técnica de PCR para *Leishmania* spp. Sessenta e sete cães apresentaram PCR positiva para *Leishmania* spp., tanto no fígado quanto no baço. No total, 81 amostras de fígado e/ou baço foram positivas pela PCR.

Dos 33 cães cujos soros apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T.cruzi*, 30 animais apresentaram resultado positivo pela PCR para *Leishmania* spp. em amostras de fígado e/ou de baço. Somente um animal apresentou anticorpos contra ambos parasitos e resultados negativos aos exames parasitológicos e PCR para *Leishmania* spp.

Os resultados da PCR de fígado para detecção do DNA de *Leishmania* spp., utilizando o exame parasitológico direto como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 9.

TABELA 9 – Resultados da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008.

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
Exame parasitológico direto (fígado e/ou baço)	Positivo	57	9	**66**
	Negativo	19	115	**134**
	Total	**76**	**124**	**200**

Os resultados da PCR de baço para detecção do DNA de *Leishmania* spp., utilizando o exame parasitológico direto como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 10.

TABELA 10 – Resultados da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008.

		PCR		Total
		Positivo	**Negativo**	
Exame parasitológico direto (fígado e/ou baço)	Positivo	59	7	**66**
	Negativo	13	121	**134**
	Total	**72**	**128**	**200**

Os resultados da PCR de fígado e/ou baço para *Leishmania* spp., utilizando o exame parasitológico direto como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 11.

TABELA 11 – Resultados da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, segundo os resultados do exame parasitológico direto. Botucatu-SP, 2008.

		PCR		Total
		Positivo	**Negativo**	
Exame parasitológico direto (fígado e/ou baço)	Positivo	62	4	**66**
	Negativo	19	115	**134**
	Total	**81**	**119**	**200**

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa da PCR de fígado e baço, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro, podem ser observados na Tabela 12.

TABELA 12 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia e coeficiente Kappa da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção do DNA de *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP, considerando o exame parasitológico direto como padrão-ouro. Botucatu-SP, 2008.

Exame (nr/np/nt) [1]	***Sens*** [2] ***(%)***	***Esp*** [3] ***(%)***	***Vpp*** [4] ***(%)***	***Vpn*** [5] ***(%)***	***Ac*** [6] ***(%)***	***Kappa*** [7]	***p*** [8]
PCR de fígado (66/76/200)	86,3%	85,8%	75,0%	91,9%	85,5%	0,685	<0,001*
PCR de baço (66/72/200)	89,3%	90,2%	81,9%	93,8%	89,5%	0,769	<0,001*
PCR (fígado e/ou baço) (66/81/200)	93,9%	85,8%	76,5%	95,8%	88,0%	0,744	<0,001*

(1) nr: número de resultados positivos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço; np: número de resultados positivos para *Leishmania* spp. pela PCR; nt: total de exames;
(2) Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos);
(3) Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos);
(4) Estimativa do valor preditivo positivo (Percentual de resultados positivos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço, dado que o resultado foi positivo pela PCR para *Leishmania* spp.);
(5) Estimativa do valor preditivo negativo (Percentual de resultados negativos pelo exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço, dado que o resultado foi positivo pela PCR para *Leishmania* spp.);
(6) Estimativa da acurácia (Percentual de resultados corretos pela PCR para *Leishmania* spp.);
(7) Estimativa do coeficiente de concordância Kappa;
(8) Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

*Não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos testes diagnósticos, segundo o teste de McNemar ($p<0,001$), com coeficiente $\kappa=0,744$, indicando substancial concordância entre os resultados das provas (MACKINNON, 2000).

A Figura 2 ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores LINR4 e LIN19.

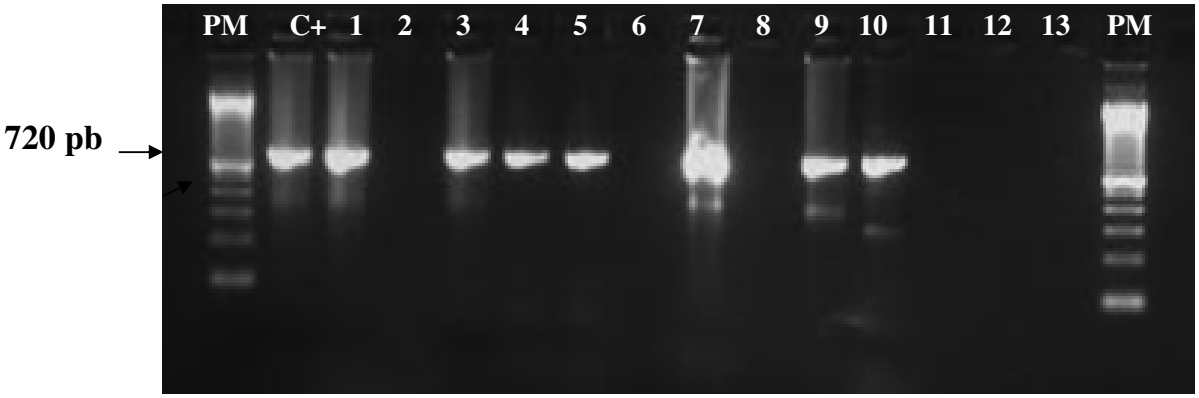


FIGURA 2 – Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir de amostras de baço de cães de Bauru-SP. Amostras amplificadas utilizando-se os iniciadores LIN19 e LINR4. Gel de agarose 2%. Botucatu-SP, 2008.

Legenda: pb-pares de bases; PM-peso molecular; C+ controle positivo (*L.major*); 1,3,4,5,9,10-amostras positivas; 7-amostra positiva com excesso de DNA; 2,6,8,11-amostras negativas; 12-controle negativo da extração (água miliQ); 13-controle negativo da PCR (MIX-PCR).

5.5.1 Limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Após a realização dos procedimentos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela PCR (Anexo 3), verificou-se à eletroforese a presença de bandas com 720 pb, na amostra pura de cultura, bem como nas diluições 10^3, 10^2 e 10^1. Não houve presença de banda na diluição 10^0. Com isso, concluiu-se que a sensibilidade analítica da PCR, utilizando os iniciadores LINR4 e LIN19, foi de 10 parasitos/mL.

5.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Trypanosoma cruzi*

A PCR resultou negativa para a presença de DNA de *T.cruzi* em todas as amostras de fígado e baço colhidas, tanto dos 100 cães de Botucatu, quanto dos 100 cães de Bauru.

A Figura 3 ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *T.cruzi*, pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores P35 e P36.

FIGURA 3 – Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Trypanosoma cruzi*, pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir de amostras de fígado de cães de Botucatu-SP. Amostras amplificadas utilizando-se os iniciadores P35 e P36. Gel de agarose 2%. Botucatu-SP, 2008.

Legenda: pb-pares de bases; PM-peso molecular; C+ controle positivo (cepa "Y" de *T.cruzi*); 1 a 8-amostras negativas; 9-controle negativo da extração (água miliQ); 10-controle negativo da PCR (MIX-PCR).

5.6.1 Limiar de detecção do DNA de *Trypanosoma cruzi* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Após a realização dos procedimentos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *T.cruzi* pela PCR (Anexo 4), verificou-se à eletroforese a presença de bandas com 330 pb, na amostra pura de cultura, bem como nas diluições 10^3, 10^2 e 10^1. Não houve presença de banda na diluição 10^0. Com

isso, concluiu-se que a sensibilidade analítica da PCR, utilizando os iniciadores P35 e P36, foi de 10 parasitos/mL.

5.7 Metodologia de análise estatística

5.7.1 Análise de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Realizou-se a análise exploratória dos dados e a elaboração de tabelas de distribuição de freqüências, de acordo com os resultados obtidos pela RIFI para *Leishmania* spp. e para *T.cruzi*. Foi construído gráfico de dispersão entre os títulos detectados pela RIFI para *Leishmania* spp. e *T.cruzi* e realizou-se a análise da simetria da distribuição dos títulos por meio do teste de Shapiro-Wilk (MACKINNON, 2000).

A comparação entre os resultados para *Leishmania* spp. e *T.cruzi* pela RIFI, em relação aos títulos obtidos, foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para amostras dependentes (MACKINNON, 2000).

5.7.2 Avaliação da acurácia das técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), exames parasitológicos diretos e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As técnicas diagnósticas utilizadas no estudo foram avaliadas pela estimativa da acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e coeficiente Kappa para a concordância entre o diagnóstico obtido entre os testes, utilizando o exame parasitológico direto de fígado e/ou baço como padrão-ouro (MACKINNON, 2000).

6 – DISCUSSÃO

6.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os resultados negativos pela RIFI para *Leishmania* spp. nas amostras de soros dos 100 cães de Botucatu-SP utilizados neste estudo corroboram com os resultados obtidos por Langoni et al. (2001), que testaram 781 amostras de soros de cães pela técnica de RIFI e todas resultaram negativas. Com efeito, nosso estudo contribuiu para a vigilância ativa da leishmaniose no município, estando em linha com as medidas sugeridas pelo Ministério da Saúde, cujo novo enfoque é incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância da mesma, visando a evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão (BRASIL, 2006).

A soroprevalência para leishmaniose nos 100 cães avaliados de Bauru-SP foi de 65%, com títulos de anticorpos entre 40 e 2560. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores, em inquéritos epidemiológicos realizados em populações caninas de áreas endêmicas. Silva et al. (2001b), que utilizaram a RIFI para examinar 164 amostras de soros de cães em Belo Horizonte-MG, com 106 (64,6%) positivas para LV, e 78 (73,6%) amostras apresentando títulos superiores a 640. Albuquerque et al. (2007) também verificaram soropositividade em 64% (16/25) dos cães sintomáticos de Recife-PE, pela técnica de RIFI.

É importante ressaltar, no entanto, que as prevalências de leishmaniose detectadas em cães eutanasiados em CCZs, em áreas endêmicas, são mais elevadas que as reais prevalências da população canina total, tendo em vista que a maioria dos cães destinados a estes Centros apresenta suspeita clínica para LV ou são identificados como sorologicamente positivos em inquéritos de massa. Nunes et al. (2001) observaram soropositividade pela RIFI em 23 (23,7%) de 97 cães no Mato Grosso do Sul, com títulos variando de 20 a 640. Dantas-Torres et al. (2006) avaliaram 322 cães em área endêmica de Pernambuco e destes, 130 (40,3%) foram sorologicamente positivos pela técnica de RIFI (CRUZ, 2006). De janeiro a novembro de 2006, a Secretaria de Saúde de Campo Grande-MS colheu amostras de 37.613 cães do município,

detectando 9.052 (24%) amostras positivas pela RIFI para *Leishmania* spp. (UCDB, 2006).

A RIFI utilizada no presente estudo apresentou sensibilidade de 83,3% e especificidade de 92,5%, para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em soros de cães. Embora Sundar e Rai (2002) afirmassem que os antígenos comumente utilizados nos testes sorológicos derivados de meios de cultura pudessem produzir reações cruzadas não somente com outras espécies da família Trypanosomatidae, como também com microrganismos filogeneticamente distantes, a RIFI apresentou elevada especificidade no presente estudo, mesmo utilizando como antígeno formas promastigotas de *L. major* obtidas de meio de cultura. Ferreira et al. (2007), em análise de 234 cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., em Belo Horizonte-MG, utilizando *L.infantum* (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) como antígeno, evidenciaram valores de sensibilidade e especificidade de 72% e 52%; 95% e 64% e 93% e 95%, respectivamente, para RIFI, ELISA e DAT, demonstrando que a RIFI apresentou a menor eficácia diagnóstica.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados da RIFI e os obtidos nos exames parasitológicos de fígado e/ou de baço, indicando substancial concordância entre os resultados das provas. Estes dados corroboram os obtidos por Mancianti e Meciani (1988), que compararam as técnicas de RIFI, hemaglutinação indireta (HAI) e imunoeletroforese para o diagnóstico *L. infantum* em 88 amostras de soros de cães da Itália, naturalmente infectados. Os autores consideraram o exame parasitológico como padrão ouro e constataram que a RIFI apresentou melhor especificidade e sensibilidade, detectando 100% dos cães infectados.

Em Bauru, onde a leishmaniose é endêmica, 65 amostras de soros caninos foram positivas pela RIFI para *Leishmania* spp., e 40 foram positivas para *T.cruzi,* das 100 amostras examinadas. Por outro lado, em Botucatu-SP, onde a leishmaniose é indene, somente quatro das 100 amostras testadas apresentaram soropositividade para *T.cruzi*. Os resultados verificados a partir de amostras de soros de cães de Botucatu-SP assemelham-se aos observados por Reyes et al. (2002), que testaram 176 amostras de soros caninos de áreas endêmicas e não-endêmicas para doença de Chagas, na Costa Rica, pela técnica de ELISA, e identificaram somente 11 animais soropositivos (6,2%). No

entanto, as soroprevalências caninas para *T. cruzi* podem variar em uma mesma região. Montenegro et al. (2002), testaram soros de 54 cães também da Costa Rica, pelas técnicas de RIFI, ELISA e HAI para a pesquisa de anticorpos contra *T.cruzi*. Foram considerados positivos os soros com resultados positivos em dois testes. Os pesquisadores verificaram soropositividade em 15 amostras (27,7%), com 14 positivas aos três testes sorológicos e uma positiva em dois testes.

6.1.1 Reações cruzadas

Foi verificada soropositividade simultânea para *Leishmania* spp. e para *T.cruzi*, nas amostras de soros de 33 (16,5%) dos 200 cães avaliados no presente estudo. Estes resultados corroboram os verificados por Troncarelli et al. (2008) que, comparando os resultados obtidos pela RIFI em 826 amostras de soros caninos, examinados no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ-UNESP/Botucatu, para a avaliação de reações cruzadas, verificaram que 135 (16,3%) amostras apresentaram resultados positivos para ambos parasitos.

Em 22 amostras (11%) avaliadas no presente estudo, os títulos contra *Leishmania* spp. foram superiores aos títulos encontrados para *T.cruzi*, e, de maneira semelhante, 113 amostras (13,7%) apresentaram títulos superiores contra *Leishmania* spp. no estudo realizado por Troncarelli et al. (2008). Em apenas sete amostras (0,3%), os títulos encontrados para os dois parasitos foram idênticos, enquanto que em 15 amostras (1,8%) avaliadas por Troncarelli et al. (2008), os títulos contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi* foram iguais. Estes mesmos autores verificaram que, em sete amostras (0,8%), foram detectados títulos contra *T. cruzi* superiores aos identificados para *Leishmania* spp. e, no presente estudo, somente em quatro amostras (0,2%) este fenômeno ocorreu.

Os resultados da freqüência de reações cruzadas entre os dois parasitos, obtidos no presente estudo, também são semelhantes aos encontrados por Silveira et al. (1996), que avaliaram 132 cães, de seis propriedades agrícolas do Paraná, para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (V.) braziliensis* e anti-*T.cruzi*, pela técnica de RIFI. Vinte e quatro amostras (18,2%) foram sorologicamente positivas para ambos parasitos. Estes pesquisadores constataram que os títulos detectados para *T.cruzi* foram

sempre menores (variando de 20 a 80) do que os obtidos para *Leishmania (V.) braziliensis* (variando de 40 a 320).

Em áreas endêmicas para tripanossomíase, verifica-se que os títulos para *Trypanosoma* spp. são, em geral, superiores aos detectados para *Leishmania* spp. Beard et al. (2003) identificaram reações cruzadas entre *T. cruzi* e *Leishmania donovani* pela RIFI em 17 de 28 amostras de soros de cães provenientes de área endêmica para tripanossomíase no Texas. Os pesquisadores verificaram que os títulos para leishmaniose eram de uma a duas diluições menores do que aquelas encontradas para *T. cruzi*, indicando resposta primária para *T. cruzi*. Ainda que a prevalência de tripanossomíase em cães de Bauru-SP seja desconhecida, os resultados obtidos por estes autores diferem dos verificados no presente estudo, pois, apesar de não existir correlação linear entre os títulos para ambos parasitos, os títulos para *Leishmania* spp. foram substancialmente superiores aos detectados para *T.cruzi* nas amostras de soros dos 100 cães de Bauru-SP.

A cepa "Y" de *T.cruzi* (parasito íntegro) foi utilizada como antígeno para a RIFI, o que poderia possibilitar um maior número de reações cruzadas com *Leishmania* spp., devido à proximidade filogenética entre os parasitos. No entanto, mesmo quando se utilizam antígenos mais específicos de *T.cruzi* em provas sorológicas para o diagnóstico da doença de Chagas em cães, ainda podem ser verificadas reações cruzadas entre *T.cruzi* e *Leishmania* spp. Lauricella et al. (1998) utilizaram a fração flagelar do *T.cruzi* como antígeno para a padronização do ELISA para diagnóstico canino. Para tanto, utilizaram amostras de soros de 182 cães naturalmente infectados na Argentina. Os pesquisadores compararam o ELISA com a HAI e a RIFI, e verificaram a ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *T.cruzi* em todas as técnicas avaliadas.

Ressalta-se, por outro lado que, em áreas endêmicas para LVC, as reações cruzadas pela RIFI para *Leishmania* spp. e *T.cruzi* em amostras de soros caninos nem sempre apresentam freqüências elevadas. Maywald et al. (1996) testaram, pela RIFI, 331 soros de cães de Uberlândia e Coromandel, em Minas Gerais. Foram utilizados como antígenos *L. amazonensis* e *T. cruzi*. Em Uberlândia, examinaram-se 230 amostras, sendo 200 colhidas de cães da área urbana e 30 de cães da área rural. Foram detectadas 4,5% e 6,6% amostras

positivas para *Leishmania* spp., dos cães da área urbana e da área rural, respectivamente. Em Coromandel, de 89 soros testados, 5,6% foram positivos para *Leishmania* spp. Foram avaliadas ainda 12 amostras de soros obtidas de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, com suspeita clínica para leishmaniose. Destas, somente uma foi positiva para *Leishmania* spp. e outra resultou positiva para *T.cruzi*.

De maneira semelhante, Cabral et al. (1998) detectaram pela RIFI 0,9% (3/327) e 0,6% (2/327) amostras positivas para Leishmania spp. e T.cruzi, respectivamente, em eluatos sangüíneos de cães da região rural do município de Uberlândia-MG. Rosypal et al. (2007) realizaram um estudo com 107 amostras de soros de cães do município de São Paulo, e 258 amostras de Bogotá, para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T.cruzi*, pela técnica de RIFI, utilizando promastigotas de *L.infantum* como antígeno. Os pesquisadores verificaram que cinco amostras de soros (4,7%) de cães do Brasil foram positivas para *Leishmania* spp., com títulos entre 25 e 100. Quatro amostras (1,6%) dos cães da Colômbia foram positivas, com título de 25. Do total de 365 amostras examinadas, nenhuma apresentou títulos de anticorpos contra *T.cruzi*, concordando com os resultados obtidos no presente estudo em amostras de soros de 100 cães de Botucatu-SP.

Há que se considerar, por outro lado, que existem áreas endêmicas de sobreposição para *Leishmania* spp. e *T.cruzi*, especialmente nas Américas, onde casos de co-infecção por ambos parasitos podem ocorrer, tanto em cães como em humanos. Com efeito, os resultados obtidos à sorologia podem demonstrar presença de anticorpos contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi*, não representando necessariamente reação cruzada, e sim infecção por ambos protozoários. Em estudo realizado por Grosjean et al. (2003), nos Estados Unidos, foram examinadas 957 amostras de soros de cães pela técnica de RIFI para *Leishmania* spp., com somente 18 amostras positivas, sendo 16 amostras com títulos variando de 16 a 64. As outras duas amostras apresentaram título igual ou superior a 128 e nestas foram detectados também anticorpos anti-*T.cruzi*, determinados pelo teste de radioimunoprecipitação. *T.cruzi* é enzoótico em cães domésticos e canídeos silvestres, especialmente na região sul dos Estados Unidos (DUPREY et al., 2006). Nesta região, assim como nas demais áreas endêmicas para doença de Chagas em canídeos, o resultado positivo à

sorologia para *T.cruzi* pode sugerir a real infecção pelo parasito, sendo necessária a avaliação clínico-epidemiológica do animal, bem como a utilização de técnicas complementares para a elucidação diagnóstica.

6.2 Exames parasitológicos diretos

A ausência de formas amastigotas ao exame parasitológico direto de amostras de fígado e baço dos 100 cães de Botucatu-SP sugere a não infecção por *Leishmania* spp. e por *T.cruzi* nestes animais. Com relação aos 100 cães de Bauru-SP, foi detectado um maior número de resultados positivos em amostras de fígado (59%) do que em amostras de baço (51%). No entanto, não houve diferença estatística na sensibilidade e especificidade do exame parasitológico direto entre os órgãos avaliados.

A utilização de amostras de fígado e baço contribuiu para a melhoria da acuidade diagnóstica do exame parasitológico direto. Quarenta e quatro animais apresentavam formas amastigotas em ambos órgãos e 66 apresentavam-se positivas em pelo menos um dos órgãos examinados, o que indica que nem sempre um animal parasitado apresentava amastigotas em fígado e em baço. Se estes órgãos tivessem sido utilizados de maneira isolada para o diagnóstico, o número de resultados falso-negativos seria maior.

A sensibilidade do exame parasitológico para a detecção de *Leishmania* spp. e *T.cruzi* apresenta variações, que estão relacionadas, entre outros fatores, ao tipo de tecido avaliado. Isto se deve, possivelmente, à provável diferença na distribuição tecidual do parasito. As sensibilidades dos exames parasitológicos diretos de fígado e de baço dos cães de Bauru foram elevadas, sendo 89,3% e 77,2%, respectivamente. Estes resultados diferem dos obtidos por Moreira et al. (2007), que avaliaram pelo exame parasitológico direto amostras de linfonodo, baço, fígado e aspirado de medula óssea de 89 cães da região de Araçatuba-SP, naturalmente infectados por *Leishmania* spp. Os pesquisadores verificaram que a sensibilidade do método em amostras de fígado de cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, foi de apenas 26,83%, 12% e 13,04%; contra 43,9%, 40% e 38,13% de sensibilidade para amostras de baço. Os autores sugerem que a menor sensibilidade nos dois últimos grupos se deve provavelmente à maior destruição das formas

amastigotas devido à resposta imune mais efetiva, reduzindo a carga parasitária nos tecidos.

Machado (2008) realizou um estudo de infecção experimental com *L.chagasi* em camundongos Balb/c imunossuprimidos e verificaram menor carga parasitária em amostras de fígado do que em amostras de baço dos animais. A pesquisadora relatou que no fígado ocorre a formação de granulomas parasitários, de forma a conter o protozoário. No baço, não há formação de granulomas e, por este motivo, a carga parasitária é, em geral, superior. No presente estudo, não foi realizada a contagem de formas amastigotas por campo microscópico, ao exame parasitológico direto de tecidos caninos. No entanto, mesmo considerando que o número absoluto de amostras positivas de fígado foi superior ao de amostras positivas de baço, foi possível inferir que a quantidade de formas parasitárias no baço era superior à verificada no fígado do mesmo animal.

6.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp.

A ausência de resultados positivos pela PCR para *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Botucatu-SP indicam a não infecção destes animais pelo parasito, confirmando os resultados negativos pela RIFI e pelos exames parasitológicos diretos a partir de fragmentos de órgãos dos mesmos cães. Com relação aos 100 cães de Bauru-SP, à semelhança do que ocorreu nos exames parasitológicos, a PCR para *Leishmania* spp. detectou um maior número de resultados positivos em amostras de fígado (76%) do que em amostras de baço (72%). No entanto, também não houve diferença estatisticamente significativa na sensibilidade e especificidade da técnica entre os órgãos avaliados.

A utilização de amostras de fígado e de baço contribuiu para a melhoria da acuidade diagnóstica da PCR para o diagnóstico de *Leishmania* spp. Sessenta e sete animais apresentavam formas amastigotas em ambos órgãos e 81 apresentavam-se positivas em pelo menos um dos órgãos examinados. A PCR realizada com amostras de fígado apresentou 86,3% de sensibilidade e 85,8% de especificidade para o diagnóstico da leishmaniose, enquanto que a PCR de amostras de baço apresentou 89,3% de sensibilidade e 90,2% de

especificidade. Considerando os resultados de PCR a partir de amostras de fígado e/ou de baço, a técnica apresentou 93,9% de sensibilidade e 85,8% de especificidade. Estes resultados comprovam a excelente acuidade da PCR, concordando com os relatos de outros pesquisadores, que verificaram até 100% de sensibilidade da PCR na detecção do DNA de *Leishmania* spp em amostras biológicas de cães (MATHIS e DEPLAZES, 1995; LACHAUD et al., 2002b; REITHINGER e DUJARDIN, 2007).

No presente estudo, o exame parasitológico direto foi considerado padrão-ouro, de acordo com as práticas diagnósticas usuais. No entanto, a PCR apresentou substancial concordância com o exame parasitológico, e poderia ter sido considerada como padrão-ouro, sem qualquer prejuízo diagnóstico. Gomes et al. (2007) selecionaram 114 cães de 30 municípios endêmicos para LV em São Paulo, para colheita de fragmentos de fígado, baço e linfonodos (cães sintomáticos), e punção aspirativa de linfonodos e/ou biopsia de pele (cães assintomáticos), para exame parasitológico (cultura e avaliação microscópica) e PCR para a detecção de *L.* (*L.*) *chagasi*, *L.* (*V.*) *braziliensis* e, em alguns casos, *Leishmania* spp. À semelhança do que ocorreu no presente estudo, os testes parasitológicos e a PCR-*L. chagasi* realizados por estes pesquisadores apresentaram concordância de resultados em 105 amostras (92%), sendo que a LV foi confirmada em 49 cães. Das 114 amostras avaliadas, nove apresentaram resultados discordantes, e foram testadas pela PCR-*Leishmania* spp., resultando positivas. LV foi também confirmada pela PCR-*L. chagasi* em quatro cães que haviam apresentado resultados negativos aos testes parasitológicos. Conseqüentemente, esta PCR foi positiva em 100% (53/49) dos cães com exames parasitológicos positivos. A PCR demonstrou ainda elevada especificidade, detectando 61 cães negativos para LV. Cinco amostras foram positivas pela PCR-*L. braziliensis*.

Soares et al. (2005) também verificaram excelentes resultados com a utilização da PCR a partir de amostras de rins, baço, linfonodos e fígado de 25 cães sintomáticos para LV e 15 cães assintomáticos, soropositivos para *Leishmania* spp., em Teresina-PI. A PCR resultou positiva em amostras de fígado, linfonodo e/ou baço de todos os animais sintomáticos e de dois cães assintomáticos. As amostras de rins de oito cães sintomáticos foram também positivas pela PCR.

Os órgãos de eleição para a realização do exame parasitológico direto e da PCR, no presente estudo, foram fígado e baço, visando à melhor acuidade e elucidação diagnóstica. No entanto, sabe-se que a prática de punção aspirativa pela técnica de Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF), ou mesmo a biopsia de fragmentos de fígado e baço, devem ser realizadas com cautela, especialmente em cães que apresentam hepato e/ou esplenomegalia, devido ao risco de hemorragia. Apesar da PCR ter apresentado elevadas sensibilidade e especificidade a partir de amostras de fígado e baço, a técnica tem sido empregada com bons resultados por outros pesquisadores, utilizando amostras de sangue ou punções aspirativas de linfonodos e de medula óssea. Reale et al. (1999) avaliaram a técnica de PCR para o diagnóstico da leishmaniose, a partir de 124 amostras de sangue e 52 aspirados de linfonodos de cães da Itália, soronegativos ou soropositivos pela RIFI. Trinta e sete animais apresentavam sinais clínicos sugestivos da doença. A PCR foi positiva em 40% dos animais sem lesões e 38% dos cães sintomáticos, que haviam apresentado resultados falso-negativos pela RIFI. Em outro estudo, realizado por Silva et al. (2001b), a PCR de 70 amostras de sangue de cães de Belo Horizonte, MG, (52 soropositivos e 18 soronegativos) e de três aspirados de medula óssea. A PCR foi positiva em 39 (75%) amostras soropositivas.

Ikonomopoulos et al. (2003) também obtiveram excelentes resultados com a PCR e conseguiram identificar, utilizando esta técnica, 41,9% de cães infectados de 160 casos clínicos na Grécia. Do mesmo número de casos, 46,25% foram positivos pela RIFI, com títulos iguais ou superiores a 200, e 19% foram positivos ao exame microscópico de aspirados de linfonodos. Strauss-Ayali et al. (2004) compararam a técnica sorológica, o cultivo parasitológico e a PCR a partir de amostras de suabes conjuntivais e aspirados esplênicos e de linfonodos de 96 cães de Israel. Um total de 92% cães naturalmente infectados, soropositivos e sintomáticos foram positivos pela PCR em suabes conjuntivais. Os aspirados de baço e linfonodos foram positivos em 86% pela PCR e 74% pelo cultivo. A sensibilidade e a especificidade da PCR conjuntival foram 92% e 100%, respectivamente. Cães experimentalmente infectados foram positivos pela PCR conjuntival aos 45 dias de infecção (83%) e após soroconversão.

Devido à elevada sensibilidade da PCR para o diagnóstico de *Leishmania* spp., como constatado no presente estudo, esta técnica pode identificar animais infectados que apresentaram resultados negativos à sorologia. Lachaud et al. (2002b) avaliaram dois métodos de PCR para o diagnóstico da LVC, um para a detecção do DNA genômico do parasito e outro para a detecção do kDNA. Para tanto, foram utilizadas diferentes amostras biológicas de 263 cães da França. A PCR foi comparada com a sorologia e todos os resultados foram analisados de acordo com o status clínico dos animais. A prevalência de infecção canina foi de 79,8% pela PCR e 29,6% pela sorologia, e 89,4% de cães sintomáticos e 65,2% de assintomáticos apresentavam parasitos no sangue periférico.

Há que se considerar, no entanto, que a técnica de PCR detecta o DNA de *Leishmania* spp., e que não necessariamente o parasito esteja viável. Como descrito na literatura, existem casos de cães cujo sistema imune consegue debelar a infecção, e o parasito pode permanecer inerte no organismo do animal. Com isso, a PCR pode detectar o DNA do protozoário sem que o mesmo esteja viável no organismo dos cães. Ainda assim, especialmente frente à situação epidemiológica favorável para ocorrência de LVC, o resultado positivo da PCR para *Leishmania* spp. a partir de amostras caninas deve ser considerado.

6.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para diagnóstico da infecção por *Trypanosoma cruzi*

Com relação à PCR para a pesquisa de *T.cruzi*, todas as amostras de fígado e baço dos cães dos 200 cães avaliados foram negativas, indicando a não infecção destes animais pelo parasito. Os resultados negativos em cães de Botucatu-SP diferem dos obtidos por Lucheis et al. (2005), que verificaram 50% de positividade por esta técnica em amostras de sangue de cães de pacientes chagásicos da região deste município. Como a prevalência de doença de Chagas canina é desconhecida nos municípios de Bauru-SP e Botucatu-SP, acreditamos que a doença canina esteja presente em áreas restritas, especialmente em regiões onde existam casos humanos.

A utilização de tecidos caninos melhora a acuidade diagnóstica da PCR, em relação a amostras de fluidos. Se a amostra avaliada no presente estudo

fosse sangue total, a PCR teria que ser repetida por várias vezes, como foi verificado por Araújo et al. (2002). Estes pesquisadores compararam a PCR de amostras de sangue, com exames parasitológicos (hemocultura e xenocultura) e testes sorológicos para a detecção de *T.cruzi* em cães, após 5 a 12 anos de infecção experimental. Os métodos sorológicos detectaram anticorpos em todos os animais; a hemocultura detectou o parasito em 22% das amostras e o xenodiagnóstico foi positivo em 11%. A PCR resultou positiva em todos os cães infectados. No entanto, para a detecção de um cão positivo pela PCR, eram necessárias pelo menos duas amostras de sangue total. Foram colhidas nove amostras seriadas de cada animal para a realização da PCR, que apresentou aumento da sensibilidade de 67% para 100%. Os autores sugeriram que a técnica, apesar de detectar o DNA do parasito em animais infectados, não deve ser utilizada de forma isolada para o diagnóstico da doença de Chagas em cães.

6.5 Diagnóstico elucidativo para leishmaniose e tripanossomíase americana em cães frente às reações cruzadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Dos 33 cães que apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* pela RIFI, verificou-se que 30 amostras (90,9%) de fígado e/ou de baço resultaram positivas ao exame parasitológico direto e 30 amostras (90,9%) de fígado e/ou de baço foram positivas à PCR para *Leishmania* spp.

Considerando somente os cães com resultado sorológico positivo para ambos parasitos, em dois casos em que houve resultados negativos ao exame parasitológico direto de amostras de fígado e/ou de baço, a PCR resultou positiva para *Leishmania* spp. em pelo menos um destes órgãos. Em outros dois casos em que houve PCR negativa em amostras de fígado e/ou de baço, o exame parasitológico direto resultou positivo em pelo menos um destes órgãos, confirmando o diagnóstico para leishmaniose. Somente um cão apresentou soro com anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* pela RIFI, com título 640 para *Leishmania* spp. e 20 para *T.cruzi*, mas resultados negativos nas amostras de fígado e de baço, tanto ao exame parasitológico direto, quanto pela PCR para *Leishmania* spp. Estes resultados sugerem a

ocorrência de reduzida carga parasitária nos órgãos avaliados, que pode não ter possibilitado a detecção pelos exames parasitológicos e biomoleculares.

A ausência de resultados negativos pela PCR para *T.cruzi*, bem como os resultados positivos, tanto aos exames parasitológicos diretos, quanto pela PCR para *Leishmania* spp., indicam a real infecção dos cães de Bauru-SP por este parasito. Tal elucidação diagnóstica foi possível devido à utilização das três técnicas (sorológica, parasitológica e biomolecular), de maneira associada.

7 – CONCLUSÕES

- A utilização de três técnicas diagnósticas (Reação de Imunofluorescência Indireta, exame parasitológico direto e Reação em Cadeia pela Polimerase) possibilitou elevada acuidade para o diagnóstico elucidativo da leishmaniose e da doença de Chagas em cães procedentes de Bauru-SP e Botucatu-SP.

- A Reação de Imunofluorescência Indireta detectou anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* em 33 amostras de soros do total de 200 cães avaliados em Bauru-SP e Botucatu-SP, o que representa 16,5% de reações cruzadas.

- Considerando somente os 33 cães cujas sorologias apresentaram títulos contra *Leishmania* spp. e *T.cruzi*, tanto o exame parasitológico direto como a Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp., resultaram positivos em 30 amostras de fígado e/ou baço destes animais.

- Todas as amostras de fígado e baço de cães que foram positivas para *Leishmania* spp. pela Reação em Cadeia pela Polimerase, apresentaram resultados negativos para a presença do DNA de *T. cruzi,* indicando a verdadeira infecção dos animais por *Leishmania* spp.

- Houve ocorrência de reações inespecíficas (falso-positivas) pela Reação de Imunofluorescência Indireta para *T.cruzi* em cães parasitados por *Leishmania* spp.

8 – BIBLIOGRAFIA[1]

ALBUQUERQUE, A.R.; ARAGÃO, F.R.; FAUSTINO, M.A.G.; GOMES, Y.M.; LIRA, R.A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. *Clín. Vet.*, n.71, p.78-80, 2007.

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

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.

ARANSAY, A.M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.1933-1938, 2000.

ARAUJO, F.M.G.; BAHIA, M.T.; MAGALHÃES, N.M.; MARTINS-FILHO, O. A.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TAFURI, W.L.; LANA, M. Follow-up of experimental chronic Chagas'disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop.*, v.81, n.1, p. 21-31, 2002.

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 polimerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.53, n.3, p.251-255, 1995.

---

[1]ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

AVILA, H.A.; PEREIRA, J.B.; THIEMAN, O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.M.; SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimen of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, n.9, p.2421-2426, 1993.

BARBOSA, G.M.S.; MARZOCHI, M.C.A.; MASSARD, C.L.; LIMA, G.P.S.; CONFORT, E.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no município de Paraty, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.15, n.3, p.641-646, 1999.

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

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

BEARD, C.B.; PYE, G.; STEURER, F.J.; RODRIGUEZ, R.; CAMPMAN, R.; PETERSON, A.T.; RAMSEY, J.; WIRTZ, R.A.; ROBINSON, L.E. Chagas Disease in a domestic transmission cycle, southern Texas, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, n.1, 2003. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol0no1/02-0217.htm>. Acesso em: 20 fev. 2006.

BRADLEY, K.K; BERGMAN, D.K.; WOODS, J.P.; CRUTCHER, J.M.; KIRKCHHOFF, L.V. Prevalence of American trypanosomiasis (Chagas' disease) among dogs in Oklahoma. *JAVMA,* v. 217, p.1853-1857, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.* Brasília, 2000, p.7-11.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol. Eletrôn. Epidemiol.,* v.2, n.6, p.2-11, 2002.

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

CABRAL, D.D.; SILVA, D.A.O.S.; MIRANDA, E.O.; CUNHA, L.; FUKUSSIMA, A.C.; STUTZ, W.; BASTOS, J.E.D.; FERREIRA, F.A. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. donovani*, anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da área rural do município de Uberlândia, MG, Brasil. *Vet. Not.*, v.4, n.1, 1998. Disponível em: <http://www.famev.ufu.br/vetnot/vetnot4/res4-1.html>. Acesso em: 12 abr. 2008.

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. São Paulo,* v.8, p.227-234, 1966.

CAMARGO, M.E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.18, p.500-505, 1969.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. *Leishmaniose visceral americana*: doença emergente no estado de São Paulo. São Paulo: Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml>. Acesso em: 20 set. 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sob a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., s. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.,* v.1, p.159-218, 1909.

CHIARAMONTE, M.G.; ZWIRNER, N.W.; CAROPRESI, S.L.; HEREDIA, V.; TARANTO, N.J.; MALCHIODI, E.L. Study of cases of leishmaniasis in the Province of Salta: evidences of mixed infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Med. B. Aires*, v.53, n.3, p.259-268, 1996.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELLO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES ROCHA,

N.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemilógicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,* v. 24, p.21-15, 1991.

CRUZ, B. *Cães apresentam alta incidência de leishmaniose em município pernambucano*. Rio de Janeiro: Agência Fiocruz de Notícias, 2006. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=776&sid=9>. Acesso em: 10 set. 2007.

DE LIMA, H.; CARRERO, J.; RODRIGUEZ, A.; DE GUGLIELMO, Z.; RODRIGUEZ, N. Trypanosomatidae de importância en salud pública en animales silvestres y sinantrópicos en un área rural del município Tovar del estado Mérida. *Venez. Bioméd.*, v.26, p.42-50, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis Public Health Aspects and Control. *Clin. Dermatol.*, v.14, p.417-423. 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology. *Microbiol. Infect. Dis.,* v.27, p.305-318, 2004.

DUPREY, Z.H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A.; KIRCHHOFF, L.V.; JACKSON, J.E.; ROWTON, E.D.; SCHANTZ, P.M. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg. Infect. Dis.,* v.12, n.3, p.440-446, 2006.

FARRELL, J.P. *Leishmania*. World class Parasites: v.4. London: Kluwer Academic Publishers, 2002. p.45-57.

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). *Clín. Vet.*, n.28, p.36-44, 2000.

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. *Vet. Parasitol.,* v.146, p.235-241, 2007.

GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R.; CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.; ARAÚJO, M.F.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of

Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis *Vet. Parasitol.,* v.144, supl. 3-4, p. 234-241, 2007.

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

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

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.

GÜRTLER, R.E.; COHEN, J.E.; CECERE, M.C.; LAURICELLA, M.A.; CHUIT, R.; SEGURA, E.L. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina*. Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.58, p.748-758, 1998.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.,* v.25, p.363-370, 2000.

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

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

LACHAUD, L.; MACHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.,* v.40, p.210-215, 2002a.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J.P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitoogy*, v.125, n.3, p.197-207, 2002b.

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

LANGONI, H.; MODOLO, J.R.; SOUZA, L.C.; ARAUJO, W.N.; SHIMABUKURO, F.H.; MENDONCA, A.O.; LEITE, B.L.S.; PADOVANI, C.R. Epidemiological vigilance for canine leishmaniasis in the county of Botucatu, SP, Brazil. *Ars Vet*., v.17, p.196-200, 2001.

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

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

LÓPEZ-ANTUÑANO, F.J.; RANGEL-FLORES, H.; RAMOS, C. Diagnosis of Chagas' Disease. *Rev. Latinoam. Microbiol*., v.42, p.121-129, 2000.

LUCHEIS, S.B.; DA SILVA, A.V.; ARAÚJO JR. 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.

LUKES, J.; MAURICIO, I.L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K.W.Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATIONG, F.; OBORNIK, M.; HORÁK, 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 autóctone no município de Araçatuba-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 2., 1999, Águas de Lindóia, SP. *Anais*... Águas de Lindóia, 1999, p.24.

LUVIZOTTO, M.C. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). In: FORT DODGE. *Leishmune Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina.* Campinas: Fort Dodge Saúde Animal, 2003. p. 28-29.

LUZ, Z.M.P.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.L.V.; FIÚZA, V.O.P.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.3, p.249-254, 2001.

MACHADO, J.G. *Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004.* 2004. 48f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MACHADO, J.G. *Resposta imune celular frente à inoculação experimental por Leishmania chagasi em camundongos Balb/c imunossuprimidos.* 2008. 94f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MACKINNON, D.P. *Introduction to statistical mediation analysis*. New York: Routledge Academic, 2000. 488p.

MADEIRA, M.F.; UCHÔA, C.M.A.; LEAL, C.A.; SILVA, R.M.M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,* v.36, n.5, 2003.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.M.P.; PACHECO, R.S.; OLIVEIRA, F.S.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M.C.A. Mixed infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.100, p.442-445, 2006.

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

MASSUNARI, G.K. *Inquérito sorológico e molecular da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em cães de área endêmica, no noroeste do estado do Paraná.* 2007. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá. Disponível em:

<www.pan.uem.br/Formularios/Cap.%20I%20e%20III/PDF%20Completo/Gustavo.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2008.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.5, p.1145-1149, 1995.

MAYWALD, P.G.; MACHADO, M.I.; CRUZ, J.M.C.; PIRES, M.R.F.G. 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.

MEURS, K.M.; ANTHONY, M.A.; SLATER, M.; MILLER, M.W. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). *JAVMA*, v.213, p.497-500, 1998.

MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona, Spain. *Proceedings*... Barcelona. 1999. p. 46-53.

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.

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

MOREIRA, M. A. B. ; LUVIZOTTO, M. C. R. ; GARCIA, J. F. ; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods of the diagnosis of leishmaniasis in dog with different clinical signs. *J. Vet. Parasitol.*, v.42, p.65, 2007.

MOSER, D.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by polymerase chain reaction gene amplification. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, p.1744-1749, 1989.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet,* v.366, p.1561-1577, 2005.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.5, p.1666-1669, 2002.

NICOLLE, C. Sur trois cas d infection splénique infantile à corps de Leishman observés in Tunisia. *Arch. Inst. Pasteur***,** v. 3, p. 1-26, 1908.

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.; D'ÁURIA, 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, n.3, p.301-302, 2001.

OSMAN, O.F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E.E.; KROON, N.C.M.; SCHOONE, G.J.; KHALIL, E.A.G.; EL-HASSAN, A.M.; KAGER, P.A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, n.10, p.2454-2457, 1997.

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

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.9, p.2931-2935, 1999.

REIS, A.B. *Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas da infecção.* 2001. 176f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog *(Canis familiaris)* a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.61, p.530-541, 1999.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J.C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C.R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screeening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n.4, p.1486-1493, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.1, p.21-25, 2007.

REYES, L.; SILESKY, E.; CERDAS, C.; CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. *Parasitol. Latinoam.*, v.57, p.66-68, 2002.

ROSÁRIO, E. Y. *Avaliação de testes sorológicos utilizando antígenos brutos e recombinantes para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.* 2002. 99f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROSYPAL, A.C.; CORTÉS-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.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (Sao Paulo, Brazil). *Vet. Parasitol.*, v.150, p.283-290, 2007.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA, V.L.; PACHECO, R.S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPÍNDOLA, C.B.; SOUZA, M.B.; PONTE, C.S.; CONCEIÇÃO, N.F.; ANDRADE, M.V. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.2, 2005.

SÃO 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.M.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; CASTILHO, T.M., ARAUJO, F.S.; ILHA, I.M.N.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; FLOETER-WINTER, L.M. Ocurrence of co-infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.*, v.100, n.7, p.739-741, 2005.

SCHOFIELD, C.J.; DIAS, J.C.P. The southern cone initiative against Chagas' disease. In: BAKER, J.R.; MULLER, R.; ROLLINSON, D. (Eds.). *Adv. Parasitol.* London: Academic Press, 1999. p.2-22.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.; 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, 2001a.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.*, v.96, n.3, p.285-291, 2001b.

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

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the diagnosis of Leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.*, v.49, p.55-60, 2003.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In:___. *Infectious Diseases of the dog and the cat.* 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. cap.73, p.450-457.

SOARES, M.J.V.; MORAES, J.R.E.; ROSELINO, A.M.F. Polymerase chain reaction in detecting *Leishmania* spp. in symptomatic and asymptomatic seropositive dogs. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.,* v.11, n.4, versão online, 2005.

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. *J. Clin. Microbiol.,* v.39, p.560-563, 2001.

STORINO, R.A.; MILEI, J. *Enfermedad de Chagas.* Buenos Aires: Doym, 1994.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.*, v.189, p.1729-1733, 2004.

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's 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, n.5, p.951-958, 2002.

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, n.1, p. 40-47, 2008.

UCDB Em Foco. Leishmaniose mata 18 em MS. *Jornal Laboratório do Curso de Jornalismo,* Campo Grande-MS. Ano V, edição n. 57, p.4, 2006.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M. Specie 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.

VEXENAT, J.A.; FONSECA DE CASTRO, J.A.; CAVALCANTE, R.; SILVA, M.R.P.; BATISTA, W.H.; FURTADO CAMPOS, J.H.; ALVES PEREIRA, F.C.; TAVARES, J.P.; MILES, M.A. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Teresina, N.E., Brazil. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, v.70, p.467-472, 1993.

VEXENAT, J.A.; CASTRO, J.A.F.; CAVALCANTE, R.; TAVARES, J.P.; SILVA, M.R.P.; BATISTA, W.H.; CAMPOS, J.H.F.; HOWARD, M.K.; FRAME, I.;

McNERNEY, R.; WILSON, S.; MILES, M.A. Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p.131-135, 1994.

VEXENAT, A.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi, Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev. *Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, p.177-185, 1996.

WHO - World Health Organization. *Control of Chagas' disease.* Report of a WHO Exppert Committee. Geneva: WHO, 1991. (Technical Report Series, 811).

WHO - World Health Organization.*Second report of the WHO Expert Committee, Control of Chagas' disease.* Geneve: WHO, 2002. p.55-63. (Technical report series, 905).

ZANETTE, M.F.; FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; ROSSI, C.N.; CAMACHO, A. A.; SOUZA, A. I. Ocorrência de reação cruzada entre doença de Chagas e Leishmaniose visceral canina pela técnica de ELISA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 27., CONGRESSO DA FIAVAC, 3., 2006, Vitória - Espírito Santo. *Anais*... Vitória, 2006. p.96.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E.A.G.; EL-HASSAN, A. M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from Sudan. *Trop. Med. Int. Health*, v.6, p.108-113, 2001.

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

ANEXOS

ANEXO 1: Parecer da Câmara de Ética em Experimentação Animal

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Iniciação Científica **"Infecção por *Leishmania spp* e/ou por *Trypanosoma cruzi* em cães provenientes de área endêmica e não endêmica para Leishmaniose visceral canina"**, Protocolo nº 58/2006-CEEA de **Marcella Zampoli Troncarelli,** acadêmico(a) desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 19 de maio de 2006.

PROFª.ASS.DRª. MICHIKO SAKATE
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

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

ANEXO 2: Extração de DNA de amostras de tecido animal utilizando o GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit® (Amersham Biosciences)

- ✓ Homogeneizar as amostras individualmente em vórtex durante 20 segundos.
- ✓ Adicionar 100 µL de cada amostra em um microtubo de 1,5 mL, livre de RNAses e DNAses.
- ✓ Centrifugar a 13.000 × g por 5 segundos.
- ✓ Remover o sobrenadante com uma micropipeta, deixando 30 µL de líquido residual.
- ✓ Homogeneizar o tubo em vórtex vigorosamente para ressuspender as células e o sobrenadante residual.
- ✓ Adicionar 600 µL de solução de lise nas células ressuspendidas e pipetar levemente para cima e para baixo para lisar as células.
- ✓ Adicionar 3 µL da solução de RNAse ao lisado celular. Homogeneizar cada amostra invertendo o tubo 25 vezes e incubar a 37ºC por 30 minutos.
- ✓ Após o período de incubação, adicionar 200 µL de solução de precipitação de proteínas ao lisado celular que foi tratado com RNase.
- ✓ Homogeneizar em vórtex vigorosamente em velocidade máxima durante 20 segundos para misturar uniformemente a solução de precipitação de proteínas com o lisado celular.
- ✓ Centrifugar a 13.000 × g durante 3 minutos. O precipitado de proteínas formará um pellet firme. Cuidadosamente derramar o sobrenadante contendo o DNA em um microtubo limpo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol a 100%.
- ✓ Descartar o tubo contendo o pellet de proteína. Misturar a amostra invertendo gentilmente por 50 vezes.
- ✓ Centrifugar a 13.000 × g durante 1 minuto. Derramar o sobrenadante e secar o tubo com um papel absorvente limpo.

- ✓ Adicionar 600 µL de etanol a 70%. Inverter o tubo 25 vezes para lavar o pellet de DNA.
- ✓ Centrifugar a 13.000× g por 1 minuto. Cuidadosamente derramar o etanol sem desprender o pellet de DNA.
- ✓ Secar o tubo em um papel absorvente limpo e colocar a amostra em secagem por ar por 15 minutos.
- ✓ Adicionar 100 µL de solução de hidratação de DNA.
- ✓ O volume de 100 µL fornece a concentração de 100 µL/mL se o rendimento total de DNA for de 10µg.
- ✓ Permitir que o DNA reidrate *overnight* à temperatura ambiente.
- ✓ O produto da extração deve ser mantido a -20ºC até o momento da realização da PCR.

ANEXO 3: Ensaio do limiar de detecção de *Leishmania* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi utilizada amostra de *Leishmania* spp. proveniente de repique em meio de cultura LIT e NNN, utilizada na rotina diagnóstica, gentilmente cedida pelo NUPEZO. Foram pipetados 5 mL de meio LIT com formas promastigotas viáveis de dois diferentes tubos de cultura e em seguida acondicionados em tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi mantido durante 15 minutos em banho-maria para que as promastigotas permanecessem imóveis durante o procedimento de contagem. A amostra foi homogeneizada e uma alíquota foi utilizada para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Foram procedidas seis contagens de cinco quadrantes em cada avaliação, de maneira bem distribuída por toda câmara. A média obtida em cinco quadrantes foi de 127 formas promastigotas. Para obtenção do número de parasitos por mL de meio de cultura foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{n^o \text{ de promastigotas contadas}}{0{,}1\ mm^3 \times 1 \times 0{,}2 \text{ (dimensões da câmara)}} = \textbf{n}^{\textbf{o}}\ \textbf{promastigotas/mL}$$

Sendo: 0,1 a altura da câmara de Neubauer

1 é a diluição utilizada na contagem, ou seja, meio de cultura puro

0,2 é o número de campos contados dividido pelo número total de campos (5/25)

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

Para se obter valores em potências de 10, foi calculado o volume de meio de cultura com concentração de 1000 formas promastigotas (10^3):

1 mL ---------6.350 x = 0,1575 mL ou **157,5 µL**

X mL--------1.000

Em seguida, utilizou-se 157,5 µL de meio de cultura em 842,5 µL de água destilada totalizando 1 mL de amostra, ou seja, 10^3 parasitos por mL de solução. As diluições seguintes foram realizadas de maneira que as soluções resultantes nos novos tubos ficassem 10 vezes mais diluídas que no tubo anterior, produzindo concentrações 10^2, 10^1 e 10^0 formas promastigotas por mL de solução.

As soluções resultantes foram utilizadas para extração do DNA, utilizando o mesmo protocolo pelo qual foram extraídas as amostras de fígado e baço, bem como os controles positivos. O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores LINR4 e LIN19, para que se pudesse obter a concentração mínima de parasitos por mL de amostra detectável nas provas.

ANEXO 4: Ensaio do limiar de detecção de *Trypanosoma cruzi* pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi utilizada amostra de *T.cruzi* (cepa "Y") proveniente de repique em meio de cultura LIT e NNN, utilizada na rotina diagnóstica, gentilmente cedida pelo NUPEZO. Foram pipetados 5 mL de meio LIT com formas epimastigotas viáveis de dois diferentes tubos de cultura e em seguida acondicionados em tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi mantido durante 15 minutos em banho-maria para que as epimastigotas permanecessem imóveis durante o procedimento de contagem. A amostra foi homogeneizada e uma alíquota foi utilizada para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Foram procedidas seis contagens de cinco quadrantes em cada avaliação, de maneira bem distribuída por toda câmara. A média obtida em cinco quadrantes foi de 98 formas epimastigotas. Para obtenção do número de parasitos por mL de meio de cultura foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{n^o \text{ de epimastigotas contadas}}{0{,}1\ mm^3 \times 1 \times 0{,}2 \text{ (dimensões da câmara)}} = \textbf{n}^{\textbf{o}}\ \textbf{epimastigotas/mL}$$

Sendo: 0,1 a altura da câmara de Neubauer

1 é a diluição utilizada na contagem, ou seja, meio de cultura puro

0,2 é o número de campos contados dividido pelo número total de campos (5/25)

Então: 98/0,02 = 4.900 epimastigotas/mL ou seja **$4{,}90 \times 10^3$/mL**

Para se obter valores em potências de 10, foi calculado o volume de meio de cultura com concentração de 1000 formas epimastigotas (10^3):

1 mL ---------4.900 x = 0,2040 mL ou **204,0 µL**

X mL--------1.000

Em seguida, utilizou-se 204,0 µL de meio de cultura em 796,0 µL de água destilada totalizando 1 mL de amostra, ou seja, 10^3 parasitos por mL de solução. As diluições seguintes foram realizadas de maneira que as soluções resultantes nos novos tubos ficassem 10 vezes mais diluídas que no tubo anterior, produzindo concentrações 10^2, 10^1 e 10^0 formas promastigotas por mL de solução.

As soluções resultantes foram utilizadas para extração do DNA, utilizando o mesmo protocolo pelo qual foram extraídas as amostras de fígado e baço, bem como os controles positivos. O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores P35 e P36, para que se pudesse obter a concentração mínima de parasitos por mL de amostra detectável nas provas.

APÊNDICE

APÊNDICE

Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), exames parasitológicos diretos e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de amostras de fígado e baço para o diagnóstico de *Leishmania* spp. e de *Trypanosoma cruzi* * em 100 cães de Bauru-SP. Botucatu-SP, 2008.

Identificação do Animal	Título na RIFI para *Leishmania* spp	Título na RIFI para *T.cruzi*	Amastigotas no fígado	PCR no fígado (*Leishmania* spp.)	Amastigotas no baço	PCR no baço (*Leishmania* spp.)
01	640	80	+	+	+	+
02	2560	80	+	+	+	+
03	320	40	+	+	+	+
04	640	NR	+	+	+	+
05	NR	80	-	+	+	+
06	320	320	+	+	+	+
07	NR	NR	-	+	+	+
08	320	NR	-	+	-	+
09	40	20	+	+	+	+
10	640	160	+	+	+	+
11	NR	NR	+	+	-	+
12	160	160	+	+	+	+
13	NR	NR	-	-	-	-
14	40	NR	-	+	-	+
15	640	20	-	-	-	-
16	NR	20	-	-	-	-
17	NR	NR	-	-	-	-
18	160	40	+	+	+	-
19	640	320	+	+	+	+
20	640	160	+	-	+	+

21	320	NR	+	+	-	+
22	1280	1280	+	+	+	+
23	NR	NR	-	-	-	-
24	40	20	+	+	-	-
25	320	320	-	-	+	+
26	NR	NR	+	+	+	+
27	NR	NR	-	+	-	-
28	NR	NR	-	-	-	-
29	160	20	+	+	+	+
30	40	160	+	+	+	+
31	160	80	-	+	+	+
32	NR	NR	-	-	-	-
33	NR	NR	-	-	-	-
34	NR	NR	-	-	-	-
35	80	40	+	+	+	+
36	320	NR	+	+	+	+
37	640	40	+	+	-	+
38	320	80	+	+	-	+
39	40	160	-	-	+	-
40	40	NR	+	-	-	-
41	320	80	+	+	+	+
42	NR	NR	-	-	-	-
43	40	40	-	+	-	-
44	NR	NR	-	-	-	-
45	160	160	+	+	+	+
46	40	320	+	+	-	+
47	NR	NR	-	-	-	-
48	640	NR	+	+	-	+
49	160	NR	+	+	+	+
50	160	NR	+	+	+	+
51	80	NR	+	+	+	+
52	NR	NR	-	+	-	+

53	NR	NR	-	+	-	+
54	160	NR	+	+	+	+
55	NR	NR	+	+	+	+
56	NR	NR	+	+	+	+
57	NR	NR	-	+	-	+
58	NR	640	+	+	-	+
59	NR	20	+	+	+	+
60	320	20	+	+	+	+
61	40	NR	-	+	-	+
62	640	NR	+	+	+	+
63	640	20	+	+	+	+
64	NR	NR	-	+	-	+
65	160	160	-	+	-	+
66	NR	80	-	+	-	-
67	NR	NR	-	+	-	+
68	160	NR	-	+	-	+
69	NR	NR	-	+	-	-
70	NR	NR	+	+	-	+
71	640	NR	+	+	-	+
72	160	NR	+	-	+	+
73	160	NR	-	+	-	-
74	320	NR	+	+	-	+
75	160	NR	+	+	-	+
76	640	NR	-	+	-	+
77	80	NR	-	+	-	+
78	NR	NR	+	+	-	+
79	320	NR	+	+	-	+
80	160	NR	+	+	+	+
81	320	NR	+	+	+	-
82	NR	NR	-	+	-	-
83	NR	NR	-	-	-	-
84	NR	NR	-	-	-	-

85	1280	NR	-	+	+	+
86	320	NR	+	+	+	+
87	320	20	+	+	+	+
88	640	80	-	-	+	-
89	40	NR	+	-	+	-
90	160	NR	+	+	+	+
91	160	NR	+	+	+	+
92	NR	NR	+	+	+	+
93	640	NR	+	+	+	+
94	80	NR	+	-	+	+
95	1280	320	+	+	+	+
96	40	NR	+	-	+	+
97	NR	40	-	+	-	+
98	80	320	+	+	+	+
99	NR	20	-	-	-	-
100	640	320	+	+	+	+
TOTAL(+/-)	65+/35-	40+/60-	59+/41-	76+/24-	51+/49-	72+/28-

NR = Não Reagente; + positivo; - negativo

*** Todas as amostras de fígado e baço dos cães de Bauru e de Botucatu foram negativas pela PCR para *T. cruzi*. Somente quatro amostras de soros dos cães de Botucatu foram positivas pela RIFI para *T. cruzi* (um cão apresentando título 40 e outros três cães com título 20). Todos os exames parasitológicos diretos dos cães de Botucatu foram negativos.**

TRABALHO CIENTÍFICO

TRABALHO CIENTÍFICO A SER ENVIADO PARA A REVISTA VETERINARY PARASITOLOGY

Infection by *Leishmania* spp. and/or by *Trypanosoma cruzi* in dogs from endemic and non-endemic areas for canine visceral leishmaniasis

M.Z. Troncarelli[a,*], J.B. Camargo[a], J.G. Machado[a], S.B. Lucheis[b], H. Langoni[a]

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

[b]*Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA - Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brazil*

*Corresponding author. Tel. +55 14 3811-6270, extension 24

e-mail address: matroncarelli@yahoo.com.br (M.Z. Troncarelli)

Abstract

Due *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) phylogenetical closely, some serological cross-reactions and false-positives results can occur. The objective of this study was to contribute with the elucidative canine leishmaniasis and tripanossomiasis' diagnosis, using Indirect Immunofluorescence (IIF) serologic test, direct parasitological exam and *Leishmania* spp. and *T.cruzi* DNA investigation by Polimerase Chain Reaction (PCR) in liver and spleen samples. It were used 100 culled dogs of Zoonosis Control Center in Bauru-SP where Visceral Leishmaniasis (VL) is endemic, and 100 culled dogs of the municipality kennel in Botucatu-SP where VL is non-endemic. 65% serum samples of dogs from Bauru were positive by IFI for *Leishmania* spp. and 40% were positive for *T. cruzi*. All serum samples of dogs from Botucatu were negative by IFI for leishmaniasis and only 4% were positive for *T. cruzi*. Of a total of 200 tested serum samples, 33 (16.5%) showed serologic positive results for both parasites. 59% and 76% liver and 51% and 72% spleen samples of dogs from Bauru were positive by direct parasitological exams and PCR for *Leishmania* spp., respectivelly. In 30 liver and/or spleen samples of 33 dogs that presented antibodies anti-*Leishmania* spp. and anti-*T.cruzi*, both direct parasitological exam and PCR for *Leishmania* spp. resulted positive, indicating the true dog's infection by this parasite. No liver and spleen samples of 200 dogs from Bauru and Botucatu were positive by PCR for *T. cruzi*. These results reinforce the occurrence of antibodies cross reactions for *Leishmania* spp. and *T. cruzi* by IFI, and also confirm the necessity of a parasitological exam and/or a PCR test for the canine leishmaniasis elucidative diagnosis.

Keywords: Leishmania spp., *Trypanosoma cruzi*, diagnosis, dog.

1. Introdução

O cão é o principal reservatório doméstico de *Leishmania* spp., por apresentar intenso parasitismo cutâneo, contato estreito com humanos e atrair a presença do vetor (Machado, 2004). Uma das medidas de controle preconizadas no Brasil pelo Ministério da Saúde é a eutanásia dos cães positivos em inquéritos sorológicos, especialmente em áreas endêmicas (Brasil, 2006).

Os métodos sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* spp. em cães apresentam alta sensibilidade e especificidade. No entanto, devido à proximidade filogenética entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é possível a ocorrência de reações cruzadas à sorologia, determinando resultados falso-positivos (Troncarelli et al., 2008).

Para um melhor refinamento diagnóstico, faz-se necessário o uso de técnicas complementares, como o exame parasitológico, considerado padrão-ouro, e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que apresenta elevadas sensibilidade e especificidade, pela detecção do DNA do parasito. Com efeito, o objetivo do presente estudo foi contribuir com o diagnóstico elucidativo da leishmaniose e da tripanossomíase americana (doença de Chagas) em cães procedentes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose visceral, utilizando três técnicas associadas: a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o exame parasitológico direto e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de amostras de fígado e de baço.

2. Material e métodos

Animais e amostras

No estudo foram utilizados 100 cães (53 machos e 47 fêmeas, sem raça definida), eutanasiados no Canil Municipal de Botucatu-SP, e 100 cães (50 machos e 50 fêmeas, sem raça definida), eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Bauru-SP.

Um total de 5-10mL de sangue foi colhido de cada animal, e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, para a obtenção dos soros, que foram mantidos a -20^{o}C para posterior realização da técnica de RIFI.

Fragmentos de fígado e baço, de aproximadamente 100g, foram colhidos imediatamente após a eutanásia. No Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP)/Botucatu-SP, foram retirados fragmentos com cerca de 1g, de cada amostra, e acondicionados em microtubos estéreis de 1,5 mL, livres de DNAses e RNAses, contendo 1 mL de solução salina tamponada (PBS) 0,01M, pH 7,2 estéril (Nicolas et al., 2002), e mantidos a -20^{o}C até o momento da extração do DNA para a realização da PCR.

As colheitas de amostras foram realizadas durante os meses de abril de 2006 a fevereiro de 2007, nas dependências do CCZ de Bauru-SP, e de janeiro a abril de 2007, no Canil Municipal de Botucatu-SP.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela RIFI, utilizou-se como antígeno *L.major,* mantida pelo Núcleo de Pesquisas em Zoonoses

(NUPEZO), da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, de acordo com Camargo (1966). As amostras de soros foram diluídas a partir de 1:40 em PBS pH 7,2, bem como os controles positivos e negativos. Foram consideradas positivas as amostras com títulos iguais ou superiores a 40.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*T.cruzi* utilizou-se como antígeno a cepa "Y"de *T.cruzi*, mantida pelo NUPEZO. As amostras foram diluídas a partir de 1:20 em PBS pH 7,2, bem como os controles positivos e negativos. Foram consideradas positivas as amostras com títulos iguais ou superiores a 20.

Exames parasitológicos diretos

Fragmentos de fígado e baço de cada animal foram utilizados para realização de *imprints*, corados pela técnica de Giemsa para pesquisa de formas amastigotas, em microscópio óptico em aumento de 1000X.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Extração do DNA

Os fragmentos de fígado e baço foram macerados individualmente em grals estéreis, em capela de fluxo laminar. Adicionaram-se 4 mL de PBS estéril, 0,01M, pH 7,2, e homogeneizou-se cuidadosamente. O sobrenadante foi transferido para microtubo estéril, livre de DNAses e RNAses, e mantido a -20°C, até que se realizasse o procedimento de extração do DNA, com a utilização do **GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit®** (Amersham Biosciences), segundo com as recomendações do fabricante.

PCR para pesquisa do DNA de *Leishmania* spp.

Os procedimentos para PCR foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico de Zoonoses (FMVZ-UNESP/Botucatu-SP). O MIX-PCR constituiu de 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-

HCl), 8 µL de dNTPs, 1,5 µL de cloreto de magnésio, 0,3 µL de *Taq*-polimerase, 5 µL de cada iniciador (com concentração de 10 pmol cada), 15,2 µL de água ultra pura e 10 µL da amostra a ser testada (produto de extração de DNA), em cada tubo de reação de 0,2 mL, resultando em volume final de 50 µL .

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram: desnaturação inicial em um ciclo de 95ºC por 3 minutos, seguido de 32 ciclos a 95ºC durante 30 minutos, 58ºC durante 30 minutos e 72ºC durante um minuto, e uma extensão final de 72ºC durante sete minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores LINR4 (5´ GGGTTGGTGTAAAATAGGG 3´) e LIN19 (5´ CAGAACGCCCCTACCCG 3´) (Ikonomopoulos et al., 2003).

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de solução de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X, corado com 2 µL de brometo de etídeo. A corrida foi realizada a 100V durante 60 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador ultravioleta, com filtro de 300 nm. Os géis foram fotografados utilizando sistema de fotodocumentação com câmera Kodak Digital Science DC40®.

Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *L. major,* e como negativos água miliQ (controle negativo da extração) e o MIX-PCR (controle negativo da PCR). Para o padrão de peso molecular foi utilizado o DNA Ladder® (Invitrogen).

PCR para pesquisa do DNA de *Trypanosoma cruzi*

Para a elaboração do MIX-PCR, foi utilizado o mesmo protocolo aplicado para a PCR para *Leishmania* spp. As condições de amplificação em

termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram realizadas de acordo com Ávila et al. (1993), sendo um ciclo para desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos; desnaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 30 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C, respectivamente; e um ciclo a 72°C durante dez minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores P35 (5' AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA 3') e P36 (5' GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT 3') (Sturm et al., 1989).

O procedimento de identificação dos produtos amplificados pela eletroforese em gel de agarose a 2% seguiu a mesma metodologia descrita para *Leishmania* spp. Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa "Y" de *T.cruzi* amplificada, e como negativos água miliQ (controle negativo da extração) e o MIX-PCR (controle negativo da PCR). Para o padrão de peso molecular foi utilizado o DNA Ladder® (Invitrogen).

3. Resultados

RIFI

Todas as amostras de soros dos 100 cães do canil municipal de Botucatu foram negativas pela técnica de RIFI para *Leishmania* spp e apenas quatro foram positivas pela RIFI para *T. cruzi,* sendo uma amostra com título 40 e outras três com título 20. Em relação às amostras de soros dos 100 cães do CCZ de Bauru, verificou-se que 65 apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* spp., com títulos entre 40 e 2560, e 40 amostras apresentavam anticorpos anti-*T.cruzi,* com títulos entre 20 e 1280.

A RIFI apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 83,3% e 92,5%, respectivamente, considerando o exame parasitológico direto de fígado e/ou de baço como padrão-ouro, com coeficiente Kappa 0,751.

A RIFI detectou anticorpos contra ambos parasitos em 16,5% (33/200) 200 soros testados. Na Tabela 1 são apresentadas as distribuições de resultados positivos e negativos pela RIFI para *Leishmania* spp. e *T. cruzi.* A distribuição comparativa dos títulos detectados contra estes parasitos pode ser observada na Tabela 2.

De acordo com a avaliação estatística (Teste de Wilcoxon para amostras dependentes, com $p < 0,001$), os títulos de anticorpos detectados pela RIFI para *Leishmania* spp. foram significativamente superiores aos títulos obtidos para *T. cruzi*.

Exames parasitológicos diretos

Não foram encontradas formas amastigotas nas 100 amostras de fígado e 100 amostras de baço colhidas de cães eutanasiados no canil municipal de Botucatu-SP. 59 amostras de fígado e 51 amostras de baço de cães eutanasiados no CCZ de Bauru-SP foram positivas ao exame parasitológico direto. 44 cães apresentaram amastigotas em ambos órgãos. No total, 66 amostras de fígado e/ou baço foram positivas ao exame parasitológico direto.

Trinta amostras de fígado e/ou de baço dos 33 cães que apresentaram anticorpos contra *Leishmania* spp. e *T. cruzi* pela RIFI resultaram positivas ao exame parasitológico direto do fígado e/ou do baço.

A sensibilidade e especificidade do exame parasitológico de fígado foram de 89,3% e 100%, respectivamente, com coeficiente Kappa de 0,919; enquanto que o exame parasitológico de baço apresentou sensibilidade de 77,2% e especificidade de 100%, com coeficiente Kappa 0,882. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de sensibilidade e

especificidade pelo exame parasitológico direto dos dois órgãos, pelo Teste de McNemar, $p<0,001$ (Mackinnon, 2000).

PCR para *Leishmania* spp.

Todas as 100 amostras de fígado e 100 amostras de baço colhidas de cães eutanasiados no canil municipal de Botucatu foram negativas para a presença de DNA de *Leishmania* spp. 76 amostras de fígado e 72 amostras de baço de cães eutanasiados no CCZ de Bauru foram positivas pela técnica de PCR para *Leishmania* spp. 67 cães apresentaram PCR positiva para *Leishmania* spp., tanto no fígado quanto no baço. No total, 81 amostras de fígado e/ou baço foram positivas pela PCR.

A PCR de fígado apresentou sensibilidade e especificidade de 86,3% e 85,8%, respectivamente, com coeficiente Kappa de 0,685; enquanto que a PCR de baço apresentou 89,3% de sensibilidade e 90,2% de especificidade, com coeficiente Kappa de 0,769. Considerando a PCR de fígado e/ou de baço, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 93,9% e 85,8%, respectivamente, com coeficiente Kappa de 0,744. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as PCRs de fígado e de baço para o diagnóstico da leishmaniose canina, pelo Teste de McNemar, $p<0,001$ (Mackinnon, 2000).

Dos 33 cães cujos soros apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T.cruzi*, 30 animais apresentaram resultado positivo pela PCR para *Leishmania* spp. em amostras de fígado e/ou de baço. Somente um animal apresentou anticorpos contra ambos parasitos e resultados negativos aos exames parasitológicos e PCR para *Leishmania* spp.

PCR para *T. cruzi*

A PCR resultou negativa para a presença de DNA de *T.cruzi* em todas as amostras de fígado e baço colhidas, tanto dos 100 cães de Botucatu, quanto dos 100 cães de Bauru.

4. Discussão

Os resultados negativos pela RIFI para *Leishmania* spp. nas amostras de soros dos 100 cães de Botucatu-SP utilizados no estudo corroboram os resultados obtidos por Langoni et al. (2001), que testaram 781 amostras de soros de cães neste mesmo município, pela técnica de RIFI, e todas resultaram negativas. Com efeito, nosso estudo contribuiu para a vigilância ativa da leishmaniose canina em Botucatu-SP.

A soroprevalência para leishmaniose nos 100 cães avaliados de Bauru-SP foi de 65%, semelhante à verificada por Silva et al. (2001a) - 64,6% (106/164) em cães de Belo Horizonte-MG, Brasil, e por Albuquerque et al. (2007) - 64% (16/25) em cães sintomáticos de Recife-PE, Brasil. É importante ressaltar, no entanto, que as prevalências de leishmaniose detectadas em cães eutanasiados em CCZs, em áreas endêmicas, são mais elevadas que as reais prevalências da população canina geral, tendo em vista que a maioria dos cães destinados a estes Centros apresenta suspeita clínica para LV ou são identificados como sorologicamente positivos em inquéritos de massa.

A soroprevalência para *T.cruzi* em cães de Botucatu-SP foi baixa (4%), quando comparada à detectada em cães de Bauru-SP (40%). Reyes et al. (2002) também verificaram número reduzido de cães positivos para doença de Chagas na Costa Rica – 6,2% (11/176). No entanto, os valores de soroprevalência contra este parasito podem variar em uma mesma região (Montenegro et al., 2002).

A ocorrência de reações cruzadas entre *Leishmania* spp. e *T.cruzi* em soros de cães avaliados no presente estudo - 16,5% (33/200) corroboram a constatada por Silveira et al. (1996) - 18,2% (24/132), em cães do Paraná, Brasil, e também por Troncarelli et al. (2008) - 16,3% (135/826), em soros caninos testados no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ/UNESP-Botucatu, SP, Brasil.

Embora Sundar e Rai (2002) afirmassem que os antígenos comumente utilizados nos testes sorológicos derivados de meios de cultura pudessem produzir reações cruzadas, a RIFI apresentou elevada especificidade no presente estudo, mesmo utilizando como antígeno formas promastigotas de *L. major* obtidas de meio de cultura. Da mesma maneira, a utilização da cepa "Y" de *T.cruzi* (parasito íntegro) como antígeno para a RIFI, poderia possibilitar um maior número de reações cruzadas com *Leishmania* spp. No entanto, mesmo quando se utilizam antígenos mais específicos de *T.cruzi* em provas sorológicas para o diagnóstico da doença de Chagas em cães, ainda podem ocorrer reações cruzadas entre *T.cruzi* e *Leishmania* spp. (Lauricella et al., 1998).

Ressalta-se, por outro lado que, em áreas endêmicas para LVC, as reações cruzadas pela RIFI para *Leishmania* spp. e *T.cruzi* em amostras de soros caninos nem sempre apresentam freqüências elevadas (Maywald et al.,1996; Cabral et al., 1998; Rosypal et al., 2007). Há que se considerar ainda que existem áreas endêmicas de sobreposição para *Leishmania* spp. e *T.cruzi*, especialmente nas Américas, onde casos de co-infecção por ambos parasitos podem ocorrer, tanto em cães como em humanos. Com efeito, os resultados obtidos à sorologia podem demonstrar presença de anticorpos contra

Leishmania spp. e *T.cruzi*, não representando necessariamente reação cruzada, e sim infecção por ambos protozoários (Grosjean et al., 2003).

No presente estudo, houve elevada acuidade diagnóstica ao exame parasitológico de fígado e de baço, para a detecção de cães parasitados. No entanto, é conhecido que a prática de punção aspirativa, ou mesmo a biopsia de fragmentos destes órgãos, devem ser realizadas com cautela, especialmente em cães que apresentam hepato e/ou esplenomegalia, devido ao risco de hemorragia. Ressalta-se ainda que, apesar da PCR também ter apresentado elevadas sensibilidade e especificidade a partir de amostras de fígado e baço, a técnica tem sido empregada com bons resultados por outros pesquisadores, utilizando amostras de sangue ou punções aspirativas de linfonodos e de medula óssea (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001b, Ikonomopoulos et al., 2003; Strauss-Ayali et al., 2004).

A ausência de resultados positivos pela PCR para *Leishmania* spp. a partir de amostras de fígado e de baço de 100 cães de Botucatu-SP indicam a ausência de infecção destes animais pelo parasito, confirmando os resultados negativos pela RIFI e pelos exames parasitológicos diretos. Com relação aos 100 cães de Bauru-SP, a PCR apresentou valores de acuidade elevados para o diagnóstico de leishmaniose, corroborando o que foi constatado por outros pesquisadores, que verificaram até 100% de sensibilidade da técnica para a detecção do DNA do parasito em amostras biológicas de cães (Mathis e Deplazes, 1995; Lachaud et al., 2002; Reithinger e Dujardin, 2007). Além disso, a PCR apresentou substancial concordância com o exame parasitológico.

Os resultados negativos pela PCR para *T.cruzi* em cães de Botucatu-SP, obtidos no presente estudo, diferem dos obtidos por Lucheis et al. (2005), que

verificaram 50% de positividade por esta técnica em amostras de sangue de cães de pacientes chagásicos da região deste município. Como a prevalência de doença de Chagas canina é desconhecida nos municípios de Bauru-SP e Botucatu-SP, sugere-se que a doença canina esteja presente em áreas restritas, especialmente em regiões onde existam casos humanos.

Dos 33 cães que apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* pela RIFI, verificou-se que 30 amostras (90,9%) de fígado e/ou de baço resultaram positivas ao exame parasitológico direto e 30 amostras (90,9%) de fígado e/ou de baço foram positivas à PCR para *Leishmania* spp, confirmando a infecção por este parasito. Somente um cão apresentou soro com anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi* pela RIFI, mas resultados negativos nas amostras de fígado e de baço, tanto ao exame parasitológico direto, quanto pela PCR para *Leishmania* spp. Estes resultados sugerem a ocorrência de somente uma reação inespecífica à sorologia ou reduzida carga parasitária, que pode não ter possibilitado a detecção pelos exames parasitológicos e biomoleculares.

5. Conclusões

A utilização de três técnicas diagnósticas (Reação de Imunofluorescência Indireta, exame parasitológico direto e Reação em Cadeia pela Polimerase) possibilitou elevada acuidade para o diagnóstico elucidativo da leishmaniose e doença de Chagas em cães procedentes de Bauru-SP e Botucatu-SP.

6. Aprovação pela Câmara de Ética

O projeto do presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, protocolo n° 58/2006-CEEA, em 19 de maio de 2006.

7. Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e às equipes técnicas do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP e Canil Municipal de Botucatu-SP pela autorização para realização da pesquisa e suporte com os animais.

8. Referências

Albuquerque, A.R.; Aragão, F.R.; Faustino, M.A.G.; Gomes, Y.M.; Lira, R.A.; Nakasawa, M.; Alves, L.C. 2007. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. Clín. Vet., 71, 78-80.

Avila, H.A.; Pereira, J.B.; Thieman, O.; De Paiva, E.; Degrave, W.; Morel, C.M.; Simpson, L. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimen of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 31:9, 2421-2426.

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

Cabral, D.D.; Silva, D.A.O.S.; Miranda, E.O.; Cunha, L.; Fukussina, A.C.; Stutz, W.; Bastos, J.E.D.; Ferreira, F.A. 1998. Detecção de anticorpos anti-

Leishmania (Viannia) braziliensis e *L. donovani*, anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da área rural do município de Uberlândia, MG, Brasil. Vet. Not., 4:1. Disponível em: http://www.famev.ufu.br/vetnot/vetnot4/res4-1.html

Camargo, M. E. 1996. 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. São Paulo, 8, 227-234.

Grosjean, N.L.; Vrable, R.A.; Murphy, A.J.; Mansfield, L.S. 2003. Seroprevalence of antibodies against *Leishmania* spp. among dogs in the United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 222:5, 603-606.

Ikonomopoulos, J.; Kokotas, S.; Gazouli, M.; Zavras, A.; Stoitsiou, M.; Gorgoulis, V.G. 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet. Parasitol. 113, 99-103.

Lachaud, L.; Machergui-Hammami, S.; Chabbert, E.; Dereure, J.; Dedet, J.P.; Bastien, P. 2002. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. .40, 210-215.

Langoni, H.; Modolo, J.R.; Souza, L.C.; Araujo, W.N.; Shimabukuro, F.H.; Mendonça, A.O.; Leite, B.L.S.; Padovani, C.R. 2001. Epidemiological vigilance for canine leishmaniasis in the county of Botucatu, SP, Brazil. Ars Vet. 17, 196-200.

Lauricella, M.A.; Castañera, M.B.; Gürtler, R.E.; Segura, E.L. 1998. Immunodiagnosis of *Tripanosoma cruzi* (Chagas'Disease) infection in naturally infected dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 93:4, 501-507.

Lucheis, S.B.; Da Silva, A.V.; Araújo Jr. J.P.; Langoni, H.; Meira, D.A.; Marcondes-Machado, J. 2005. 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. 11:4, 492-509.

Machado, J.G. Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004. 2004. 48f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Mackinnon, D.P. Introduction to statistical mediation analysis. New York: Routledge Academic, 2000. 488p.

Mathis, A. e Deplazes, P. 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J. Clin. Microbiol. 33:5, 1145-1149.

Maywald, P.G.; Machado, M.I.; Cruz, J.M.C.; Pires, M.R.F.G. 1996. Leishmaniose tegumentar, visceral e doença de Chagas caninas em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Públ., 12:3, 321-328.

Montenegro, V.M.; Jiménez, M.; Dias, J.C.P.; Zeledón, R. 2002. Chagas Disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97:4, 491-494.

Reale, S.; Maxia, L.; Vitale, F.; Glorioso, N.S.; Caracappa, S.; Vesco, G. 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J. Clin. Microbiol. 37:9, 2931-2935.

Reithinger, R. e Dujardin, J.C. 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. J. Clin. Microbiol. 45:1, 21-25.

Reyes, L.; Silesky, E.; Cerdas, C.; Chinchilla, M.; Guerrero, O. 2002. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. Parasitol. Latinoam., 57, 66-68.

Rosypal, A.C.; Cortés-Vecino, J.A.; Gennari, S.M.; Dubey, J.P.; Tidwell, R.R.; Lindsay, D.S. 2007. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. Vet. Parasitol., 149, 172-177.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.; Pirmez, C.; Fernandes, O.; Brazil, R.P. 2001a. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 65:6, 896-898.

Silva, E.S.; Gontijo, C.M.F.; Pacheco, R.S.; Fiuza, V.O.P.; Brazil, R.P. 2001b. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96:3, 285-291.

Silveira, T.G.V.; Teodoro, U.; Lonardoni, M.V.C.; Toledo, M.J.O.; Bertolini, D.A.; Arraes, S.M.A.A.; Filho, D.V. 1996. Investigação sorológica em cães de area endêmica de leishmaniose tegumentar, no Estado do Paraná, Sul do Brasil. Cad. Saúde Públ., 12:1, 89-93.

413 Strauss-Ayali, D.; Jaffe, C.L.; Burshtain, O.; Gonen, L.; Baneth, G. 2004.
414 Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the
415 detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. J. Infect. Dis. 189, 1729-1733.

416 Sturm, N.; Degrave, W.; Morel, C.; Simpson, L. 1989. Sensitive detection and
417 schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of
418 kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas's disease.
419 Mol. Biochem. Parasitol. 33, 205-214.

420 Sundar, S. e Rai, M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin.
421 Diag. Lab. Immunol., 9:5, 951-958.

422 Troncarelli, M.Z.; Machado, J.G.; Camargo, L.B.; Hoffmann, J.L.; Camossi, L.;
423 Greca, H.; Faccioli, P.Y.; Langoni, H. 2008. Associação entre resultados
424 sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela
425 técnica de imunofluorescência indireta. Vet. Zoot., 15:1, 40-47.

TABELA 1 – Distribuição dos resultados obtidos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e/ou anti-*Trypanosoma cruzi* em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, Brasil, 2008.

Diagnóstico	**Freqüência absoluta**	**Percentual relativo**
(-) *Leishmania* spp. e (-) *T. cruzi*	120	60,0%
(+) *Leishmania* spp. e (-) *T. cruzi*	32	16,0%
(-) *Leishmania* spp. e (+) *T. cruzi*	15	7,5%
(+) *Leishmania* spp. e (+) *T. cruzi*	**33**	**16,5%**
Total	**200**	**100,0%**

(+) positivo para presença de anticorpos contra o parasito

(-) negativo para presença de anticorpos contra o parasito

TABELA 2 – Distribuição comparativa entre os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e/ou anti-*Trypanosoma cruzi* detectados pela RIFI em amostras de soros de 100 cães de Bauru-SP e 100 cães de Botucatu-SP. Botucatu-SP, Brasil, 2008.

Títulos	Freqüência absoluta	Percentual relativo*	Percentual relativo**
Leishmania* spp. > *T.cruzi	**22**	**66,7%**	**11%**
Leishmania spp. < *T.cruzi*	4	12,1%	0,2%
Leishmania spp. = *T.cruzi*	7	21,2%	0,3%
Total	33	100,0%	16,5%

>-maior; <-menor; =-igual
*Percentual relativo ao total de reações cruzadas.
**Percentual relativo ao total de 200 amostras de soros testadas (de 100 cães de Bauru-SP e de 100 cães de Botucatu-SP).

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

http://www.elsevier.com

VETERINARY PARASITOLOGY
An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP)), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

Guide for Authors
Veterinary Parasitology
Types of contributions
1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.
Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.
Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.
Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.
Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.
Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.
Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited

reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr F.H.M. Borgsteede
Animal Sciences Group, Wageningen UR
Division Infectious Diseases
Laboratory of Parasitic Diseases
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands

Submission of manuscripts
Submission to Veterinary Parasitology now proceeds online via Elsevier Editorial System - http://ees.elsevier.com/vetpar. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.
Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.
Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.
Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.
Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.
All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.
Acknowledgements
All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who

provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest
At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source
All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics
Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL:
http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology.

Preparation of manuscripts
1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance before they submit their article or before it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that The Lucidus Consultancy edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to Veterinary Parasitology who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions http://www.elsevier.com/termsandconditions.
2. Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.
3. Manuscripts in general should be organized in the following order:
Title (should be clear, descriptive and not too long)
Name(s) of author(s)
Complete postal address(es) of affiliations
Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author
Present address(es) of author(s) if applicable
Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
Abstract
Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).
Introduction
Material studied, area descriptions, methods, techniques
Results
Discussion
Conclusion
Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.
References
Tables
Figure captions
Tables (separate file(s))
Figures (separate file(s)).
4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.
5. SI units should be used.
6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.
Abstracts
The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.
Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition

usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: http://www.elsevier.com/artworkinstructions
Preparation of supplementary data
Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit http://www.elsevier.com/artworkinstructions.
References
1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
a. For periodicals
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Vet. Parasitol. 49, 123–158.
b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), Doramectin – a novel avermectin. Vet. Parasitol. 49, 45–50.

c. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. Applied Veterinary Epidemiology. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), Immunofluorescence and Related Staining Techniques. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is Vet. Parasitol.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+}, not as Ca^{++}.

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O.

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long

name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P2O5).
Footnotes
1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.
Nomenclature
1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of theInternational Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in Veterinary Parasitology (Kassai, T. et al., 1988. Vet. Parasitol. 29, 299–326).

Copyright
If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone or ,
fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage http://www.elsevier.com/permissions.
Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.
Authors Rights
As an author you (or your employer or institution) may do the following:
• make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
• make copies and distribute such copies (including through e-mail) of

the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
• post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
• post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
• present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
• for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
• retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
• include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
• use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
• prepare other derivative works, to extend the article into booklength form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit http://www.elsevier.com/fundingbodies).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a

printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: , Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage http://www.elsevier.com/locate/vetpar

For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

1. The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (100 for Review Articles). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.
2. Additional paper offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.
3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra paper offprints.

Veterinary Parasitology has no page charges

© Copyright 2007 Elsevier | http://www.elsevier.com