

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**HEMOCULTURA, REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA  
INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE  
(PCR) PARA *Leishmania* spp. EM CÃES E GATOS  
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA E NÃO ENDÊMICA  
PARA LEISHMANIOSE**

**AUDREY RENNÓ CAMPOS BRAGA**

Botucatu-SP

JUNHO/2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**HEMOCULTURA, REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA  
INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE  
(PCR) PARA *Leishmania* spp. EM CÃES E GATOS  
PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA E NÃO ENDÊMICA  
PARA LEISHMANIOSE**

**AUDREY RENNÓ CAMPOS BRAGA**

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

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Simone Baldini Lucheis

**Co-orientador:** Prof. Titular Hélio Langoni

Botucatu-SP

JUNHO/2009

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*

Braga, Audrey Rennó Campos.

Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para Leishmaniose / Audrey Rennó Campos Braga. – Botucatu: [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientadora: Simone Baldini Lucheis

Assunto CAPES: 50501062

1. Cão - Doenças - Diagnóstico 2. Gato - Doenças - Diagnóstico  
3. Leishmaniose visceral canina

CDD 636.70896

Palavras-chave: Cão; Diagnóstico; Gato; *Leishmania* spp.

Nome do autor: Audrey Rennó Campos Braga

Título: HEMOCULTURA, REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA *Leishmania* spp. EM CÃES E GATOS PROVENIENTES DE ÁREA ENDÊMICA E NÃO ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

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

Profª Dra Ana Luíza Alves Rosa Osório  
Membro Titular  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Titular Paulo Eduardo Martins Ribolla  
Membro Titular  
Departamento de Parasitologia  
IB – UNESP – Botucatu

---

Profª Adj. Caris Maroni Nunes  
Membro Suplente  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal  
FOA – Curso de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba

Prof. Adj. Antônio Carlos Paes  
Membro suplente  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 26 de junho de 2009.

*“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver”.*

*Gabriel García Marquez*

*Dedico este trabalho aos meus pais Marcelo e Maria da Graça, que  
são o meu alicerce, a grande razão da minha vida...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, presente em todos os momentos concedendo, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. “Tudo é do Pai, toda honra e toda glória. É dele a vitória alcançada em minha vida...”

Aos meus pais Marcelo e Maria da Graça que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperanças. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para, muitas vezes, realizar os meus. A vocês, meus pais, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês incondicionalmente!

À minha irmã Pollyana, que mesmo distante, mantemo-nos unidas. Os caminhos são diferentes, mas quando precisamos ali estamos nós. Em qualquer situação, acolhendo uma a outra, semeando o amor de Deus, e o amor de nossos pais. Você sabe que pode contar sempre comigo e sei que posso esperar o mesmo de você. Amo-te muito minha irmã... Ao meu cunhado Vítor por ser meu amigo me incentivando e aconselhando sempre.

À toda minha família, especialmente minha tia Valéria, a minha segunda mãe. Por todos os momentos bons ou ruins que se fazia presente mesmo com a distância me apoiando sempre. Meu amor pela senhora é enorme.

Ao meu namorado Raphael, que esteve ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri nas horas que me lamentei e nas horas e que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria por estar ao seu lado. Agradecer pelo sorriso, sem mágoas nem rancores. Agradeço pelos meus dias de mau humor, que você me acalmou. Hoje quero parar e agradecer, porque você fez, faz e fará sempre parte de minha história! Você é sempre maravilhoso.

Aos meus animaizinhos, fontes de puro amor. Aos anjinhos de luz Paty, Xuxa, Peteca, Garfield e Penélope que passaram por minha vida e deixaram muitas saudades. E aos queridos Billy, Kate, Nicholas, Nicole, Nicolau e a

minha mais recente fonte de alegria, Nininha, minha companheira inseparável. Amo vocês, obrigada pela alegria constante e carinho gratuitos.

À todos os meus amigos que de perto ou de longe sempre estiveram guardados em meu coração, especialmente ao Tamer e o “clã das lagartixas” composto pelas “meninas” Thaíse, Melissa, Aline, Reni e Loricarla. Saudades sempre, especialmente dos dias de CQ.

Aos meus queridos amigos Ana Paula, Betina, Cátia, Nair e Thiaguinho. É muito bom saber que tenho amigos em quem posso confiar. Pessoas que me apóiam e me acolhem com tanto carinho. Vocês estão sempre comigo mesmo à distância, dando-me palavras de conforto e ânimo. Sou grata a Deus por ter conhecido pessoas como vocês. Quero agradecê-los por tudo. Não tenho nada que possa recompensar ter amizades tão lindas assim. Apenas digo obrigada.

A Marcela (Bernenta) pela amizade sincera e pelas gargalhadas nos momentos em que tudo parecia estar perdido. E as minhas amigas da pensão da Dona Zulmira, Juliana, Flávia, Sabrina e Tati pela alegre convivência.

À Ana Paula, Marcella e Rodrigo pela preciosa colaboração no decorrer do meu projeto de mestrado. O apoio de vocês foi fundamental! E ao Thiaguinho pela ajuda na finalização da dissertação, sempre disposto e com muito bom humor. Sem vocês esse sonho não estaria sendo possível...Obrigada de coração.

À minha orientadora Simone Baldini Lucheis, pela oportunidade concedida e compreensão devido a minha ausência física no fim do mestrado.

Ao Prof. Hélio Langoni, meu co-orientador pela inteligência e brilhantismo, dignos de uma pessoa excepcional, transmitidos através de seus ensinamentos. Agradeço também pela colaboração na confecção do meu trabalho disponibilizando diversos materiais essenciais para sua execução.

A todos os professores que passaram por minha vida desde a minha faculdade (UFMS) até o curso de pós-graduação da UNESP - Botucatu, mediando o conhecimento, abrindo portas, mostrando caminhos.

Ao professor Antônio Carlos Paes pelo carinho, preocupação e incentivo. Por ter me aceitado como sua orientada e compreendido minha escolha pela área de Zoonoses. Pessoa venerada por sua sabedoria!

A todos os colegas de pós-graduação, residentes e funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, especialmente Lucilene, Haroldo, Leila, Felipe, Deolinda, Juliana, Janaína, Bolsanello, Gustavo, Simone e Benedito pela colaboração em meu projeto, pelos momentos de aprendizagem, amizade e por proporcionarem um excelente convívio no ambiente de trabalho. E a todos os colegas de pós-graduação das outras áreas, especialmente Luciano Fonseca, Ana Paula Masseno, Camila, Vitória, Veridiana e Marly.

À equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande – MS, especialmente às médicas veterinárias Lara, Júlia, Juliana, Cida, Beth e aos funcionários que de forma extremamente carinhosa me acolheram e se disponibilizaram a ajudar na coleta de material dos animais do estudo, à equipe do Canil Municipal de Botucatu - SP, em especial o médico veterinário Paulo Peguinelli e a Associação de Proteção aos Animais (APA) também pelo apoio na colheita das amostras.

Às professoras Ana Luiza Alves Rosa Osório e Cássia Rejane Brito Leal pela disponibilização do laboratório em minha querida faculdade (UFMS) na cidade de Campo Grande - MS para que as hemoculturas pudessem ser processadas antes de levá-las à Botucatu – SP e pela constante ajuda no período em que lá permaneci.

Aos cães e gatos utilizados neste estudo, a maioria tendo suas vidas interrompidas. Tenho certeza que nasci com um dom, e ainda vou realizar o meu grande sonho de salvar muitos animais inocentes, proporcionando-lhes carinho, amor e, sobretudo respeito. Nunca desistirei!

Aos meus novos amigos de Uberaba Daniela, Débora e Marco Túlio companheiros não apenas no trabalho em minha nova fase de vida, mas também presentes sempre. Obrigada pelo apoio e amizade nos momentos difíceis amenizando a saudade das pessoas que amo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter concedido auxílio a pesquisa (Processo FAPESP 2007/56395-2) essencial para obtenção de material necessário na execução do projeto.

A todos que se fizeram presentes e me ajudaram de alguma forma, porém não citados nestes agradecimentos, o meu muito obrigada.

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>QUADRO 1</b>	Sequência de oligonucleotídeos para o gênero <i>Leishmania</i> spp. e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados (IKONOMOPOULOS et al, 2003).....	37
<b>TABELA 1</b>	Estimativa do percentual de animais com diagnóstico positivo para <i>Leishmania</i> spp. pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo local e espécie. Botucatu – SP, 2009.....	41
<b>TABELA 2</b>	Soroprevalência de 50 cães do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS) para <i>Leishmania</i> spp. pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Botucatu-SP, 2009.....	41
<b>TABELA 3</b>	Soroprevalência de 50 gatos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande (MS) para <i>Leishmania</i> spp. pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Botucatu-SP, 2009.....	42
<b>TABELA 4</b>	Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos para <i>Leishmania</i> spp., em amostras de soros de 50 cães procedentes de Campo Grande (MS), segundo resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Botucatu, SP, 2009.....	42
<b>TABELA 5</b>	Resultados das Hemoculturas de 50 cães procedentes de Campo Grande (MS), segundo resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Botucatu, SP, 2009.....	42
<b>TABELA 6</b>	Distribuição dos 50 cães e 50 gatos por região do município de Campo Grande (MS). Botucatu, 2009.....	43
<b>TABELA 7</b>	Distribuição dos 50 cães e 50 gatos por região do município de Botucatu (SP). Botucatu, 2009.....	43
<b>TABELA 8</b>	Estimativa da distribuição das lesões segundo diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em 50 cães do Canil Municipal de Botucatu (SP). Botucatu – SP, 2009.....	44

<b>TABELA 9</b>	Resultados positivos pela técnica de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), para o diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp. em 50 cães do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), classificados segundo sintomatologia. Botucatu-SP, 2009.....	46
<b>TABELA 10</b>	Estimativa da distribuição dos sinais clínicos segundo diagnóstico par <i>Leishmania</i> spp. pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em 50 cães de Campo Grande (MS). Botucatu – SP, 2009.....	51
<b>TABELA 11</b>	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo, acurácia e coeficiente Kappa pela técnica de hemocultura em amostras de 50 cães e 50 gatos do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu – SP, 2009.....	54
<b>TABELA 12</b>	Investigação epidemiológica para <i>Leishmania</i> spp. em gatos domésticos por métodos parasitológicos em diferentes países de 1912 a 2000* .....	55
<b>TABELA 13</b>	Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo, acurácia e coeficiente Kappa pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de 50 cães e 50 gatos do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu – SP, 2009.....	57
<b>TABELA 14</b>	Relatos de caso e porcentagens de soroprevalência da leishmaniose felina (LF) em diferentes países de 1940 a 2008.....	62
<b>Apêndice 1</b>	Número de identificação dos 50 cães de Botucatu (SP), sexo, sinais clínicos, procedência e resultados das técnicas de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp.....	93
<b>Apêndice 2</b>	Número de identificação dos 50 gatos de Botucatu (SP), sexo, sinais clínicos, procedência e resultados das técnicas de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp. ....	95

<b>Apêndice 3</b>	Número de identificação dos 50 cães de Campo Grande (MS), sexo, sinais clínicos, procedência e resultados das técnicas de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp.....	97
<b>Apêndice 4</b>	Número de identificação dos 50 gatos de Campo Grande (MS), sexo, sinais clínicos, procedência e resultados das técnicas de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp.....	99

## LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Localização do município de Campo Grande no estado de Mato Grosso do Sul (Fonte: <a href="http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo_Grande">http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo_Grande</a> ).....	29
<b>FIGURA 2</b>	Localização do município de Botucatu no estado de São Paulo (Fonte: <a href="http://pt.wikipedia.org/wiki/Botucatu">http://pt.wikipedia.org/wiki/Botucatu</a> ).....	30
<b>FIGURA 3</b>	Capela de fluxo laminar utilizada sob luz ultravioleta (UV) utilizada para manipulação das amostras de sangue coletadas e preparação das hemoculturas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT).....	32
<b>FIGURA 4</b>	Tubo estéril utilizado nas hemoculturas.....	32
<b>FIGURA 5</b>	Identificação individual dos tubos de hemoculturas.....	33
<b>FIGURA 6</b>	Transferência da porção plasmática do sangue para um tubo contendo meio de cultura Liver Infusion Tryptose (LIT).....	33
<b>FIGURA 7</b>	Hemoculturas prontas para serem armazenadas em estufa com temperatura de 28° a 30° C.....	33
<b>FIGURA 8</b>	Cão apresentando úlcera e onicogribose. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande.....	47
<b>FIGURA 9</b>	Cão apresentando alopecia e emagrecimento severo. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.....	48
<b>FIGURA 10</b>	Cão apresentando alterações oculares e alterações dermatológicas no focinho e ponta de orelha. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.....	48
<b>FIGURA 11</b>	Cão com linfadenomegalia (linfonodo poplíteo). Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.....	49

<b>FIGURA 12</b>	Cão apresentando secreção nasal purulenta. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.....	49
<b>FIGURAS 13/14</b>	Dois gatos apresentando alterações dermatológicas na região da cabeça. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.....	52
<b>FIGURA 15</b>	Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de <i>Leishmania</i> spp., pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir das hemoculturas de cães do município de Campo Grande (MS). Amostras amplificadas utilizando-se os iniciadores LIN 19 e LIN R4. Gel de agarose 2%.....	60
<b>ANEXO 6</b>	Mapa do município de Campo Grande (MS) dividido por regiões.....	90
<b>ANEXO 7</b>	Mapa do município de Botucatu (SP) dividido por setores.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% por cento

Ac – acurácia

APA – Associação de Proteção aos Animais

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

CEEA – Câmara de Ética em Experimentação Animal

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAses – enzimas degradadoras de DNA

dNTPs – desoxinucleotídeos-trifosfatos

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

et al. – e colaboradores

FIV - Feline Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Felina)

FelV - Feline Leukemia Virus (Vírus da Leucemia Felina)

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HIV - Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

*L.* - *Leishmania* (gênero)

LF – Leishmaniose Felina

LIT - Liver Infusion Tryptose

*Lu.* - *Lutzomia*

LV - Leishmaniose Visceral

LVC –Leishmaniose Visceral Canina

LT – Leishmaniose Tegumentar

(L.) – *Leishmania* (subespécie)

M – Molar

mg% - miligrama por cento

MIX-PCR - mistura de reagentes para PCR

mL – mililitro

µL – microlitro

mm – milímetro

mmol – milimol

NNN – Novy – MacNeal – Nicolle

NUPEZO – Núcleo de Pesquisa em Zoonoses

°C – graus Celsius

pb – pares de bases

PBS – Phosphate buffer saline (solução salina tamponada)

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

pH – unidade de acidez/alcalinidade

PM – peso molecular

pmol – picomol

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RPM – rotações por minuto

SMF - Sistema Monocítico Fagocitário

spp. – gênero

SUCEN - Superintendência para o Controle de Endemias

Taq – *Termus aquaticus*

TBE – Tampão tris Borato – EDTA

TNE – Tris NaCl EDTA

TRIS – Tris (hidroxil)-amino – metano

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UV – ultravioleta

Vpn – valor preditivo negativo

Vpp – Valor preditivo positivo

(V.) – *Viannia* (subespécie)

X - vezes

## SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
1 INTRODUÇÃO.....	04
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	07
2.1 As leishmanioses.....	07
2.2 Epidemiologia.....	08
2.3 Sinais clínicos.....	10
2.4 Diagnóstico.....	11
2.5 Controle.....	14
2.6 Leishmaniose felina.....	15
2.7 Importância da Leishmaniose no município de Campo Grande (MS).....	22
2.8 Importância da Leishmaniose no município de Botucatu (SP).....	24
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Autorização para realização do estudo.....	28
4.2 Município de Campo Grande - MS (área endêmica).....	28
4.3 Município de Botucatu - SP (área não-endêmica).....	29
4.4 Locais de execução dos procedimentos laboratoriais.....	30
4.5 Colheita de sangue.....	31
4.6 Hemocultura.....	31
4.7 Leitura das hemoculturas.....	34

4.8 Preparo das Amostras de sangue em meio LIT para extração do DNA de <i>Leishmania</i> spp. ....	34
4.9 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania</i> spp.....	34
4.9.1 Preparo do antígeno e lâminas de Imunofluorescência.....	34
4.9.2 Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	35
4.10 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp. ....	36
4.10.1 Limiar de Detecção da PCR.....	37
4.11 Metodologia de Análise Estatística.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Resultados Gerais.....	40
5.2 Distribuição dos cães e gatos nos municípios de Botucatu (SP) e Campo Grande(MS).....	43
5.3 Sinais Clínicos.....	44
5.4 Hemocultura.....	53
5.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	56
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
Anexos.....	83
Apêndices.....	93

## RESUMO

BRAGA, A.R.C. **Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para leishmaniose.** Botucatu, 2009, 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A leishmaniose é uma zoonose, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por vetores flebotomíneos. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para esta doença, através da associação de três técnicas diagnósticas: hemocultura em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. Foram coletadas aleatoriamente 50 amostras de sangue de cães e 50 amostras de sangue de gatos, procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande - MS, onde a leishmaniose visceral canina (LVC) é endêmica, e aleatoriamente de 50 cães e 50 gatos do Canil Municipal e Associação de Proteção aos Animais (APA) de Botucatu - SP, considerada, até o momento, área não endêmica, silenciosa para esta enfermidade. Das 50 hemoculturas de cães procedentes de Botucatu, três (6%) foram positivas e das 50 hemoculturas dos gatos, duas (4%) foram positivas. Em Campo Grande, 29 hemoculturas (58%) de cães foram positivas e as dos gatos apresentaram 100% de negatividade. Quanto à PCR, 100% das amostras de cães e de gatos procedentes de Botucatu, assim como as dos gatos de Campo Grande foram negativas. Das 50 amostras de cães deste município, 36 foram positivas (72%) à PCR. À RIFI obteve-se 100% de negatividade nas amostras dos cães e gatos de Botucatu e 32 cães (64%) e 15 gatos (30%) de Campo Grande foram reagentes. Pelos resultados apresentados, podemos concluir que a contínua vigilância epidemiológica é importante em áreas não endêmicas para leishmaniose, bem como a busca de um diagnóstico seguro em áreas endêmicas, além de maiores estudos sobre o papel dos felinos no ciclo epidemiológico da doença.

**Palavras-chave:** Cão; Diagnóstico; Gato; *Leishmania* spp.

## **ABSTRACT**

**BRAGA, A.R.C. Hemoculture, Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Leishmania* spp. in dogs and cats from endemic and non-endemic areas for leishmaniosis.** Botucatu, 2009, 100p. Dissertation (Master) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus of Botucatu, São Paulo State University.

Leishmaniosis is a zoonosis caused by protozoans of *Leishmania* genus and is transmitted by phlebotomine vectors. This study was aimed to evaluate the occurrence of *Leishmania* spp. in dogs and cats from endemic and non-endemic areas by three diagnostic tests: hemoculture in LIT (Liver Infusion Tryptose) media, Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Fifty blood samples of dogs and fifty of cats from Zoonosis Control Center from Campo Grande, MS, an endemic area for canine visceral leishmaniasis (CVL), were collected randomly, as well as blood samples of dogs and cats from Municipal Kennel and Animal Protection Association (APA) from Botucatu, SP, considered by the moment as free-transmission, non-endemic area for the disease. From 50 hemocultures of the dogs from Botucatu, three (6%) were positive and of the blood of 50 cats, two (4%) were positive. In Campo Grande, 29 hemocultures (58%) were positive for dogs and 100% of the cats were negative for this test. For the PCR detection of *Leishmania* spp., 100% of the samples from dogs and cats from Botucatu and all the cats from Campo Grande were negative. On the other hand, 36 dogs from Campo Grande were positive (72%) for the PCR. From Botucatu, by the IFAT, 100% of the dogs and cats were non reagent and 32 dogs (64%) and 15 cats (30%) from Campo Grande (MS) were positive for this test. The presented results show that a continuous epidemiological vigilance is important in non-endemic areas for leishmaniasis, as well as the research for an accurate diagnosis in endemic areas, and other studies based on the role of felines in epidemiological life cycle of this disease

**Keywords:** Dog; Diagnosis; Cat; *Leishmania* spp.

## *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas primariamente como zoonoses, podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, caracterizando-se como antropozoonose. Em geral, apresentam clinicamente um caráter multifacetado e afetam o homem, além de várias espécies de animais silvestres e domésticos, em diferentes regiões do globo terrestre.

Degradações ambientais e escassez de políticas sociais, associadas às migrações de populações rurais carentes para as periferias urbanas de forma desordenada e sem estrutura sanitária e a presença de reservatórios no local, teriam proporcionado à urbanização da LVC (Leishmaniose Visceral Canina) em áreas metropolitanas. Isto ocorre, pois o cão vive em contato estreito com humanos e atraem a presença do vetor, o que faz destes animais uma importante fonte de infecção e principal reservatório, sendo, portanto um dos alvos nas estratégias de controle. Nos últimos anos, além da pesquisa em cães, no homem e em outros reservatórios, o gato doméstico também tem recebido atenção.

As medidas de controle da leishmaniose visceral (LV) envolvem fundamentalmente o tratamento de casos humanos, borrifação de casas e peridomicílios com inseticidas de ação residual e identificação e eliminação de cães sorologicamente positivos. No entanto, a maior dificuldade encontrada relaciona-se com o diagnóstico da LVC, já que os métodos utilizados para o seu controle são baseados na pesquisa de anticorpos, e estes apresentam limitações. Desta maneira, a identificação dos cães infectados é um ponto chave para interromper a cadeia epidemiológica da doença nos centros urbanos.

A detecção de anticorpos circulantes para *Leishmania* spp. vem sendo utilizada em estudo soropidemiológicos, constituindo-se em ferramenta importante no diagnóstico da LV. As técnicas mais utilizadas e recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são a Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), sendo a primeira de eleição por apresentar vantagens, como fácil execução, rapidez,

baixo custo e sensibilidade e especificidade adequadas quando comparada a outros métodos (DANTAS-TORRES et al., 2006; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

Exames parasitológicos baseados na demonstração das formas amastigotas do parasito, tanto dentro dos macrófagos como na forma livre, permitindo o diagnóstico definitivo da infecção, podem ser facilmente realizados, sendo os procedimentos corados por Giemsa ou Leishman (SUNDAR e RAI, 2002; SIMÕES-MATTOS; 2005, GREENE, 2006). O isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. por meios de cultura a partir de diversos tecidos, como o sangue no caso das hemoculturas, apesar de trabalhoso também é uma técnica possível.

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta em pesquisas epidemiológicas, bem como para identificação de espécies de *Leishmania* spp., por amplificação seletiva de sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados, e também no vetor (GREENE, 2006; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

Para uma melhor acuidade diagnóstica da LV faz-se necessário o uso de uma combinação de técnicas, uma vez que não está disponível um método que isoladamente reúna todas as características consideráveis desejáveis para o diagnóstico, tais como: fácil execução, custo acessível, rapidez e especialmente sensibilidade e especificidade altas. Recomendase que o diagnóstico desta doença seja realizado baseandose na sintomatologia clínica, nas características epidemiológicas da região e nos exames laboratoriais, desta forma contribuindo para o destino correto dos animais verdadeiramente positivos. Isto é importante tanto para os aspectos de saúde pública quanto aos de ética, pois contribuirá para diminuição da eutanásia desnecessária de cães erroneamente considerados infectados.

*REVISÃO DE LITERATURA*

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. São zoonoses, que em geral, apresentam clinicamente um caráter multifacetado e afetam o homem, além de várias espécies de animais silvestres e domésticos, em diferentes regiões do globo terrestre (FEITOSA, 2006). Sua ocorrência é sempre maior em áreas tropicais e subtropicais, pois favorecem a manutenção dos seus vetores, como leste e sudeste da Ásia, Oriente Médio, norte e leste da África, sul da Europa (Mediterrâneo) e Américas Central e do Sul (BRASIL, 2006).

Há diferentes agentes transmissores dependendo da espécie de *Leishmania* e região geográfica. O vetor de *L. (L.) infantum* é representado por dípteros, da família *Psycodidae*, sub família *Phlebotominae*, dos quais a *Lutzomia longipalpis* é o principal e mais importante na transmissão da leishmaniose visceral, no Novo Mundo. Os insetos dessa família são pequenos e têm como características a coloração amarelada ou de cor palha e, em posição de repouso. Suas asas permanecem eetas e semiabertas e, devido a essas características, são também conhecidos como mosquito-palha e asa dura, podendo ser chamados em algumas regiões de birigui, cangalhinha, entre outros. A atividade desses vetores é crepuscular e noturna, sendo que, no inta e peridomicílio, a *Lu. longipalpis* é encontrada, principalmente, próximas a uma fonte de alimento (BRASIL, 2006). A abundância desses insetos está relacionada com fatores ambientais, como a precipitação pluviométrica e pode aumentar quando as temperaturas estão elevadas.

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos por formas amastigotas de *Leishmania* spp. e, após oito a vinte dias de repasto sanguíneo, estas evoluem para formas promastigotas no tubo digestivo dos insetos, tornando-se infectantes (BRASIL, 2006). Nos hospedeiros vertebrados, as

formas promastigotas de *Leishmania* spp. têm entrada ativa nas células do sistema monocítico fagocitário (SMF), onde assumem a forma amastigota. Por divisão binária, multiplicam-se obrigatoriamente dentro destas células até os macrófagos se romperem, liberando parasitos para o espaço extracelular.

No Brasil, os reservatórios da doença ainda não estão bem definidos. Vários animais silvestres, como raposãs das espécies *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous* e marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* têm sido encontrados naturalmente infectados pela *L. chagasi* (REIS, 2001). Entretanto, o principal reservatório da LV no país é o cão doméstico (*Canis familiaris*), sendo um dos alvos das estratégias de controle, pois possui grande importância na transmissão da doença, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentarse infectado em quase todos os focos brasileiros de leishmaniose visceral (çalazar) humano (MACHADO, 2004). Condições sócio-ambientais, como o desmatamento, reduziram a disponibilidade de animais que serviam como fontes de alimentação para o inseto transmissor, colocando o homem e o cão como fontes alternativas acessíveis (BRASIL, 2006). Vários debates entre profissionais da saúde no Brasil ligados ou não a prevenção de leishmanioses, têm sido focados especialmente na hipótese de que outros animais poderiam estar atuando como reservatórios, sendo o gato doméstico (*Felis catus*) um dos objetos de discussão (SILVA et al., 2004; SIMÕES-MATOS, et al. 2004).

## **2.2 EPIDEMIOLOGIA**

No Brasil, as formas canina e humana da leishmaniose visceral (LV) ocorrem endemicamente em vários Estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e em todos os Estados há associação entre cães infectados e presença do vetor (MILES et al., 1999). Os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe,

São Paulo e Tocantins possuem casos notificados (MISSAWA e LIMA, 2006). Em 2003, os Estados que apresentaram maiores taxas de incidência foram Tocantins, Piauí, Maranhão, Mato Grosso do Sul e Roraima (BRASIL, 2003). Municípios como Araçatuba (SP) (FEITOSA et al., 2000), Teresina (PI) (ANDRADE FILHO, SILVA e FALCÃO, 2001), Belo Horizonte (MARGONARI et al., 2006; RESENDE et al., 2006) e Porteirinha (MG) (BARATA et al., 2004), Palmas (TO), Três Lagoas e Campo Grande (MS), têm enfrentado epidemias (BRASIL, 2006).

O baixo padrão de vida da população, a maior densidade dos flebotomíneos e a presença de cães infectados são fatores predisponentes para implantação desta zoonose (ALENCAR, 1983; BADARÓ et al., 1986; NASCIMENTO, 1996).

A LV tem como agente etiológico as leishmanias do complexo *donovani*, que compreende a *Leishmania (Leishmania) donovani*, na Ásia e África, *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas (FEITOSA, 2006). Já a leishmaniose tegumentar (LT) é causada pela *Leishmania tropica* ou *Leishmania major* e a leishmaniose mucocutânea pela *Leishmania (mexicana) mexicana*, *Leishmania (brasiliensis) brasiliensis* ou pela *Leishmania (brasiliensis) peruviana* (BRASIL, 2006).

A LV teve seu primeiro relato no Brasil em 1934, sendo que o primeiro surto da doença ocorreu 20 anos depois em Sobral, no estado do Ceará. A partir dos anos 80, constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica, tendo em vista que a doença, outrora restrita a áreas rurais do Nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes, alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos e, a partir da década de 90, os estados do Pará, Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste). Estes Estados passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil.

Acredita-se que degradações ambientais e escassez de políticas sociais, associadas às migrações de populações rurais carentes para as periferias urbanas de forma desordenada e sem estrutura sanitária, a

presença de reservatórios no local e a adaptação do vetor aos ambientes urbanos, teriam proporcionado à urbanização da LV em áreas metropolitanas (REIS, 2001). Com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo no número de casos, a LV passou a ser considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das prioridades dentre as doenças tropicais (GONTIJO e MELO, 2004).

Indicadores epidemiológicos têm demonstrado que o controle da LVC ainda não foi atingido (BRASIL, 2006). Os métodos adotados pelas políticas públicas não têm surtido o efeito desejado. Desta forma, estudos visando obter métodos diagnósticos que possam facilitar a realização de inquéritos epidemiológicos tornam-se úteis no momento de adquirir o conhecimento da distribuição geográfica da LV no país (REIS, 2001).

### **2.3 SINAIS CLÍNICOS**

As manifestações clínicas da LV no cão e no homem são similares e apresentam como sinais mais comuns, febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final. No homem, as causas de óbitos mais comuns são associadas a broncopneumonias, gastroenterites, septicemias e sangramentos graves, tais como: hemorragia digestiva alta ou baixa, insuficiência cardíaca devido a anemia grave, contribuindo para o aumento da mortalidade (BRASIL, 2006). De acordo com apresentação clínica, os cães podem ser agrupados como: oligossintomáticos, com até três sintomas clínicos, sintomáticos, com mais de três sintomas clínicos e os assintomáticos, que não apresentam sintomas (MANCIANTI et al., 1988).

As alterações dermatológicas são bastante freqüentes em cães com LV e podem ocorrer na ausência de outros sintomas, representadas por excessiva descamação da epiderme, podendo ser localizada na região periocular e na borda dos pavilhões auriculares, ou difusa por todo corpo, pelame seco, queda de pêlos e áreas de alopecia, sendo que alguns possuem despigmentação cutânea e áreas de hiperqueratose e lignificação, principalmente em locais correspondentes a saliências ósseas. Outros

sinais incluem linfadenomegalia, onicogrifose, lesões oculares, emese, diarreia, melena, pneumonia, epistaxe, comprometimento do sistema urinário, alterações hepáticas e neurológicas (em menor frequência), apatia, intolerância a exercícios, poliúria, polidipsia, poliartrite, polimiosite e lesões osteolíticas. Infecções associadas com *Ehrlichia*, *Babesia* e *Dirofilaria* são muito comuns (FEITOSA, 2006).

De uma maneira geral o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. A problemática deve-se principalmente a três fatores: variedade de sintomas clínicos e semelhança com aqueles observados em outras doenças infecciosas; alterações histopatológicas inespecíficas, e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (BRASIL, 2006).

## **2.4 DIAGNÓSTICO**

A detecção de anticorpos para *Leishmania* spp. constitui um instrumento essencial no diagnóstico da LVC, sendo os recomendados para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários pelo Ministério da Saúde o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) como triagem diagnóstica e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) como confirmatório dos cães sororreagentes. Os animais sintomáticos ou não, devem ser eutanasiados (BRASIL, 2006). A RIFI confere sensibilidade de 90% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soros (HARITH et al., 1987). A especificidade deste teste é prejudicada pela presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o da doença de Chagas e os da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (ALVES;BEVILACQUA, 2004). É um teste de fácil execução, fornece diagnóstico rápido e de baixo custo, porém um resultado positivo neste método nem sempre pode ser conclusivo de doença ativa, assim como cães infectados podem apresentar-se soronegativos, além disso, podem ocorrer reações cruzadas com outros microorganismos, produzindo assim

resultados falso-positivos (LUVIZOTTO, 2003; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

Em regiões endêmicas o exame parasitológico é considerado diagnóstico de certeza. Classicamente, o diagnóstico da doença é o parasitológico direto que é feito a partir da demonstração das formas amastigotas, os quais constituem-se em estruturas arredondadas ou ovais, com dois a três micrômeros de diâmetro, encontradas no interior de monócitos e macrófagos, ou no meio extracelular em aspirados de linfonodos, medula óssea, baço e fígado, sendo os dois primeiros mais utilizados devido à facilidade de obtenção de material, pois exames citológicos esplênicos e hepáticos são mais trabalhosos e o risco de hemorragia é elevado (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006). Em colorações preparadas com Giemsa ou Leishman, o citoplasma do parasito apresenta-se em tom azul pálido com núcleo corado em vermelho, sendo que no mesmo plano do núcleo, há uma estrutura profundamente avermelhada ou violácea em forma de bastonete, chamada cinetoplasto (SUNDAR e RAI, 2002). A especificidade do método é de aproximadamente 100% e a sensibilidade do teste depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico coletado e do número de campos observados durante a leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos (BRASIL, 2006).

O diagnóstico também pode ser estabelecido pela detecção do parasito por cultivo em meios de cultura específicos, sendo que nestes as formas amastigotas inoculadas transformam-se em formas promastigotas. O meio clássico é NNN (Novy, Mc Neal e Nicolle), porém existem outros que podem ser empregados, junto ao primeiro ou isoladamente, como o LIT (Liver Infusion Tryptose) ou de Schneider que aumentam e aceleram a positividade da cultura (BRASIL, 2006). Esse método diagnóstico possui baixa sensibilidade, especialmente nos estágios iniciais da doença, quando a carga parasitária é pequena, e embora seja muito útil para o isolamento do parasito, não é utilizado na rotina (IKEDA-GARCIA e FEITOSA, 2006).

A hemocultura é um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasita na corrente sangüínea, o qual é visualizado ao

microscópio óptico. Esta é uma diferença importante em relação à prova molecular, a PCR, a qual tem capacidade de detectar DNA do parasita, não necessitando estar presente inteiro na circulação (LUCHEIS et al., 2005).

Quando se identifica uma hemocultura positiva, é desejável obter uma lâmina corada, entretanto, isto se torna difícil, devido à necessidade da presença de parasitas em quantidade suficiente para sua visualização. Sua sensibilidade aumenta quando o volume e o número de amostras forem maiores, o tempo entre a coleta e o processamento menor e quando se utiliza o meio LIT para cultivo (PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Tanto as leishmanias como outros cinetoplastídeos, possuem uma complexa rede de moléculas de DNA circular dentro de uma única mitocôndria. O DNA mitocondrial do parasito representa aproximadamente 20% do DNA total celular e está organizado em rede discóide, onde milhares de minicírculos e maxicírculos interligados constituem 95% de sua estrutura. Cada minicírculo completo possui de 700 a 800 pares de bases, sendo que 200 pares correspondem a uma região conservada (DEGRAVE et al., 1994). O desenvolvimento da PCR proporcionou grande avanço nas técnicas de biologia molecular relacionadas ao diagnóstico da leishmaniose. Iniciadores designados para amplificar seqüências encontradas em minicírculos de kDNA de leishmanias de diferentes espécies foram testados em vários tecidos, demonstrando ser uma técnica altamente sensível e específica, possuindo habilidade de detectar e identificar o DNA parasitário envolvido, além de ser aplicada em várias amostras clínicas, a partir de diferentes tecidos, bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico, produzindo um resultado seguro em poucas horas (IKONOMOPOULOS et al., 2003).

A PCR adicionalmente aos métodos clássicos para diagnóstico da LV é uma ferramenta importante que deve ser considerada pelos clínicos, ao avaliar pacientes em áreas endêmicas. Também tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Muitos centros de pesquisa têm avaliado o uso da PCR para diagnóstico de LV utilizando

sangue periférico, considerando que a biopsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO e MELO, 2004).

## **2.5 CONTROLE**

O aprimoramento das medidas de controle está sendo feito com base em evidências encontradas na literatura científica e de ordem operacional, dentre elas: falta de padronização de diagnóstico da infecção humana e canina; discordância entre os estudos que avaliam o impacto da eliminação de cães soropositivos na prevalência da infecção humana; demonstração de que outros reservatórios podem ser fonte de infecção da *L. chagasi*, como os canídeos silvestres e os marsupiais e escassez de estudos sobre o impacto das ações de controle dirigidas contra os vetores (GONTIJO e MELO, 2004).

Muitos aspectos relacionados ao papel do cão na epidemiologia da LV ainda são desconhecidos. Um destes, que provavelmente está associado com o insucesso do controle da doença, refere-se aos critérios usados para seleção dos cães a serem eliminados, baseandose no diagnóstico por técnicas sorológicas. Por apresentarem baixas especificidade e sensibilidade, estas metodologias acarretam taxas de infecção subestimadas e conseqüentemente permitindo a manutenção de animais infectados nas áreas endêmicas (DA SILVA et al., 2005).

O impacto do controle da LV através da remoção e eutanásia dos cães soropositivos é outro aspecto e tem sido discutido por se mostrar de eficácia duvidosa. Diversos estudos demonstraram que a eliminação destes animais possui impacto limitado no controle da doença tanto em humanos quanto em cães, pois quando ocorre a nova introdução de cães susceptíveis na população a doença pode ser mantida (COURTENAY et al, 2002). NUNES et al. (2008) avaliaram a substituição de cães sacrificados de uma área endêmica no intuito de compreender melhor a dinâmica populacional quando a eliminação do cão reservatório é adotada como principal medida de controle. Em uma primeira avaliação 26,7% dos cães

eutanasiados eram sorologicamente positivos pelo método de ELISA. As posteriores substituições destes animais foram feitas em 38,8 % dos casos, algumas delas com dois ou mais cães. Os exames sorológicos posteriores detectaram que 42,2 % foram positivos, sendo que 30,6% já haviam sido positivos na primeira avaliação. Estes resultados reforçam a necessidade de uma reavaliação deste método de controle.

A prevenção da doença através de imunoprofilaxia aparece como uma das poucas alternativas para o controle, porém seu uso é ainda controverso. O tratamento de cães não é recomendado, pois existem dúvidas em relação à cura parasitológica, a despeito da aparente cura clínica. Embora os sinais clínicos sejam minimizados ou eliminados após o tratamento, os cães podem permanecer ainda como fontes de infecção. Com efeito, na vigência de cães sorologicamente positivos, recomenda-se a eutanásia humanitária (BRASIL, 2006).

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença, a metodologia proposta para a vigilância e adoção de medidas deve-se basear em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco. O novo enfoque é incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos e caninos da doença, nas ações de vigilância da mesma, visando minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão. Nas áreas com transmissão de LV, após estratificação epidemiológica, as medidas de controle serão distintas para cada área a ser trabalhada. Entretanto, é de fundamental importância que as medidas usualmente empregadas no controle da doença sejam realizadas de forma integrada, para que possam ser efetivas (BRASIL, 2006).

## **2.6 LEISHMANIOSE FELINA**

A leishmaniose felina (LF) é considerada de rara ocorrência, porém diferentemente do que se acredita, desde o século passado, casos clínicos vêm sendo diagnosticados em várias regiões do mundo. Além disso, os inquéritos epidemiológicos realizados com felinos, pela busca do protozoário ou pela detecção de anticorpos para *Leishmania* spp. têm

demonstrado taxas consideráveis de infecção por este agente nesta espécie animal.

Quando os casos iniciais foram relatados, diversos pesquisadores começaram a especular que os gatos domésticos poderiam desempenhar papel importante na epidemiologia da doença. Por este motivo, várias investigações epidemiológicas e experimentais foram realizadas nesta espécie. No entanto, resultados inconclusivos levaram ao abandono desta hipótese e novas pesquisas não foram realizadas (SERGENT et al., 1912; GIMENO ONDOVILLA, 1933; CHAGAS et al., 1938). Entretanto, nos últimos anos ocorreu um acréscimo no número de casos relatados, podendo isto estar associado ao aumento da incidência de infecções por *Leishmania* spp., avanços nas técnicas diagnósticas e ao incremento de programas de saúde voltados a animais de estimação (especialmente em países desenvolvidos), o que levou pesquisadores investigarem novamente o papel do gato como reservatório da LV em focos endêmicos. Os estudos são pouco eficientes, porém acredita-se que é ainda uma doença sub-diagnosticada (SIMÕES-MATTOS, 2005).

A possível ignorância dos profissionais da saúde, inclusive de médicos veterinários sobre a existência da leishmaniose em gatos, aliada à baixa frequência desta espécie nas clínicas veterinárias e aos escassos trabalhos sobre os aspectos clinicopatológicos e epidemiológicos da doença, contribuem para a falta de diagnóstico de LF, fazendo acreditar que seja uma doença incomum, além de limitar o conhecimento sobre o verdadeiro papel de gatos como hospedeiros reservatórios de *Leishmania* spp. e sua importância na saúde pública (JOHNSON et al., 1993, PENNISI, 2002; SIMÕES-MATTOS, 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006).

Historicamente, encontram-se poucos relatos de leishmaniose felina descritos na literatura, sendo que a maioria está concentrada no Velho Mundo. Até o ano de 2006 foram registrados 33 casos, onde 21 ocorreram no Velho Mundo e 12 no Novo Mundo, sendo distribuídos pela África (Argélia e Ilha de Reunião), Ásia (Vietnã e Iraque), Europa (Suíça, França, Portugal, Espanha e Itália) e Américas (EUA, Venezuela, Argentina e Brasil) (DANTAS-TORRES et al., 2006). No Brasil foram diagnosticados casos nos

Estados do Pará, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul (MELLO, 1940; PASSOS et al., 1996, SCHUBACH et al., 2004; SAVANI et al., 2004; SOUZA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al. 2006; SERRANO et al. 2008).

A doença em felinos envolve diferentes espécies do agente, sendo já descritos no Brasil: *Leishmania (Leishmania) infantum* (causadora da LV), *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (ambas causadoras da LTA). Em outros países há descrição de casos clínicos por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (DANTAS-TORRES et al. 2006).

Schubach et al. (2004) descreveram os primeiros dois casos de LTA em felinos por *L. (V.) braziliensis* no município do Rio de Janeiro. Ambos os animais apresentavam lesões na mucosa nasal, sem quaisquer outras alterações. Na região metropolitana de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, um caso da doença ocasionada pela mesma espécie do parasito citado anteriormente em um gato apresentando lesões na região interdigital foi diagnosticado (PASSOS et al. 1996).

No município de Cotia, estado de São Paulo, região aparentemente não-endêmica para leishmaniose, SAVANI et al. (2004) relataram um caso de LF apresentando lesão nodular no nariz e linfadenomegalia, com título 80 para *Leishmania* spp. na prova de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 400 para peritonite infecciosa felina (PIF) e negativo para imunodeficiência felina (FIV) e para leucemia felina (FeLV). Formas amastigotas foram encontradas nas lesões pelo método de Giemsa. O animal foi eutanasiado e pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de fragmentos do baço foi identificada a espécie *L. (L.) infantum chagasi*.

No Mato Grosso do Sul, Souza et al. (2005) descreveram um caso de LF ocasionada pela espécie *L. (L.) amazonensis* (caracterizada por anticorpos monoclonais) em um gato que apresentava lesões nodulares no nariz, diversos nódulos nas orelhas e na região interdigital. As lesões apresentavam formas amastigotas observadas pelo método de Giemsa e numerosas promastigotas em meio de cultivo NNN.

De 110 gatos avaliados pela RIFI, oito (7,3%) foram reagentes com título = 40. Os animais soropositivos foram submetidos à pesquisa parasitológica por citologia, cultura e PCR, a partir de aspirados de medula óssea e linfonodos. Não foram observadas formas parasitárias no exame citológico ou em cultura, porém na PCR, três (40,2%) amostras foram positivas (NOÉ, 2007).

Serrano et al. (2008), descreveram o primeiro caso de LF na cidade de Araçatuba, estado de São Paulo. O animal apresentava alopecia e descamação na orelha e região temporal, assim como dermatite crostosa úmida. Foram realizados exames sorológicos (RIFI e ELISA) para verificar a presença de anticorpos para *Leishmania* spp., PCR para verificação da presença de DNA do parasito, raspados de pele e exame parasitológico direto de fragmento do linfonodo poplíteo. A confirmação da infecção por *Leishmania* spp. foi obtida apenas pela PCR.

Na tentativa de esclarecer a patogenia da leishmaniose nesta espécie animal, estudos avaliaram a suscetibilidade à infecção experimental. Entretanto, os primeiros trabalhos não obtiveram sucesso na reprodução da doença manifesta (LAVÉLAN, 1913; NICOLLE e BLAIZOT, 1912 *apud* MARECHAL, 1993; GIORDANO, 1933; MELLO, 1940; DEANE, 1958; BARBOSA-SANTOS et al., 1988). Porém, mais recentemente, a infecção e doença em gatos, ocorridas pela inoculação experimental de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* (KIRKPATRICK et al., 1984) e *L. (V.) braziliensis* (SIMÕES-MATTOS et al., 2005), demonstraram a suscetibilidade da espécie felina.

Formas amastigotas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* foram inoculadas por via intravenosa (IV) e as promastigotas por via subcutânea (SC), sendo que a identificação dos parasitos ocorreu em diferentes tempos no sangue, fígado, baço e medula óssea, 16 semanas após a infecção apenas nos gatos inoculados pela primeira das vias. Um fato interessante foi que não houve correlação entre a detecção de títulos elevados de anticorpos para *Leishmania* spp. e o surgimento dos sinais clínicos da doença (KIRKPATRICK et al., 1984).

Em relação aos trabalhos com *L. (V.) braziliensis*, agente da LTA, observou-se que os gatos inoculados com concentração 10<sup>7</sup> de formas promastigotas do parasito, exibiram lesões parecidas com as observadas em casos clínicos naturais de leishmaniose humana, canina e felina e ainda, obtiveram cura clínica espontânea por volta dos dez meses de infecção. A resposta imune, por sua vez, evidenciou que os títulos de anticorpos ocorreram tardiamente à lesão, e mesmo após a auto-cura clínica, poucos animais ainda apresentavam títulos até o fim de 15 meses do experimento, o que permitiu suspeitar da persistência do parasito no hospedeiro (SIMÕES-MATTOS et al., 2005).

O xenodiagnóstico, técnica utilizada para detecção e isolamento de um patógeno utilizando seu vetor artrópode natural após contato com um hospedeiro, é a forma mais eficaz de comprovar se determinada espécie animal pode ser considerada como reservatório de *Leishmania* spp. Diante disso SIMÕES-MATTOS et al. (2004b) obtiveram resultados positivos com este método, onde encontraram o vetor *Lutzomyia migonei* infectado, após ter sugado um gato experimentalmente inoculado com *L. (V.) braziliensis*. Na Itália, MAROLI et al. (2007) submeteram um gato cronicamente infectado por *L. (L.) infantum* à mesma técnica, porém utilizando a espécie *Phlebotomus perniciosus*, vetor importante da doença na região do Mediterrâneo, e constataram a presença de formas promastigotas no trato digestório do inseto, sendo a espécie de *Leishmania* spp. confirmada pela técnica de RFLP-PCR.

Alguns pesquisadores europeus suspeitam que a preferência alimentar dos flebotomíneos estudados esteja, mais provavelmente, relacionada com a disponibilidade de hospedeiros do que com a atratividade particular de cada um deles. Acredita-se que a alta densidade populacional de felinos e também devido a seus hábitos crepusculares e noturnos, similares aos vetores, bem como sua capacidade em caminharem até 1,5 Km de distância de suas casas (UNDERHILL-DAY, 2005), coloque-os em situação favorável à infecção por *Leishmania* spp. em áreas endêmicas. Além disso, os gatos podem adentrar por áreas florestais,

freqüentando, portanto áreas silvestres e domésticas (SIMÕESMATTOS, 2005; DA SILVA et al., 2008 ).

Gatos podem sofrer diferentes condições imunossupressoras causadas especialmente pelos vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV). Estudo desenvolvido na Espanha por Martin SÁNCHEZ et al. (2007) demonstrou que a LF pudesse estar associada a estas doenças, favorecendo a multiplicação do parasito e manifestação da enfermidade clínica, assim como o HIV no homem e facilitar a transmissão do agente. Estes pesquisadores estudaram a prevalência da infecção por *L. infantum* em 183 animais e as possíveis relações com infecções por FIV ou FeLV. A percentagem de animais infectados foi de 70,6%, sendo que 35,7% reagiram para FeLV e 7,9% para FIV. Obteve-se uma associação negativa entre a soropositividade para *Leishmania* spp. e infecção por FeLV, por isso a produção de anticorpos parece ser comprometida em animais com leucemia. Ao contrário, a imunodeficiência apresentou prevalência muito abaixo da anterior. Apesar disto, os autores sugeriram que a presença destes agentes fosse importante no desenvolvimento de LF. Na Itália, PENNISI et al. (1998), em um estudo retrospectivo envolvendo 93 gatos, demonstraram que a sorologia positiva para FIV esteve significativamente associada à positividade para anticorpos para *Leishmania* spp., com títulos iguais ou superiores a 40.

As alterações clínicas associadas a infecções por *Leishmania* spp. relatadas nos últimos anos, parecem ser similares àquelas que ocorrem em leishmanioses humana e canina, indicando que o parasito pode causar tanto a forma cutânea, sendo esta a mais comum, como sistêmica, característica da LV disseminada, porém raramente detectada em gatos. As manifestações cutâneas são inespecíficas e por esta razão a infecção parasitária pode ser subestimada durante a investigação clínica, pois existe dificuldade em distinguir a doença de outras como neoplasias e doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos, sendo essencial o diagnóstico diferencial para a presença de *Leishmania* spp., especialmente em regiões endêmicas (LARUELLE-MAGALON e TOGA, 1996; HERVÁS et al., 1999; POLI et al., 2002).

A confusão com infecção por fungos pode ser considerada a más problemática, principalmente nos casos de histoplasmoze, esporotricose e criptococose. Além disso, o diagnóstico clínico de infecções fúngicas ao invés de *Leishmania* spp., determina a prescrição de antimicóticos que podem causar cura temporária da leishmaniose, uma vez que algumas destas drogas têm relativo efeito contra este parasito (SIMÕES-MATTOS et al., 2002).

As manifestações mais comuns incluem dermatite ulcerativa, papular e pruriginosa, além de alopecia difusa. Além disso, podem apresentar uveíte, linfadenomegalia local ou generalizada, emese, diarréia, desidratação, perda de peso, estomatite, anorexia e até mesmo, depressão. A maior parte dos casos é diagnosticada quando o animal tornase sintomático (DANTAS-TORRES et al, 2006).

Segundo SIMÕES-MATTOS (2005), o levantamento dos registros de LF permitiu avaliar alguns aspectos importantes com relação à manifestação da doença em felinos. Do total de casos clínicos de LF, 86,7% mostraram manifestações cutâneas, sendo que em 50% dos animais foi o único sinal observado. Além disso, foram encontradas taxas de 20% de linfadenopatia e 10% de visceromegalia associadas às manifestações cutâneas. Entretanto, a linfadenopatia é pouco citada (3,3%) como única manifestação da doença. Curiosamente, as alterações cutâneas também foram observadas na maioria dos casos de infecção por cepas de *Leishmania* causadoras de LV. Os nódulos (39,5%) e as úlceras (31,6%) foram as lesões mais predominantes, seguidas por dermatite inespecífica (18,5%) e lesão vegetativa e pápulas, ambas com mesma freqüência (5,2%).

Uma informação importante é que, a cabeça (74%) e, em particular, o nariz (42%), foram as áreas mais afetadas do corpo dos gatos. A orelha (24%) e região ocular (20%) despontam em seguida e os lábios com 4%. (SIMÕES-MATTOS, 2005). Para alguns estudiosos, o maior acometimento de lesões nestas regiões anatômicas parece ser coerente com a habilidade dos flebotomíneos em picar áreas com menor quantidade de pêlos (BONFANTE-GARRIDO et al., 1996).

Várias questões importantes são debatidas atualmente, tais como: os gatos são hospedeiros acidentais, infectados ocasionalmente ou reservatórios de *Leishmania* spp.? São portadores assintomáticos ou potenciais transmissores do parasito aos vetores? A coinfeção com FIV e/ou FeLV promove a doença? As respostas a estas perguntas nos permitirão compreender melhor as conseqüências da LF e determinar os fatores de risco da população humana exposta a gatos infectados por *Leishmania* spp. De fato, ainda não há pesquisas suficientes que evidenciem o papel desta espécie animal no ciclo zoonótico de transmissão das leishmanioses e, devido a isso, o controle ainda permanece desconhecido (SIMÕES-MATTOS et al., 2004a).

## **2.7 IMPORTÂNCIA DA LEISHMANIOSE NO MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE (MS)**

Assim como em outras áreas brasileiras, no Estado de Mato Grosso do Sul a leishmaniose visceral canina encontrase em expansão. A primeira descrição de LV humana, supostamente autóctone, do continente americano, comprovado parasitologicamente, ocorreu em 1911, em um imigrante italiano que após treze anos em Santos, viajou para a região de Porto Esperança, Mato Grosso, (hoje Mato Grosso do Sul), onde ficou doente (MIGONE, 1913). Após este relato, são esporádicas as menções sobre a existência da doença na zona rural de outras áreas do Estado de Mato Grosso do Sul (CHAGAS, 1938; OLIVEIRA, 1938). A notificação de casos clínicos de LV em humanos a partir de 1980 no município de Corumbá, e o encontro de cães com aspecto sugestivo da doença, levaram à investigação desses animais, sendo esta a primeira confirmação parasitológica da doença no Estado (REGO et al., 1983; NUNES et al., 1988). Assinalada no Pantanal desde o início da década de 80, nas cidades de Corumbá e Ladário, em anos mais recentes a parasitose tem sido registrada além dos limites daquela região, atingindo o município de Dois Irmãos do Buriti, Bodoquena, Miranda, Aquidauana, Anastácio, Antônio João e Campo Grande, este último um dos alvos de nosso estudo.

O padrão de transmissão da leishmaniose pode se modificar devido a alterações ambientais e, conseqüentemente, à adaptação do vetor, associado às migrações da população (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; BEJARANO et al., 2002). O Estado de Mato Grosso do Sul sofreu, nos últimos anos, modificações ambientais que podem ter contribuído para a disseminação do vetor, como a construção de um gasoduto e a destruição de áreas do cerrado. No município de Campo Grande, a abertura de avenidas acompanhando os cursos das águas e a derrubada da vegetação para construção de casas populares foram fatores de mudança do ambiente (SILVA, ANDREOTTI e HONER, 2007).

Em Campo Grande (MS), os primeiros casos caninos surgiram em 1998, sendo isolada *L. chagasi* e desde então a população canina vem sofrendo consideráveis baixas. Os primeiros casos humanos foram notificados em 2002, quando o Ministério da Saúde registrou 217 casos da doença em humanos e a situação atingiu grandes proporções, sendo o município classificado como área de transmissão intensa. Segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado foram registradas 15 mortes em 2004, 19 em 2005, 10 no primeiro semestre de 2006, 14 em 2007 e no início de 2008, já havia sido registradas 16 confirmações, sendo 12 na capital e 4 importados de Corumbá, Três Lagoas, Amambaí e Aquidauana (CORREIO DO ESTADO, 2008). Os registros junto à Secretaria de Saúde de Campo Grande, MS revelaram 813 casos autóctones humanos entre os anos de 2001 e setembro de 2008 (SINAN, 2009). Sabese que, apesar de ser uma doença de notificação compulsória, os dados disponíveis são baseados na detecção passiva de casos, sendo o número de pessoas expostas a infecção ou infectadas sem sintomas, em algumas áreas, muito maior do que o número de casos detectados (GONTIJO e MELO, 2004).

Durante estudos da fauna de flebotomídeos do local várias espécimes de *Lu. longipalpis* foram capturadas, sendo então assinalados na área urbana. O Centro de Controle de Zoonoses do município divulgou que, em 2003, de 13.885 cães, 5045 (36,33%) foram positivos aos testes sorológicos; em 2004, de 10250 cães, 3364 (32,82%) foram reagentes e no primeiro semestre de 2007 a doença foi constatada em 14% dos 115.000

cães examinados (CAMPO GRANDE NEWS, 2009) Pelas informações apresentadas, torna-se necessária a investigação contínua da ocorrência da infecção canina nesse município, assim como ações de vigilância epidemiológica para se aperfeiçoar as medidas de controle da doença.

## **2.8 IMPORTÂNCIA DA LEISHMANIOSE NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU (SP)**

O município de Botucatu (SP), de acordo com a Secretaria de Estado de Saúde e Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), foi classificado como silencioso não receptivo e vulnerável, ou seja, não apresenta confirmação de casos autóctones humanos ou caninos e não há presença conhecida do vetor (BRASIL, 2006).

LANGONI et al. (2001), em trabalho de vigilância epidemiológica no município, estudaram 781 amostras de soro canino durante campanha de vacinação anti-rábica, para pesquisa de anticorpos da classe IgG anti *Leishmania* spp. pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Todos os soros testados foram negativos, o que indica que a cidade, naquele momento, não apresentava risco potencial para ocorrência de surto epidêmico de leishmaniose. O estudo ressalta a importância de esforços contínuos e permanentes na vigilância epidemiológica contra esta doença, visando o diagnóstico precoce de casos autóctones, para prevenção posterior na disseminação do agente para o homem, animais e flebotomídeos.

*OBJETIVOS*

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral:

- ? Estudar a ocorrência de *Leishmania* spp. a partir de amostras de sangue de cães e gatos, procedentes do município de Campo Grande (MS), região endêmica para leishmaniose, e também do município de Botucatu (SP), considerado até o momento região não endêmica para esta enfermidade.

#### Objetivos específicos:

- ? Verificar a associação entre as técnicas de hemocultura, diagnóstico sorológico para *Leishmania* spp., empregando-se a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir das culturas de sangue de cães e gatos procedentes de Botucatu (SP) e Campo Grande (SP).
- ? Avaliar a importância da espécie felina como reservatório de *Leishmania* spp.

## *MATERIAL E MÉTODOS*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi devidamente apresentado à Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ - UNESP/Botucatu – SP, tendo sido aprovado no dia 19 de abril de 2007, protocolo número 652007-CEEA (**Anexo 1**). As colheitas de sangue dos cães e gatos foram autorizadas pelos médicos veterinários responsáveis pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande e Canil Municipal de Botucatu.

### 4.2 MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE - MS (ÁREA ENDÊMICA)

O [município](#) de Campo Grande está localizado geograficamente na porção central de [Mato Grosso do Sul](#), na [Serra de Maracaju](#) (**Figura 1**). Está equidistante dos extremos norte, sul, leste e oeste e se situa a 1.134 [km](#) de [Brasília](#). Possui uma [latitude](#) 20°26'34" Sul e a uma [longitude](#) 54°38'47" Oeste. Tem área total de 8.096,051 km<sup>2</sup>, ocupando 2,26% da área total do Estado. A área urbana totaliza 154,45 km<sup>2</sup> (WIKIPÉDIA, 2009).



**FIGURA 1** Localização do município de Campo Grande no estado de Mato Grosso do Sul (Fonte:[http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo\\_Grande](http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo_Grande)).

#### **4.3 MUNICÍPIO DE BOTUCATU - SP (ÁREA NÃO-ENDÊMICA)**

Botucatu é um [município brasileiro](#) do [estado](#) de [São Paulo](#) (**Figura 2**) Localiza-se a 22°53'09" de [latitude sul](#), 48°26'42" de [longitude oeste](#), e a 804 [metros](#) de [altitude](#). Dista 235 km da [capital](#) São Paulo, à qual se interliga pelas rodovias [Marechal Rondon](#) e [Castelo Branco](#). A população recenseada em [2008](#) foi de 128.397 habitantes. Botucatu, que no passado chegou a representar 1/4 da extensão territorial do estado de São Paulo está localizada na região centro sul do Estado, ocupando hoje uma área de 1.482,87 km<sup>2</sup> (WIKIPÉDIA, 2009).



**FIGURA 2** Localização do município de Botucatu no estado de São Paulo (Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Botucatu>).

#### **4.4 LOCAIS DE EXECUÇÃO DOS PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS**

Todos os procedimentos laboratoriais a partir das coletas de sangue dos cães e gatos do Canil Municipal de Botucatu (SP), foram realizados no Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu-SP. Para a realização das hemoculturas dos cães e gatos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), as amostras foram processadas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS.

Os cães e os gatos escolhidos aleatoriamente foram submetidos a exame clínico individual, antes da coleta do sangue para a hemocultura, registrando-se informações sobre procedência e alterações clínicas. No Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande (MS) foram utilizados 50 gatos (nove machos e 41 fêmeas) encaminhados para castração e 50 cães (28 machos e 22 fêmeas) eutanasiados por diversos motivos, incluindo doentes, indesejados, com sorologia positiva em inquéritos realizados pelo próprio centro, com sintomatologia sugestiva de LV e encontrados nas ruas, sendo a maioria sem raça definida. No Canil Municipal de Botucatu (SP) foram utilizados seis gatos (dois machos e quatro fêmeas) e 44 gatos (16 machos e 28 fêmeas) procedentes da Associação de Proteção aos Animais

(APA), encaminhados a estes locais por serem indesejáveis, invasores, doentes ou para doação e 50 cães (23 machos e 27 fêmeas) eutanasiados por vários motivos, incluindo doentes, agressores, invasores, indesejáveis e encontrados em via pública. A maioria era sem raça definida, com idades variadas, sendo a maioria adultos jovens.

#### **4.5 COLHEITA DE SANGUE**

Foram coletados de cada animal, cinco a oito mL de sangue, por punção veno-jugular. Utilizou-se tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidos sob refrigeração até chegada ao laboratório para cultivo em meio Liver Infusion Tryptose (LIT), conforme descrição no item 4.6. Tubos sem anticoagulante foram utilizados na obtenção de soro sanguíneo após centrifugação em laboratório para realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

#### **4.6 HEMOCULTURA**

Na hemocultura, foram separados três tubos, contendo, em cada um, 5mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril (**Anexo 2**). A manipulação das amostras de sangue foi realizada em capela de fluxo laminar, limpa previamente com álcool 70° e mantida sob a ação de luz ultravioleta (UV) (**Figura 3**), no mínimo por 15 minutos. Os tubos estavam estéreis e foram devidamente identificados com a espécie animal, numeração sequencial do projeto, procedência e respectivas frações do sangue cultivadas **Figuras 4 e 5**). Com uma seringa estéril de 1mL, retirou-se a porção plasmática e transferiu-se lentamente para o primeiro tubo (**Figura 6**). Este procedimento foi repetido para a porção leucocitária (localizada entre o plasma e o sedimento de hemácias), a qual foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o terceiro tubo. As culturas (**Figura 7**) foram mantidas em estufa a 28 a 30°C, até quatro meses após a

inoculação, quando então foram submetidas ao preparo para a extração do DNA de *Leishmania* spp.



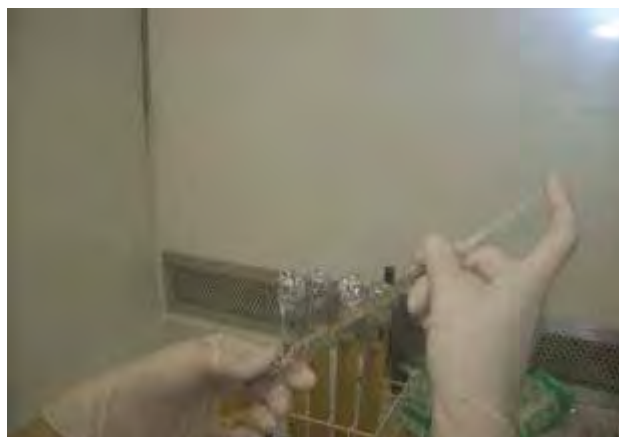
**FIGURA 3** Capela de fluxo laminar utilizada sob luz ultravioleta (UV) utilizada para manipulação das amostras de sangue coletadas e preparação das hemoculturas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT).



**FIGURA 4** Tubo estéril utilizado nas hemoculturas.



**FIGURA 5** Identificação individual dos tubos de hemoculturas.



**FIGURA 6** Transferência da porção plasmática do sangue para um tubo contendo meio de cultura Liver Infusion Tryptose (LIT).



**FIGURA 7** Hemoculturas prontas para serem armazenadas em estufa com temperatura de 28° a 30° C.

#### **4.7 LEITURAS DAS HEMOCULTURAS**

Em capela de fluxo laminar, após dez dias da inoculação da amostra, realizou-se a primeira leitura, retirando-se cinco  $\mu\text{L}$  de cada tubo de cultura inoculado, colocando-se entre lâmina e lamínula, fazendo-se a leitura de pelo menos cinco lâminas por tubo. As culturas foram observadas quinzenalmente, durante quatro meses, sob microscopia óptica no aumento de 1000X, com óleo de imersão. As culturas que apresentaram formas flageladas eram consideradas positivas e foram imediatamente processadas para a extração do DNA parasitário, bem como as culturas negativas, após o término dos quatro meses de acompanhamento das leituras.

#### **4.8 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE EM MEIO LIT PARA A EXTRAÇÃO DO DNA DE *Leishmania* spp.**

Tanto as culturas positivas, quanto as negativas, foram lavadas duas vezes em Solução Salina Tamponada (PBS) estéril, pH 7,2 (**Anexo 3**), centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sedimento armazenado em microtubos estéreis livres de DNAs e RNAs a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso para extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se kit comercial Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare<sup>®</sup>), conforme instruções recomendadas pelo fabricante (**Anexo 4**).

#### **4.9 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *Leishmania* spp.**

##### **4.9.1 PREPARO DO ANTÍGENO E LÂMINAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA**

O antígeno utilizado para sensibilização das lâminas de imunofluorescência foi preparado no laboratório do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP/Botucatu e consiste em formas promastigotas de *Leishmania* spp., mantidas em tubos rosqueados contendo 10 mL de meio Liver Infusion

Tryptose (LIT) e 5 mL de meio Novy-MacNeal- Nicolle (NNN), repicados semanalmente. Em capela de fluxo laminar, retirou-se uma gota de cada um dos três tubos de manutenção mais recentes referente ao repique da semana anterior, colocando-se entre lâmina e lamínula para observação em microscópio óptico, em aumento 40X, para avaliação do crescimento das formas promastigotas. Do tubo que apresentar parasitas com melhor motilidade e em maior quantidade, repicou-se 0,5 mL para três novos tubos de meio, procedendo-se, assim uma nova passagem. Os tubos foram mantidos em estufa a 25° C. Após a verificação do crescimento das promastigotas em microscópio óptico, foram centrifugados 10 mL do meio de LIT a 3000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se de 2 a 3 mL 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, utilizando-se como antígeno quando se obtiver de 20 a 30 parasitas por campo microscópico, em avaliação de 50 µL do antígeno em lâmina e lamínula 24x60mm. As lâminas de antígeno 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 foram secas em temperatura ambiente, e mantidas em laminário à -20°C, até o momento do uso, por um período máximo de duas semanas.

#### **4.9.2 TÉCNICA DE REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)**

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com CAMARGO (1966) em que foram utilizadas microplacas para a diluição dos soros, pipetandose 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 100µL de PBS 0,01M, pH 7,2 em outras cinco cavidades e a partir da primeira diluição, transferindo-se 100 µL para o 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 maneira, foram

diluídas amostras de soros controles positivo e negativo. Em lâminas fixadas 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 7,2 por 10 minutos, por duas vezes consecutivas e, a seguir, secas em estufa. O conjugado espécieespecífico 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. Realizou-se uma nova lavagem em jarra de *coplin* com PBS 0,01M, pH 7,2 por 10 minutos, duas vezes consecutivas, secando-se em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula 24x60mm, examinando-se em microscópio de imunofluorescência, no aumento 40 vezes. Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

#### **4.10 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA *Leishmania* spp.**

Cada microtubo de 0,2mL recebeu tampão de PCR 1X (50mMol KCl, 10mMol de Tris-HCl), 1,5U de Taq-polimerase, 1,5mM de cloreto de magnésio 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25mM de dNTP, e água ultra pura (MIX-PCR) para completar volume de 40uL. Após foi adicionado 10µL da amostra a ser testada.

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 95°C por 3 minutos, seguido de 33 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante um minuto e uma extensão final de 72°C 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** Sequência de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados (IKONOMOPOULOS et al, 2003).

Iniciador	Sequência	Tamanho do fragmento esperado em pares de bases
LIN 19	5´CAGAACGCCCTACCCG 3´	720
LINR4	5´GGGGTTGGTGTAATAGGG 3´	

Nesta reação, os produtos resultantes apresentam 720 pares de base (pb) de comprimento, que correspondem à amplificação de segmento contendo região específica de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp. (ARANSAY et al., 2000). A identificação dos produtos amplificados foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para isso, alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2µL de solução de azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris borato-EDTA (TBE) 0,5X, corado com 2 µL de brometo de etídeo. O gel para eletroforese foi preparado com 1,5g de agarose pura em 100mL de tampão Tris EDTA-Borato (TBE) 0,5X. A agarose foi dissolvida em TBE 0,5X previamente aquecido, para que se dissolvesse totalmente. O material foi distribuído uniformemente na cuba de eletroforese. A corrida foi realizada a 80 volts por 60 minutos. Ao final as bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta. Os géis foram fotografados utilizando o sistema fotográfico Kodak Digital Science DC40 ®. Foram utilizados como controles positivos produtos da cepa amplificada de *Leishmania* spp. e, como negativos água miliQ e o MIX-PCR. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder, 100pb

#### 4.10.1 LIMIAR DE DETECÇÃO DA PCR

O ensaio do limiar de detecção da *Leishmania* spp. pela PCR foi realizado de acordo com a metodologia descrita no **Anexo 5**. Para tanto, foi utilizada amostra de *Leishmania* spp. mantida em meio de cultura LIT e NNN, proveniente da rotina diagnóstica do NUPEZO.

#### **4.11 METODOLOGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As técnicas diagnósticas utilizadas no estudo foram avaliadas pela estimativa da acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e coeficiente Kappa para concordância entre o diagnóstico obtido entre os testes, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Para estimar a associação entre sinais clínicos e a positividade à *Leishmania* spp. foram utilizados o teste de qui-quadrado e o teste exato de Fischer. (MEDRONHO et al., 2009).

## *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RESULTADOS GERAIS

Das hemoculturas analisadas de cães procedentes de Botucatu, três (6%) foram positivas e 47 (94%) foram negativas. Já em gatos, duas amostras (4%) foram positivas e 48 (96%) foram negativas. Na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 100% das amostras dos cães e 100% dos gatos foram negativas, assim como na prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. (**Tabela 1**).

Quanto às hemoculturas dos animais de Campo Grande (MS), 29 amostras de cães (58%) foram positivas e 21 (42%) negativas. As amostras dos gatos apresentaram 100% de negatividade à hemocultura, assim como na PCR para *Leishmania* spp. Quanto aos cães, 36 amostras (72%) foram positivas e 14 (28%) negativas à PCR para *Leishmania* spp. Na RIFI 32 cães (64%) foram positivos e 18 (36%) negativos. Quinze gatos (30%) apresentaram positividade à RIFI para *Leishmania* spp., enquanto que 35 (70%) foram negativos (**Tabela 1**). Os títulos variaram de 80 a 640 em soros dos cães (**Tabela 2**) e de 40 a 320 em soros dos gatos (**Tabela 3**).

Para avaliação da acuidade diagnóstica das técnicas diagnósticas aplicadas no estudo, a prova de PCR foi considerada padrãoouro. Os resultados obtidos pela RIFI nas 50 amostras de cães do município de Campo Grande (MS) testadas, considerando a PCR como padrãoouro podem ser observados na **Tabela 4** e os resultados obtidos nas hemoculturas na **Tabela 5**.

**TABELA 1** Estimativa do percentual de animais com diagnóstico positivo para *Leishmania* spp. pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo local e espécie. Botucatu – SP, 2009.

Exame	Local	Espécie	% Relativo <sup>(1)</sup>	IC (95%; %Relativo) <sup>(2)</sup>
PCR	Botucatu-SP	Cão	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
	Campo Grande-MS	Cão	72,0%	(59,0% - 84,0%)
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
Hemocultura	Botucatu-SP	Cão	6,0%	(0,0% - 12,7%)
		Gato	4,0%	(0,0% - 9,5%)
	Campo Grande-MS	Cão	58,0%	(44,0% - 71,9%)
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
RIFI	Botucatu-SP	Cão	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
	Campo Grande-MS	Cão	64,0%	(50,4% - 77,5%)
		Gato	30,0%	(17,0% - 42,9%)

(1) Ao total de 50 animais examinados por espécie e local;

(2) Considerando erro-padrão do estimador da proporção associado ao plano amostral "Amostra Aleatória Simples com reposição" e variância populacional desconhecida;

(3) Impossibilidade de estimação devida variabilidade amostral nula.

**TABELA 2.** Soroprevalência de 50 cães do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS) para *Leishmania* spp. pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Botucatu-SP, 2009.

	RIFI	Animais Positivos	Porcentagem
Título	640	22	44,0%
	320	05	10,0%
	160	03	6,0%
	80	02	4,0%
<b>Total</b>		<b>32</b>	<b>64,0%</b>

**TABELA 3** Soroprevalência de 50 gatos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande (MS) para *Leishmania* spp. pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Botucatu-SP, 2009.

	RIFI	Animais Positivos	Porcentagem
Título	320	02	4,0%
	160	04	8,0%
	80	03	6,0%
	40	06	12,0%
<b>Total</b>		<b>15</b>	<b>30,0%</b>

**TABELA 4** Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos para *Leishmania* spp., em amostras de soros de 50 cães procedentes de Campo Grande (MS), segundo resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Botucatu, SP, 2009.

		RIFI		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
PCR	POSITIVO	29	7	<b>36</b>
	NEGATIVO	3	11	<b>14</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>18</b>	<b>50</b>

**TABELA 5** Resultados das Hemoculturas de 50 cães procedentes de Campo Grande (MS), segundo resultado da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Botucatu, SP, 2009.

		HEMOCULTURA		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
PCR	POSITIVO	25	11	<b>36</b>
	NEGATIVO	4	10	<b>14</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>21</b>	<b>50</b>

## 5.2 DISTRIBUIÇÃO DOS CÃES E GATOS NOS MUNICÍPIOS DE BOTUCATU (SP) E CAMPO GRANDE (MS)

A maioria dos cães estudados do município de Campo Grande (MS) foram provenientes da periferia, com baixa renda da população, presença de terrenos baldios e acúmulo de matéria orgânica possibilitando a multiplicação do vetor da leishmaniose. A distribuição dos cães e gatos do município de Campo Grande (MS) pelas regiões: Segredo, Prosa, Centro, Bandeira, Anhanduizinho, Lagoa e Imbirussu (**Anexo 6**) encontra-se na **Tabela 6**.

**TABELA 6** Distribuição dos 50 cães e 50 gatos por região do município de Campo Grande (MS). Botucatu, 2009.

Região	Espécie	
	Cães	Gatos
Segredo	12	03
Prosa	01	05
Centro	03	05
Bandeira	03	05
Anhanduizinho	09	17
Lagoa	10	09
Imbirussu	10	02
Desconhecida	02	04
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

A distribuição dos cães e gatos estudados do município de Botucatu (SP) pelos setores: Norte, Sul, Leste, Oeste e Central (**Anexo 7**) encontra-se na **Tabela 7**.

**TABELA 7** Distribuição dos 50 cães e 50 gatos por região do município de Botucatu (SP). Botucatu, 2009.

Setor	Espécie	
	Cães	Gatos
Norte	07	01
Sul	16	48 <sup>(1)</sup>
Leste	04	-
Oeste	11	01
Central	05	-
Desconhecida	07	-
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

<sup>(1)</sup> Deste total, 44 pertencem à Associação de Proteção aos Animais (APA), localizada no Jardim Reflorenda e a informação de origem destes animais é desconhecida

### 5.3 SINAIS CLÍNICOS

Os cães estudados provenientes do Canil Municipal de Botucatu- SP apresentaram determinados sinais clínicos compatíveis com a LV, especialmente emagrecimento e lesões na pele; porém, não foi comprovada a infecção destes pelos testes diagnósticos utilizados (**Tabela 8**). Isto se deve ao fato de que, por tratar-se de animais em sua maioria abandonados pelos proprietários ou capturados nas ruas, as suas condições de saúde eram ruins e como dito anteriormente algumas destas manifestações são comuns a outras doenças. Já os 50 gatos (100%) do mesmo município não apresentaram qualquer sinal clínico de suspeita.

**TABELA 8** Estimativa da distribuição das lesões segundo diagnóstico de *Leishmania* spp. pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em 50 cães do Canil Municipal de Botucatu (SP). Botucatu– SP, 2009.

	Diagnóstico		P
	Negativo (n=50)	Positivo (n=0)	
Onicogribose (%)	2,0	---	---
Emagrecimento (%)	38,0	---	---
Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	16,0	---	---
Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	---	---
Linfadenomegalia (%)	0,0	---	---
Alopecia (%)	14,0	---	---
Lesões oculares (%)	14,0	---	---
Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	44,0	---	---
Quadro assintomático (%)	34,0	---	---

(a) Úlceras, lesões furfuráceas e descamação;

(b) Emese, diarreia, sinais neurológicos compatíveis com doenças infectocontagiosas como parvovirose e cinomose.

Oito cães do município de Campo Grande - MS apresentaram resultados negativos em todas as técnicas, apesar de apresentarem sinais clínicos encontrados neste estudo compatíveis com manifestações mais comuns da doença. Todavia, como elucidado anteriormente, os sinais não são patognomônicos, apresentando-se também em outras afecções caninas. Portanto, pela associação das três provas diagnósticas, pode-se afirmar que esses animais não estavam infectados. Tratavam-se de animais errantes,

doentes por outras causas ou indesejáveis pelos proprietários, pelo fato de apresentarem sintomatologia semelhante a LV, tornando-os suspeitos.

Especialmente em áreas cujo padrão socioeconômico é baixo, outros fatores podem estar associados dificultando o diagnóstico clínico da LV, especialmente as dermatoses e a desnutrição, mascarando ou modificando o quadro clínico da LV. Outro problema significativo para este diagnóstico é o fato de que alguns destes sinais podem surgir em inúmeras outras doenças infecciosas e em casos de desordens linfoproliferativas. Além disso, a ausência de sinais clínicos característicos para a LV canina, que possam ser usados como um marcador específico para a infecção e a ampla variedade de manifestações clínicas não específicas torna as técnicas laboratoriais indispensáveis para obtenção de um diagnóstico preciso (BRASIL, 2006, AGUIAR et al., 2007).

MANCIANTTI et al (1988) classificaram os cães infectados por *Leishmania infantum* de acordo com a sintomatologia clínica, sendo os sintomáticos os que apresentavam três ou mais sinais, oligossintomáticos aqueles com um a três sinais e assintomáticos aqueles sem sinais clínicos. Em cães sintomáticos, apenas um teste de alta especificidade para diagnóstico de LV geralmente é suficiente; entretanto, torna-se mais complicado em relação a cães assintomáticos e oligossintomáticos. Nesses casos e para fins epidemiológicos, é necessário um teste de elevada sensibilidade (GOMES et al., 2006).

Os resultados neste estudo a partir da classificação sintomatológica de cães do município de Campo Grande (MS) foram, em sua maioria oligossintomáticos (57,1%), seguidos por sintomáticos (31,0%) e, por fim, os assintomáticos (11,9%), representados na **Tabela 9**, considerando animais positivos em pelo menos uma das técnicas diagnósticas. Estes resultados são equivalentes aos estudos de SONODA (2007) que, em um grupo de 36 casos caninos de LV, 50% eram oligossintomáticos, 47,2% sintomáticos e 2,8% assintomáticos e de AGUIAR et al. (2007) que, em um total de 61 cães identificados como soropositivos pelo teste de ELISA, 39 (65%) eram oligossintomáticos e 21 (35%) sintomáticos. Já MOREIRA et al. (2007), na região de Araçatuba – SP, avaliando 89 animais naturalmente infectados, 41

(46,1%) eram sintomáticos, 25 (28,1%) oligossintomáticos e 23 (25,8%) assintomáticos.

**TABELA 9** Resultados positivos pela técnica de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em 50 cães do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), classificados segundo sintomatologia. Botucatu-SP, 2009.

<b>Classificação</b>	<b>Frequência<sup>(1)</sup> (n=42)</b>	<b>Hemocultura<sup>(2)</sup> (n=29)</b>	<b>RIFI<sup>(2)</sup> (n=32)</b>	<b>PCR<sup>(2)</sup> (n=36)</b>
Sintomáticos	13 (31,0%)	8 (27,6%)	11 (34,4%)	11 (30,6%)
Oligossintomáticos	24 (57,1%)	19 (65,5%)	17 (53,1%)	21 (58,3%)
Assintomáticos	5 (11,9%)	2 (6,9%)	4 (12,5%)	4 (11,1%)

(1) Número de cães classificados segundo sintomatologia, positivos em pelo menos uma das técnicas diagnósticas utilizadas.

(2) Número de cães positivos em cada uma das técnicas diagnósticas utilizadas.

Dos 50 cães avaliados no município de Campo Grande - MS, somente cinco (11,9%) foram assintomáticos. No entanto, quatro das amostras foram positivas tanto à RIFI como pela PCR; dentre estas uma foi positiva também à hemocultura. Somente uma das amostras foi negativa à RIFI e ao PCR, porém positiva à hemocultura.

Uma característica importante da leishmaniose em cães é esta forma inaparente da doença por longos períodos. Estes animais assintomáticos representam um grande problema na saúde pública, pois são mais difíceis de serem detectados para efetivação das medidas de controle. POZIO et al. (1981) examinaram 171 cães em um inquérito de LVC em Monte Argentario, na Toscana, Itália e encontraram 41% de animais sintomáticos e 59% assintomáticos. A evolução da leishmaniose um ano após o primeiro exame

mostrou que 88% dos cães com sinais clínicos morreram, provavelmente devido à leishmaniose, enquanto 12% permaneceram sintomáticos. A evolução dos casos assintomáticos verificou-se mais complexa: 52% conseguiram aparentemente recuperar-se com o desaparecimento de anticorpos específicos no soro; 12% continuaram positivos na RIFI, mesmo sem sinais clínicos da doença; 18% desenvolveram a doença, manifestando sinais e 18% morreram devido a uma leishmaniose grave.

DANTAS-TORRES et al. (2006) obtiveram resultados positivos na RIFI em 40,3% dos cães estudados (130/322) em área urbana do estado de Pernambuco. Porém, dentre os animais soropositivos, 85,3% não apresentavam sinais clínicos de leishmaniose, ou seja, eram assintomáticos, indicando que a prevalência da infecção nesta área poderia estar subestimada, devido a esta alta proporção.

Os sinais clínicos observados no estudo foram: onicogribose e úlceras de pele (**Figura 8**); alopecia e emagrecimento severo (**Figura 9**); alterações dermatológicas e oculares que induíam secreção mucosa ou muco-purulenta, uveíte e/ou ceratoconjuntivite (**Figura 10**); linfadenomegalia (**Figura 11**); sinais respiratórios, como tosse e secreção nasal purulenta (**Figura 12**). Na literatura, as alterações clínicas mais comuns são: diminuição da atividade física, lesões de pele, perda de peso progressiva (caquexia), sinais de falha renal, epistaxe intermitente ou severa, lesões oculares e distúrbios locomotores (GREENE, 2006).



**FIGURA 8** Cão apresentando úlcera e onicogribose. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.



**FIGURA 9** Cão apresentando alopecia e emagrecimento severo. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande– MS.



**FIGURA 10** Cão apresentando alterações oculares e alterações dermatológicas no focinho e ponta de orelha. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.



**FIGURA 11** Cão com linfadenomegalia (linfonodo poplíteo). Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande– MS.



**FIGURA 12** Cão apresentando secreção nasal purulenta Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande– MS.

A frequência de sinais clínicos observada nos animais oligossintomáticos e sintomáticos correspondeu às alterações dermatológicas, sendo considerado alopecia, úlceras, lesões furfuráceas e descamação, seguido de emagrecimento, linfadenomegalia. e onicogribose. Na **Tabela 10** são apresentadas as frequências de sinais clínicos dos cães positivos e negativos a cada um dos métodos de diagnóstico utilizados.

Resultados semelhantes foram encontrados por MOREIRA et al.(2007), que constataram, nos grupos de animais sintomáticos e oligossintomáticos, uma frequência maior de cães apresentando linfadenomegalia, emagrecimento, alterações dermatológicas e onicogribose. ALBUQUERQUE et al. (2007), avaliando 25 cães naturalmente infectados da região metropolitana de Recife (PE), verificaram maiores prevalências de úlceras cutâneas (80%), linfadenomegalia (56%) e perda de peso (44%).

FEITOSA et al. (2000), avaliando 215 cães naturalmente infectados, da região de Araçatuba-SP, encontraram com maior frequência a linfadenomegalia (81%), seguida de alterações dermatológicas (68%), hiporexia (58%) e onicogribose (51%), assim como SONODA (2007) cujo estudo demonstrou a linfadenomegalia como achado mais freqüente (74%), seguido por pirexia (44,4%), disorexia (40,7%), emagrecimento (29,7%), hepatomegalia (29,7%) e esplenomegalia (25,6%).

**TABELA 10** Estimativa da distribuição dos sinais clínicos segundo diagnóstico par *Leishmania* spp. pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em 50 cães de Campo Grande (MS). Botucatu – SP, 2009.

Exame	Sinais Clínicos	Diagnóstico		P
		Negativo (n=14)	Positivo (n=36)	
PCR	Onicogribose (%)	35,7	30,6	0,726 <sup>(2)</sup>
	Emagrecimento (%)	64,3	77,8	0,329 <sup>(2)</sup>
	Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	50,0	61,1	0,475 <sup>(2)</sup>
	Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	2,8	1,000 <sup>(1)</sup>
	Linfadenomegalia (%)	28,6	41,7	0,522 <sup>(1)</sup>
	Alopecia (%)	14,3	27,8	0,468 <sup>(1)</sup>
	Lesões oculares (%)	7,1	27,8	0,148 <sup>(1)</sup>
	Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	28,6	8,3	0,085 <sup>(1)</sup>
	Quadro assintomático (%)	0,0	11,1	0,566 <sup>(2)</sup>
Hemocultura		(n=21)	(n=29)	
	Onicogribose (%)	38,1	27,6	0,432 <sup>(2)</sup>
	Emagrecimento (%)	66,7	79,3	0,314 <sup>(2)</sup>
	Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	52,4	62,1	0,493 <sup>(2)</sup>
	Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	3,4	1,000 <sup>(1)</sup>
	Linfadenomegalia (%)	28,6	44,8	0,242 <sup>(2)</sup>
	Alopecia (%)	33,3	17,2	0,189 <sup>(2)</sup>
	Lesões oculares (%)	14,3	27,6	0,319 <sup>(1)</sup>
	Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	23,8	6,9	0,115 <sup>(2)</sup>
Quadro assintomático (%)	14,3	3,4	0,297 <sup>(2)</sup>	
RIFI		(n=18)	(n=32)	
	Onicogribose (%)	27,8	34,4	0,631 <sup>(2)</sup>
	Emagrecimento (%)	66,7	78,1	0,375 <sup>(2)</sup>
	Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	38,9	68,8	0,040 <sup>(2)</sup>
	Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	3,1	1,000 <sup>(1)</sup>
	Linfadenomegalia (%)	33,3	40,6	0,610 <sup>(2)</sup>
	Alopecia (%)	11,1	31,3	0,170 <sup>(1)</sup>
	Lesões oculares (%)	11,1	28,1	0,286 <sup>(1)</sup>
	Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	27,8	6,3	0,082 <sup>(1)</sup>
Quadro assintomático (%)	0,0	12,5	0,282 <sup>(1)</sup>	

(1) Teste exato de Fisher;

(2) Teste de Qui-quadrado;

(a) Úlceras, lesões furfuráceas e descamação;

(b) Alterações neurológicas.

Dos 50 gatos avaliados do município de Campo Grande - MS, quatro possuíam lesões de pele (**Figuras 13 e 14**), especialmente na região da cabeça, sendo esta parte do corpo descrita por SIMÕES-MATTOS (2005) como área mais afetada em felinos infectados (74,0%), especialmente a região do nariz (42,0%), seguido de orelhas (24,0%), região ocular (20,0%) e lábios (4,0%).

Além das alterações dermatológicas na região da cabeça, um animal apresentou emagrecimento severo. Dentre estes, dois apresentaram títulos de 40 e 320 pela técnica de RIFI e nos outros testes resultados negativos. Pode se sugerir um possível envolvimento da espécie felina no ciclo epidemiológico da leishmaniose, ainda que nos felinos a forma mais comum da enfermidade seja a cutânea e as manifestações apresentadas sejam inespecíficas e muito semelhantes a outras enfermidades, especialmente as infecções por fungos (histoplasmose, esporotricose e criptococose) e também doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e protozoários (LARUELLEMEGALON e TOGA, 1996; HERVÁS et al., 1999, POLI et al., 2002). É de extrema importância a continuidade das investigações da doença nesta espécie, especialmente em áreas endêmicas e não endêmicas como forma de vigilância epidemiológica.



**FIGURAS 13 e 14.** Dois gatos apresentando alterações dermatológicas na região da cabeça. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.

## 5.4 HEMOCULTURA

A hemocultura surgiu como uma alternativa para melhorar a positividade dos métodos parasitológicos indiretos, porém os dados são variáveis, segundo as condições empregadas. O maior problema é a contaminação por bactérias ou fungos, devido a isso é uma técnica que requer condições assépticas para coleta e manuseio das amostras de sangue, além de possuir algumas outras limitações, como tempo prolongado para o resultado final (quatro meses) (JUNQUEIRA et al., 1996; CHIARI, 1999; DE CARLI, 2001).

Segundo LUZ (1999), alguns cuidados devem ser seguidos para que haja uma maior positividade na técnica de hemocultura como: utilização do meio LIT, separação da capa leucocitária, período de manutenção da cultura até 120 dias e curto lapso de tempo entre a coleta e a inoculação das amostras, além da manipulação mínima das amostras a serem cultivadas.

Consideram-se positivas as hemoculturas quando, na análise por microscopia óptica, observa-se a presença de parasitos flagelados, os quais, mantidos em meio de cultivo Liver Infusion Tryptose (LIT) podem ser caracterizados posteriormente por técnicas bioquímicas e/ou de biologia molecular (AVELAR, 2008). Por sua alta especificidade esta técnica faz com que as culturas positivas apresentem grande valor, sendo importantes para o isolamento e identificação do parasito (CHIARI, 1999; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

Das 50 hemoculturas de cães do município de Campo Grande – MS, 29 (58,0%) foram positivas, porém a confirmação de que se tratava de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* spp. pela técnica da PCR foi verificada em 25 (86,2%) destes cultivos e a sensibilidade da técnica de hemocultura foi de 69,4% (**Tabela 11**). As formas flageladas observadas nas quatro amostras negativas à PCR, assim como nos três cultivos positivos de cães e dois cultivos positivos dos gatos do município de Botucatu – SP que nos testes de RIFI e PCR apresentaram 100% de negatividade, possivelmente tratavam-se de tripanossomatídeos, porém como não era o objetivo deste estudo a confirmação através da PCR específica não foi realizada. A suspeita acima descrita é devido a proximidade filogenética entre estes parasitos por

pertencerem a mesma família (*Trypanosomatidae*), pois além de vários estudos demonstrando a reação cruzada existente em métodos sorológicos, a apresentação morfológica é semelhante em meios de cultivo.

Das 21 hemoculturas negativas de cães do município de Campo Grande-MS, dez (47,6%) apresentaram resultados negativos equivalentes aos obtidos pelo método de PCR, sendo que a técnica de hemocultura apresentou 71,4% de especificidade (**Tabela 11**). Da mesma forma, oito (38,0%) amostras de soro destes animais apresentaram RIFI negativa. A partir do citado sugere-se a ausência do parasito. As duas amostras restantes apresentaram títulos elevados na RIFI, ambos com valores iguais ou superiores a 640 indicando que os cães poderiam estar infectados. Este fato ocorreu provavelmente devido a baixa carga parasitária no momento da coleta.

Onze hemoculturas (22,0%) dos cães de Campo Grande – MS apresentaram-se negativas, porém positivas à PCR para *Leishmania* spp. Isto se deve ao fato da técnica possuir baixa sensibilidade, sendo capaz de gerar resultados negativos ou inconclusivos, especialmente quando a parasitemia é baixa, sendo a visualização dos parasitos por microscopia óptica dificultada.

**TABELA 11** Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo, acurácia e coeficiente Kappa pela técnica de hemocultura em amostras de 50 cães e 50 gatos do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu – SP, 2009.

<b>Animal</b>	<b>(nr/np/nt) (<sup>1</sup>)</b>	<b>Sens<sup>(2)</sup> (%)</b>	<b>Esp<sup>(3)</sup> (%)</b>	<b>Vpp<sup>(4)</sup> (%)</b>	<b>Vpn<sup>(5)</sup> (%)</b>	<b>Ac<sup>(6)</sup> (%)</b>	<b>Kappa<sup>(7)</sup></b>	<b>p<sup>(8)</sup></b>
Cão	(29/36/50)	69,4	71,4	86,2	47,6	70,0	0,35	0,009
Gato	(0/0/50)	---	100,0	---	100,0	---	---	---

(1)nr: Número de resultados positivos pela hemocultura ; np: Número de diagnósticos positivos para *Leishmania* spp. pela técnica de PCR; nt: Total de cães e gatos;

(2)Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos de *Leishmania* spp.);

(3)Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos de *Leishmania* spp.);

(4)Estimativa do valor preditivo positivo (% de diagnósticos positivos pela hemocultura, dado que o diagnóstico foi positivo pela técnica de PCR;

(5)Estimativa do valor preditivo negativo (% de diagnósticos negativos pela hemocultura, dado que o diagnóstico foi negativo pela técnica de PCR;

(6)Estimativa da acurácia (% de diagnósticos corretos pela hemocultura;

(7)Estimativa do coeficiente de concordância kappa;

(8)Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

As amostras dos gatos oriundos de Campo Grande– MS apresentaram 100% de negatividade à hemocultura e PCR, porém com título na RIFI variando entre 40 e 320. Neste caso uma análise criteriosa deve ser realizada, pois acredita-se que a doença nesta espécie vem sendo subdiagnosticada (SIMÕES-MATTOS, 2005).

A investigação epidemiológica para leishmaniose em gatos domésticos de diferentes países, utilizando-se de técnicas parasitológicas, pela detecção da forma amastigota em diferentes tecidos, encontra-se descrita na **Tabela 12**.

**TABELA 12.** Investigação epidemiológica para *Leishmania* spp. em gatos domésticos por métodos parasitológicos em diferentes países de 1912 a 2000\*

País	Técnica/amostra biológica	Positivos/examinados (%)
Argélia	Indefinida/medula óssea	1/1 (100)
Brasil	Citologia/fígado	1/202 (0,5)
	Citologia/fígado	0/142 (0,0)
	Citologia/fígado	0/214 (0,0)
	Citologia <sup>a</sup> /orelha	1/43 (1,9)
Itália	Citologia e histologia/fígado,baço e medula óssea	0/120 (0,0)
Jordânia	Citologia/fígado e baço	16/78(20,5)
Espanha	Indefinida/Indefinida	1/495 (0,2)

<sup>a</sup> Associado a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

\***Adaptado de** SIMÕES-MATTOS et al. (2004a).

No Brasil PASSOS et al. (1996) não obteve sucesso na cultura em NNN de um fragmento de biópsia da lesão em região interdigital de um felino, assim como SAVANI et al. (2004) que, em preparações de fragmentos de fígado e baço inoculados em ágar sangue com infusão cérebro coração, não foram detectados parasitos. Já no estado de Mato Grosso do Sul, SOUZA et al (2005) observaram inúmeras formas promastigotas nos cultivos em meio NNN de aspirados de nódulos localizados na região do nariz, orelhas e região interdigital de um felino.

## **5.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)**

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) vem sendo amplamente utilizada para detectar anticorpos circulantes para *Leishmania* spp. A RIFI é o teste sorológico de confirmação, recomendado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006) e ainda é o método de eleição para ser utilizado em inquéritos epidemiológicos. O surgimento dos anticorpos leva um período variável após o estabelecimento da infecção; entretanto, tornam-se distintamente elevados após o desenvolvimento dos sinais clínicos ou a partir do momento em que é possível o isolamento do parasito. Além disso, uma parcela significativa da população nunca desenvolve altos títulos em resposta à infecção e não se torna clinicamente doente ou transmite o parasito. Caso houvesse uma boa correlação entre títulos de anticorpos e infectividade, a eliminação seletiva de cães removeria de maneira efetiva os animais responsáveis pela transmissão (DYE et al., 1993).

A utilização da PCR em conjunto com a RIFI não somente ajuda a determinar a extensão de infecções subclínicas, como também permite estimar o número de cães que deve ser alvo para medidas de controle da enfermidade, já que a PCR é capaz de detectar infecções subclínicas.

A soroprevalência para leishmaniose nos 50 cães avaliados do CCZ de Campo Grande (MS) foi de 64% (32/50), com títulos de anticorpos variando entre 80 e iguais ou superiores a 640, considerada elevada, quando comparada aos índices de prevalência obtidos em inquéritos epidemiológicos, realizados em outras áreas endêmicas brasileiras. É de extrema importância ressaltar que, apesar das amostras de cães neste trabalho terem sido coletadas aleatoriamente no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, em áreas endêmicas as prevalências dos cães eutanasiados são mais elevadas que as reais prevalências da população canina total, pois a maioria dos animais destinados a estes Centros apresenta suspeita clínica para LV, estão doentes, ou são sorologicamente identificados em inquéritos de massa.

ALBUQUERQUE et al. (2007) também verificaram soropositividade em 64% (16/25), porém utilizando apenas animais sintomáticos do município de

Recife-PE. No mesmo Estado, porém no município de Paulista, também região endêmica para LV, DANTAS-TORRES et al. (2005) avaliaram 322 cães e destes, 130 (40,3%) foram sorologicamente positivos pela técnica de RIFI.

No mesmo Estado brasileiro alvo do estudo, porém em um assentamento agrícola na Serra da Bodoquena, NUNES et al. (2001) observaram soropositividade pela RIFI em 23 (23,7%) de 97 cães examinados.

Em nosso estudo, das 32 amostras positivas à RIFI, 29 (90,6%) também apresentaram positividade à PCR para *Leishmania* spp. e das 18 amostras negativas, 11 (61,1%) foram equivalentes à PCR. A sensibilidade da técnica de RIFI foi de 80,6% e a especificidade de 78,6% (Tabela 13).

**TABELA 13** Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo, acurácia e coeficiente Kappa pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de 50 cães e 50 gatos do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Botucatu – SP, 2009.

Animal	(nr/np/nt) ( <sup>1</sup> )	Sens (%) <sup>(2)</sup>	Esp (%) <sup>(3)</sup>	Vpp (%) <sup>(4)</sup>	Vpn (%) <sup>(5)</sup>	Ac (%) <sup>(6)</sup>	Kappa <sup>(7)</sup>	p <sup>(8)</sup>
Cão	(32/36/50)	80,6	78,6	90,6	61,1	80,0	0,54	<0,01
Gato	(15/0/50)	---	70,0	---	100,0	---	---	---

(1) nr: Número de resultados positivos para *Leishmania* spp. pela RIFI ; np: Número de diagnósticos positivos para *Leishmania* spp. pela técnica de PCR; nt: Total de cães e gatos

(2) Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos de *Leishmania* spp.);

(3) Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos de *Leishmania* spp.);

(4) Estimativa do valor preditivo positivo (% de diagnósticos positivos para *Leishmania* spp. pela RIFI, dado que o diagnóstico foi positivo pela técnica de PCR;

(5) Estimativa do valor preditivo negativo (% de diagnósticos negativos para *Leishmania* spp. pela RIFI, dado que o diagnóstico foi negativo pela técnica de PCR;

(6) Estimativa da acurácia (% de diagnósticos corretos pela RIFI;

(7) Estimativa do coeficiente de concordância kappa;

(8) Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa.

Apesar do Ministério da Saúde preconizar a eutanásia de animais positivos à RIFI, em nosso estudo dois cães apresentaram títulos baixos (80), podendo representar reações cruzadas com outros patógenos filogeneticamente semelhantes à *Leishmania* spp., enquanto que os outros 30 apresentaram títulos mais elevados, que normalmente indicam infecção. Todavia, estes dois reagiram positivamente à PCR gênero-específica, sugerindo que títulos baixos também estejam relacionados com infecção.

Apenas três amostras de cães de Campo Grande - MS foram negativas à PCR e positivas à RIFI. Esta diferença detectada entre os resultados de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares, pode ser devida a alguns fatores, como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasito, baixa quantidade de *Leishmania* spp. circulante no momento da coleta e conseqüentemente não detectado na PCR, e ainda algumas reações cruzadas da sorologia que podem dever-se à existência de determinantes antigênicos e de proteínas comuns a parasitos como *Trypanosoma cruzi*. O uso de sangue periférico para detecção molecular de *Leishmania* spp. apresenta a vantagem de ser um processo de coleta fácil, menos invasivo, mas que pode resultar em menor sensibilidade do teste devido a baixa parasitemia dos animais infectados (FISA et al., 2001).

A infecção em cães por *Leishmania* spp. de Campo Grande - MS à RIFI foi menor quando comparada à PCR, que apresentou 72,0% de positividade, sendo que sete cães foram não reagentes a RIFI, porém positivos à PCR. A imunodeficiência de alguns cães ou a existência de animais cujo sistema imune consegue debelar a infecção e o parasito permanecer inerte no organismo podem ter contribuído para esses resultados. LACHAUD et al. (2002) compararam a PCR com a sorologia e obtiveram prevalência da infecção canina de 79,8% pela PCR e 29,6% pela sorologia e demonstraram que os antígenos oriundos de cinetoplasto foram mais sensíveis, principalmente o K13A-K13B e o RV1-RV2, detectando  $10^{-3}$  parasitas por mililitro de sangue. Os iniciadores provenientes do cinetoplasto provaram ser mais adaptados, porque foram capazes de detectar os parasitos em 100% dos cães soropositivos. A sorologia mostrou-se ineficiente na detecção da LVC em grande porcentagem dos casos com sinais clínicos, enquanto que a PCR detectou *Leishmania* spp. em casos assintomáticos e sintomáticos.

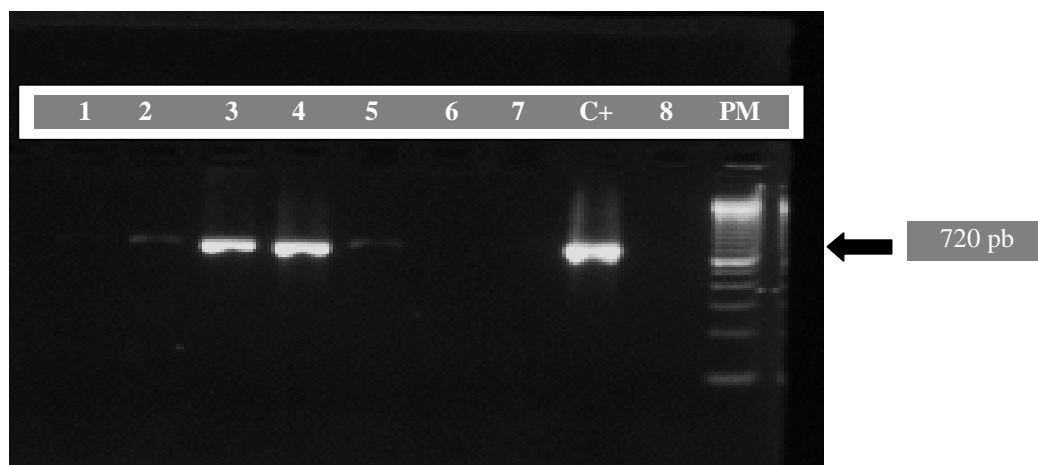
LEONTIDES et al. (2002), estudaram 73 cães saudáveis provenientes de área endêmica da Grécia, utilizando RIFI e PCR em soro e medula óssea. Na PCR foram obtidas 46 (63%) amostras positivas, enquanto que na RIFI foram obtidas apenas nove (12,3%), demonstrando claramente que a maioria dos cães provenientes de áreas endêmicas tornam-se infectados, porém permanecem soronegativos. A partir desta diferença também detectada por

REALE et al. (1999) fizeram com que os autores concluíssem que dados sorológicos de animais utilizados isoladamente não levam a resultados seguros no diagnóstico da LV e que a utilização da PCR ajuda a identificar os casos reais de infecção por *Leishmania* spp.

Um aspecto importante, que provavelmente está associado com o insucesso do controle da LV, refere-se a utilização apenas de técnicas sorológicas para seleção de cães a serem eutanasiados, já que estas possuem baixa sensibilidade e especificidade, acarretando taxas de infecções subestimadas (falsos negativos), permitindo assim a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas e conseqüentemente interferindo no impacto que a eliminação de cães produz no controle da LV (DA SILVA et al., 2005; ANDRADE et al., 2006).

Pode-se concluir pelo descrito acima que, associando técnicas sorológicas e moleculares, um maior número de animais infectados podem ser detectados e conseqüentemente eliminados, contribuindo para o controle da enfermidade. Por outro lado, muitos animais podem ser poupados com a análise criteriosa dos seus resultados e utilização de mais de uma técnica.

Após a realização dos procedimentos para a avaliação do limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela PCR (**Anexo 5**), verificou-se à eletroforese a presença de bandas com 720pb, 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 LIN R4 e LIN19, foi de 10 parasitos/mL. A **Figura 15** ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores LIN19 e LINR4, descritos por IKONOMOPOULOS et al. (2003).



**FIGURA 15** Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir das hemoculturas de cães do município de Campo Grande (MS). Amostras amplificadas utilizando-se os iniciadores LIN 19 e LIN R4. Gel de agarose 2%.

**Legenda:** pb – pares de bases; PM – peso molecular; C+ - controle positivo (*L. major*); 2, 3, 4 e 5 – amostras positivas; 1 e 6 – amostras negativas; 7- controle negativo da extração (água miliQ); 8 – controle negativo da PCR (MIX-PCR).

Em Campo Grande (MS), das 50 amostras de gatos, 15 (30%) foram positivas à RIFI, com títulos variando de 40 a 320. Positividade semelhante foi encontrada em pesquisa realizada por MARTINS et al. (2008), observandose que pelo método sorológico de ELISA em 112 amostras de soro de felinos provenientes do CCZ de Araçatuba (SP), município também endêmico para leishmaniose, verificaram 27,6% de positividade. DA SILVA et al. (2008) utilizando a RIFI para examinar oito amostras de soros de gatos, obtiveram duas amostras (25%) positivas para LV, com títulos de 40 e 320. Na Espanha, MARTÍN-SANCHEZ et al. (2007) encontraram soropositividade de 60%, na análise de 183 soros. Já em estudo realizado na Itália, POLI et al. (2002) identificaram apenas uma amostra (0,9%) positiva de 110 analisadas pelo método de RIFI.

A sorologia de gatos infectados geralmente é menos específica que em cães, pois a produção de anticorpos para *Leishmania* spp. é menor, podendo permanecer soronegativos. Inquéritos sorológicos realizados por diferentes técnicas, demonstraram que a prevalência de anticorpos para *Leishmania* spp. nos gatos examinados ao redor do mundo variou de zero a 68,0%. Esta soroprevalência felina pode variar sensivelmente de acordo com a metodologia

utilizada (amostragem, técnica sorológica e ponto de corte adotado) e da região geográfica onde foi realizado o estudo (POLI et al., 2002).

Acredita-se que a infecção por *Leishmania* spp., com ou sem sintomas clínicos, está sendo sub-diagnosticada nos países onde a enfermidade é endêmica. Isto justificaria a discrepância verificada entre as altas taxas de infecção obtidas em estudos epidemiológicos e o baixo número de casos clínicos descritos em todo mundo (**Tabela 14**). Talvez esta baixa quantidade de casos relatados seja devido aos poucos inquéritos sorológicos em áreas endêmicas, às dificuldades em distinguir a LF de outras doenças comuns em felinos e muitos dos casos serem apenas diagnosticados somente quando os animais tornam-se sintomáticos (DA SILVA et al., 2008).

**TABELA 14** Relatos de caso e porcentagens de soroprevalência da leishmaniose felina (LF) em diferentes países de 1940 a 2008\*

País	Ano e tipo do registro	% Soroprevalência	
<b>França</b>	1992, inquérito sorológico <sup>b</sup>	0,6	
	1993, inquérito sorológico <sup>a</sup>	12,7	
	1998, um relato de caso		
	1999, inquérito sorológico <sup>a</sup>	12,4	
	2004, dois relatos de caso		
	2005, um relato de caso		
<b>Itália</b>	1998, inquérito sorológico <sup>b</sup>	59,0	
	1999, dois relatos de caso		
	2002, inquérito sorológico <sup>b</sup>	68,0	
	2002, um relato de caso		
	2002, dois relatos de caso		
	2002, inquérito sorológico <sup>b</sup>	0,9	
	2004, três relatos de caso		
2004, quatro relatos de caso			
2005, inquérito sorológico <sup>b</sup>	16,3		
<b>Portugal</b>	1994, um relato de caso		
<b>Espanha</b>	1999, um relato de caso		
	2000, inquérito sorológico <sup>c</sup>	1,7	
	2002, inquérito sorológico <sup>e</sup>	42,0	
	2005, um relato de caso		
	2007, inquérito sorológico <sup>b</sup>	60,0	
<b>Suíça</b>	2005, dois relatos de caso		
<b>Egito</b>	1982, inquérito sorológico <sup>d</sup>	3,7	
	1988, inquérito sorológico <sup>d</sup>	3,6	
	1994, inquérito sorológico <sup>d</sup>	3,3	
<b>EUA</b>	1986, um relato de caso		
	2004, inquérito sorológico <sup>e</sup>	42,0	
<b>Brasil</b>	Pará	1940, um relato de caso	
	Bahia	1996, inquérito sorológico <sup>b</sup>	0,0
	Minas Gerais	1996, um relato de caso	
	Fortaleza	2001, inquérito sorológico <sup>c</sup>	10,7
	Fortaleza	2001, inquérito sorológico <sup>c</sup>	13,0
	Rio de Janeiro	2002, inquérito sorológico <sup>b</sup>	50,5
	Rio de Janeiro	2004, dois relatos de caso	
	Rio de Janeiro	2007, inquérito sorológico <sup>b</sup>	25,0
	São Paulo	2004, um relato de caso	
	Mato Grosso do Sul	2005, um relato de caso	
São Paulo	2008, um relato de caso		

**Técnica empregada:** <sup>a</sup> Western Blot, <sup>b</sup> imunofluorescência indireta (RIFI), <sup>c</sup> ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), <sup>d</sup> hemaglutinação indireta, <sup>e</sup> aglutinação direta

\*Adaptado de DANTAS-TORRES et al. (2006); MAROLI et al. (2007).

As 50 amostras de soro de cães e as 50 amostras de soro dos gatos provenientes de Botucatu – SP foram 100% negativas à RIFI, resultados que LANGONI et al. (2001) também obtiveram, utilizando a mesma técnica diagnóstica em 781 soros de cães nesta localidade. Este 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, visando evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão (BRASIL, 2006).

*CONCLUSÕES*

## 6. CONCLUSÕES

- ✍ Não houve ocorrência de *Leishmania* spp. nas amostras de cães e gatos procedentes de Botucatu (SP).
- ✍ A ocorrência de positividade aos testes diagnósticos para *Leishmania* spp. nas amostras de cães procedentes de Campo Grande (MS) foi elevada em relação aos gatos do mesmo município.
- ✍ A positividade apenas pela técnica de hemocultura em cães e gatos de Botucatu (SP) reforçou a importância da associação de técnicas para confirmação do diagnóstico de leishmaniose.
- ✍ A técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em cães de Campo Grande (MS) demonstrou maior acurácia em relação à hemocultura, considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro, bem como apresentou melhor sensibilidade e especificidade.
- ✍ Um número maior de cães infectados de Campo Grande (MS) foi identificado com a utilização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), melhorando e contribuindo na identificação de animais reservatórios e, conseqüentemente, na vigilância e controle da leishmaniose.
- ✍ A positividade dos gatos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em Campo Grande (MS) sugere um possível envolvimento da espécie felina no ciclo epidemiológico da leishmaniose, sendo de grande importância a continuidade de investigações da doença nesta espécie.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

AGUIAR, P.H.P.; SANTOS, S.O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D.V.V.; COSTA, R.L.G., JULIÃO, F.S.; SANTOS, W.L.C., BARROUIN-MELO, S.M. Quadro clínico de cães infectados por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.**, v.8, p.283-294, 2007.

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. **Clínica Veterinária**, n.71, p.78-80, 2007.

ALENCAR, J.E. Expansão do calazar no Brasil. **Ceará Médica**, v.5, n.4, p.86-102, 1983.

ALVES W.A. ; BEVILACQUA P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública** n. 20, p.259-256, 2004.

ANDRADE FILHO, J.D.; SILVA, A.C.L.; FALCÃO, A.L. Phlebotomine sand flies in the state of Piauí, Brazil (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** n.96, p.1085-1087, 2001.

---

<sup>1</sup>ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Informação e documentação – Referências – Elaboração*: NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS preview database*. Philadelphia, 1996. 468p.

ANDRADE, H. M.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.231-238, 2006.

ARANSAY, A. M.; SCOUULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within Naturally infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p.1933-1938, 2000.

AVELAR, J.B. **Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas.** 2008. 69p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R. CERF B.J.; SAMPAIO, D., CARVALHO E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA R.; JOHNSON, Jr W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.4, p.639-649, 1986.

BARATA, R. A.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; FORTES-DIAS, C.L.; SILVA, J.C.; PAULA, E.V.; PRATA, A.; MONTEIRO, E.M.; DIAS, E.S. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, na área of American Visceral Leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.99; p.481-487, 2004.

BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOCHI, M.C.A.; CONCEIÇÃO, N.F.; SILVA, P.C.T.; SILVA, V.L. Vaccination and experimental infection of cats (*Felis domesticus*) with *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 83, p.159, 1988.

BEJARANO, E.E.; URIBE, S.; ROJAS W.; VELEZ, I.D. Plebotomine sanflies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis

---

in the city of Sincelejo, Colômbia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 645-647, 2002.

BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDILVA, O.; TORREALBA, J.; GARCIA, M.T.; GAROFA, M.M.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Revista Científica – Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 6, n. 3, p. 187-190, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.8, p.227-234, 1966.

CAMPO GRANDE NEWS, 2009. Mortes por leishmaniose aumentaram em 3,5 vezes em 2008. Disponível em: <http://www.campogrande.news.com.br/canais/view/?canal=8&id=246590>  
Acesso em 12 de fevereiro de 2009.

CHAGAS, E.; CHAGAS A.W. Notas sobre epidemiologia da leishmaniose visceral americana no Mato Grosso. **O Hospital**, v. 13, p. 471-480, 1938.

CHAGAS, E.; FERREIRA, L.C.; DEANE, G.; DEANE, L.; GUIMARÃES, F.N. Leishmaniose visceral americana. II. Aspectos epidemiológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 33, p. 138-206, 1938.

CHIARI, E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.299-300, 1999.

CORREIO DO ESTADO, 2008. Leishmaniose já fez 16 vítimas desde o início do ano. Disponível em <http://www.correiodoestado.com.br>. Acesso em 21 de fevereiro de 2008.

COURTENAY, O.; QUINELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1314-1320, 2002.

DA SILVA, A. V. M.; CÂNDIDO, C. D. S.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. The first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.105 p. 92-94, 2008.

DA SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A.; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21 (1), p. 324-328, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S.P. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no município de Paulista, Pernambuco, Brasil. In: XXVI Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, 2005, Salvador. **Anais...**Salvador, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATOS, L.; BRITO, F.L.C.; FIGGUEREDO, L.A.; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose Felina: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, ano XI, n. 61, p.32-39, 2006.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico de Parasitoses Humanas**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ, 2001,810p,

DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 10, p. 431-450, 1958.

DEGRAVE W.; FERNANDES O.; THIEMANN O.; WINCKER P.; BRITO C.; CARDOSO A.; PEREIRA J.B.; BOZZA M.; LOPES U.; BOREL, C. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the Polimerase Chain Reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.367-368, 1994.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology & Infection**, v. 103, p.647-656, 1993.

FEITOSA, M.M. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente infectados. In: FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, I, Jaboticabal, SP, 2006. **Anais...** Jaboticabal, p.8-13, 2006.

FEITOSA, M.M., IKEDA, F.A., LUVIZOTTO, M.C.R., PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba-São Paulo (Brasil). **Revista Clínica Veterinária** v.28, p.36-42, 2000.

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

---

FISA, R.; RIEIRA, C.; GÁLLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v.99, n.2, p. 105-111, 2001.

GIMENO ONDOVILLA, A. Contribución a la epidemiología del kala-azar. **Tropical Disease Bulletin**. v. 30, p. 752, 1933.

GIORDANO, A. Le chat dans la transmission de la leishmaniose viscérale de la méditerranée. **Bulletin Sezione Italiana de la Societe Internazionale de Microbiologie**. v. 5, p. 300-332, 1933.

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 for canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 234-241, 2006.

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

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Canadá: Saunders/Elsevier, 2006, 1387p.

HARITH A.E., KOLK A.H.J., KAGER P.A., LEEUWENBURG J., FABERFJ., MUIGAI R., KIUGU S., LAARMAN J.J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81 p. 603-606, 1987.

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

IKEDA-GARCIA, F. A.; MARCONDES M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, ano XII, n. 71, p.34-42, 2007.

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, 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 **Veterinary Parasitology**, v.113, p.99-103, 2003.

JOHNSON, R.N.; NGUMBI, P.M.; MWANYUMBA, J.P.; ROBERTS, C.R. Host feeding preference of *Phlebotomus guggisbergi*, a vector of *Leishmania tropica* in Kenya. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 7, n. 3, p. 213-218, 1993.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of Northeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90 p. 129-132, 1996.

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

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.210-215, 2002.

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 country of Botucatu, SP, Brazil. **ARS Veterinária**, v.17, p.196-200, 2001.

LAURELLE-MAGALON, C.; TOGA, I. Un cas de leishmaniose feline. **Pratique Médicale Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v. 31, p. 255-261, 1996.

LAVERAN, A. Infections du cobaye, du lapin et du chat par la *Leishmania infantum*. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**. v. 6, p. 110-114, 1913.

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

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. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 11, n.4, p.492-509, 2005.

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

LUZ, Z.M.F. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 295-298, 1999.

MACHADO, J. G. **Comparação do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral Canina entre laboratórios de Belo Horizonte, 2003-2004**. 2004.

48p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MACIANTI, F., MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and count-immunoelectrophoresis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p.1409-1411, 1988.

MARECHAL, M. **La leishmaniose féline: cas sporadique ou réalité encore ignorée? (étude dans la région Marseillaise)**. 1993. 68 p. Tese (Doutorado) – Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.

MARGONARI C.; FREITAS, C.R; RIBEIRO, R.C.; MOURA, A.C.M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A.H.; PESSANHA, J.E., DIAS, E.S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.101, p.31-38, 2006.

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

MARTINS, A.O.; ROSSI, C.N.; MARCONDES, M.; NETO, L.S.; LIMA, V.M.F. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em *Felis catus* na área endêmica de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia** ,v.15, n.2, supl.1, ago., p.56, 2008.

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

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI K.B.E. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging Anthroozoonosis and Possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, p. 359-375, 1994.

MEDRONHO, A.R., BLOCH, K.V., LUIZ, R.R., WERNECH, G.L. **Epidemiologia**, Ed. Atheneu, 2 Ed., São Paulo, Brasil, 2009, 685p.

MIGONE, L.E. Um caso de kala-zar à Assuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société Pathologie Exotique** v. 6, p. 118-120, 1913.

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

MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF A CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona (Sitges), Spain,. p. 46-53, 1999.

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

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology** v.145, p.245-252, 2007.

NASCIMENTO, M.D.S.B. **Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luis, Maranhão-Brasil: análise da dinâmica de transmissão e dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença**. 1996. 171f.

Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, SP, 1996.

NOÉ, P. Infecção por *Leishmania* spp. em gatos (*Felis domesticus*) na cidade de Campo Grande, MS, Brasil/Noé Perla. Campo Grande, MS, 61f, 2008.

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

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B.; ZINEZZI, R.O.; SAVANI, E.S.M.M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M.C.G.O.; 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.3, p.301-302, 2001.

NUNES, V. L. B.; YAMAMOTO, Y. Y.; REGO, Jr F.A.; DORVAL M.E.C., GALATI, E.A.B.; OSHIRO, E.T.; RODRIGUES M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, p. 17-21, 1988.

OLIVEIRA, A.C. Um caso de leishmaniose visceral americana. **O Hospital**, v. 13, p.465-70, 1938.

PASSOS, V.M.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19-20, 1996.

---

PENNISI, M.G. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla. **Proceedings...** Sevilla: Intervet, p. 39-48, 2002.

PENNISI, M.G.; MASUCCI, M.; CATARSINI, O. Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in FIV+ gatti che vivono in zona endemic area. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**. v. 52, p. 265-266, 1998.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 181-191, 2002.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B., SHIKANAY-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista Saúde Pública** v.37, n.1, p. 107-115, 2003.

POZIO, E.; GRANDONI, L.; BETTINI, S. & GRANICIA, M. — Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine Leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropica**, v.38, p. 383-93, 1981.

REALE, S.; MAXIA, V.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2931-2935, 1999.

REGO Jr F.A.; NUNES, V.L.B.; PEREIRA, M.J.S.; CAVALHEIROS, M.E.M.; SILVA R.P.; BARROS E. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães do município de Corumbá – MS. In: Resumos do VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, São Paulo, p.2, 1983.

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. 176p. Tese

---

(Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SÁNCHEZ, M.A.; HERVÁS, H.; CHACÓN, F.; GÓMEZ, J.C.; LUICENTES, J.; CASTRILLO, J.; PÉREZ, R.; PASCUAL, F. Evaluación del gato común (*Felis catus domesticus*) como reservorio de la leishmaniose en la cuenca mediterránea. **Pequeños animales**. v. 24, p. 46-54, 2000.

SAVANI, E.S.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M.C.; DE CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; DOS SANTOS, M.G.; D'AURIA, S.R.; SHAW, J.J.; FLOETERWINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 229-233, 2004.

SCHUBACH, T.M.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; MADEIRA, M.F.; SANTOS, I.B.; ANDRADE, M.V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M.C.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165-167, 2004.

SERGENT ED. ET; LOMBARD, J.; QUILICHINI, M. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.

SERRANO A. C. M.; NUNES C. M.; DE LIMA V. M. F.; BONELLO F.L.; SAVANI E.S.M. M.; D'AURIA S. R. N.; VASCONCELOS, R. O.; BRESCIANI K. D. S. Primeiro relato de leishmaniose em felino da região endêmica de Araçatuba, SP. **Clínica Veterinária**, n. 76, p. 36-40, 2008.

SILVA, F. M. O.; SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO; C.L.B.; FRUTUOSO, M.S.; BASTOS, K. M.S.; COELHO, I.C.B.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.; POMPEU, M. M. L. Leishmaniose felina experimental. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p.237, 2004.

SILVA. E.A., ANDREOTTI, R.; HONER, M.R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p. 420-425, 2007.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M. J., COSTA, D. C., PRATA-JR., J. R.C. ; BEVILAQUA, C.M.L., SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Veterinary Parasitology**. v. 103, p. 207-216, 2002.

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

SIMÕES-MATTOS, L.; SILVA, F. M. O.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M.R.F.; MACEDO, I.T.F.; SOUZA, P.T.; MONTEIRO; C.L.B.; DE SOUZA, R. N.; COELHO, I.C.B.; POMPEU, M. M. L.; LIMA, J.W. O. Gatos domésticos como reservatórios da *Leishmania brasiliensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, p.237, 2004b.

SIMÕES-MATTOS, L. **O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (viannia) brasiliensis*** 2005. 233p. Tese (Doutorado)– Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.;BEVILAQUA, C.M.L.; PRATA-JÚNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.;BASTOS, K.M.S.; COELHO, Z.C.B.; COELHO, I.C.B.; BARRAL, A.;

POMPEU, M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 199-208, 2005.

SINAN, Prefeitura Municipal de Campo Grande. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. **Serviço de Vigilância Epidemiológica**. Secretaria Municipal de Saúde, Campo Grande, MS, 2009.

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 2007.115f Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo, SP, 2007.

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

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p.951-958, 2002.

UNDERHILL-DAY, J.C.. A Literature Review of Urban Effects on Lowland Healths and Their Wildlife. **English Nature Res**, p.8, 2005.

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. **Botucatu**. Disponível em: : <http://pt.wikipedia.org/wiki/Botucatu>. Acesso em 12 de março de 2009a.

WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. **Campo Grande**. Disponível em: : [http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo\\_Grande](http://pt.wikipedia.org/wiki/Campo_Grande). Acesso em 12 de março de 2009a.

*ANEXOS*

**Anexo 1** Atestado de aprovação do projeto de pesquisa pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FMVZ - UNESP/Botucatu

## ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa “Hemocultura e reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Leishmania spp* em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para Leishmaniose”, Protocolo nº 65/2007-CEEA do(a) Pós-Graduando(a) **Audrey Rennó Campos Braga**, nível Mestrado 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 abril de 2007.

  
Prof. ASS. DR. RICHIKO SAKATE  
Presidente da CEEA da FMVZ UNESP, Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Av. 15 de Novembro, 1400 – Botucatu, SP – 13061-900  
Distrito de Rubião Jr., 201 – Botucatu, SP – 13061-900  
☎/fax: 14-3811-8105 – e-mail: cee@fmvz.unesp.br – www.fmvz.unesp.br

---

**Anexo 2** Meio líquido Liver Infusion Tryptose (LIT)

Para 250mL:

- 1- Descongelar o soro fetal bovino e calibrar o pHmetro;
- 2- Dissolver em 100mL de água MILI-Q em Kitassato de 500 mL;
  - a. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2 g
  - b. NaCl: 1g
  - c. KCl: 0,1g
- 3- Adicionar mais 44,5 mL de água MILI-Q ao kitassato;
- 4- Montagem do filtro: Colocar a membrana milipore sobre a camada interna do filtro respeitando posição dela no suporte onde está guardada. Colocara a aureola de plástico sobre a membrana. Fechar o filtro com a parte superior e rosquear até encontrar resistência. Acoplar ao kitassato, cobrir com papel alumínio de modo que nenhuma abertura fique exposta e vedar com papel rosado e fita adesiva.
- 5- Autoclavar, por 15 minutos à 121° C, a suspensão de sais, duas pipetas de 20 mL e oito a doze tubos de LIT (30 X 2,6 cm);
- 6- Em outro erlenmeyer de 250 mL , dissolver 0,75g de infusão de fígado, em 100 mL de água MILI-Q aquecida (30 segundos no microondas). Esta água aquecida deve estar a uma temperatura que o dorso da mão suporte;
- 7- Adicionar a esta suspensão:
  - a. Dextrose: 0,5g
  - b. Tryptose: 1,25g e ajustar o pH 7,4;
- 8- Quando a temperatura do kitassato diminuir de modo que o dorso da mão suporte, pode-se abrir, cuidadosamente, a parte superior do kitassato. Deve-se acoplar a mangueira da bomba de vácuo na extremidade lateral do kitassato, para auxiliar no processo de filtração do líquido. Além disso, deve-se envolver o local onde a mangueira de bomba de vácuo e a extremidade lateral do kitassato se unem, com um algodão embebido de álcool-iodado;
- 9- Ligar a bomba de vácuo, a uma pressão de 200-300 mmHg;

- 10- Filtrar a suspensão de infusão de fígado e carboidratos;
- 11- Após a filtração da suspensão anterior adicionar 5,5 mL de hemoglobina 2,2%;
- 12- Ao término da filtração, deve-se fechar a extremidade superior do filtro e vedar com algodão embebido em álcool-iodado;
- 13- Colocar duas pipetas de 10 mL, dois tubos de BHI (controle de esterilidade), o soro fetal bovino, 8-12 tubos de LIT, duas seringas de 5 mL, duas agulhas 30X7 mm, todos previamente autoclavados, dentro da câmara de fluxo laminar e deixar sob a ação da luz UV por 15 minutos. Deve-se submeter o kitassato e um frasco de Gentamicina (Gentocin® – 20mg ou 40 mg) a ação da luz UV, juntamente com os materiais mencionados acima.
- 14- Após estes 15 minutos, adicionar ao kitassato:
  - a. Soro fetal bovino: 30 mL
  - b. Gentamicina: 20 mg:1mL/40mg:0,5mL
- 15- Homogeneizar bem o meio. Pipetar de 1-2 mL de LIT para o primeiro tubo de BHI, 30 ml em cada tubo de LIT e ao final, 1-2 mL para o segundo tubo de BHI;
- 15- Manter sob controle de esterilidade por 48 horas em estufa 37°C.

---

**Anexo 3** Solução Salina Tamponada (PBS) estéril / pH 7,2

Quantidades de reagentes para 1 litro:

NaCl _____	8,183g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> _____	1,0516g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O _____	0,358g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	0.3105g

Autoclavar quinze minutos a 121 °C.

---

**Anexo 4** Extração de DNA das hemoculturas utilizando o kit comercial Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®)

- ? Pipetar 900 µL de tampão RBC (lysis) em microtubo de 1,5mL, livre de RNAses e DNAses.
- ? Adicionar 300 µL da amostra
- ? Homogeneizar por inversão dos tubos.
- ? Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- ? Centrifugar à 12.000 rpm por 20 segundos ou 1000 rpm por dois segundos.
- ? Remover o sobrenadante.
- ? Deixar cerca de 50 µL e adicionar 20 µL de proteinase K
- ? Homogeneizar os tubos em vórtex rapidamente.
- ? Adicionar 500 µL de tampão extração (lysis buffer – “extraction solution”) para suspender as células brancas e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.
- ? Permanecer em temperatura ambiente por 10 minutos.
- ? Colocar coluna no tubo coletor.
- ? Pré-aquecer à 70°C o “elution buffer”.
- ? Transferir o incubado para coluna.
- ? Centrifugar à 8.000 rpm por dois minutos ou 1200 rpm por um minuto.
- ? Descartar o sobrenadante e voltar o tubo coletor a coluna GFX.
- ? Adicionar 500 µL de “wash solution” à coluna GFX.
- ? Centrifugar à 12500 rpm por três minutos.
- ? Desprezar tubo coletor e colocar coluna GFX em microtubo de 1,5mL livre de RNAses e DNAses.
- ? Adicionar 200 µL de “elution buffer” à 70°C diretamente na matriz coluna GFX.
- ? Permanecer um minuto à temperatura ambiente.
- ? Centrifugar à 12000 rpm por um minuto.
- ? Estocar à -20°C.

**Anexo 5** Limiar de Detecção da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Foi utilizada a amostra de *Leishmania chagasi* proveniente de repique em meio de cultura LIT e NNN, utilizada na rotina do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP Botucatu – SP. Foram pipetados 5 ml de meio LIT com formas promastigotas viáveis de dois diferentes tubos de cultura em tubo Falcon de 15 ml. O tubo permaneceu 15 minutos em banho maria a 56 oC para que as promastigotas permanecessem imóveis durante o procedimento de contagem. A amostra foi homogeneizada e parte dela utilizada para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Foram procedidas seis contagens de cinco dos quadrantes menores, de maneira bem distribuída por toda câmara. A média obtida nos cinco quadrantes foi de 127 formas promastigotas. Para obtenção do número de parasitos por mL de meio de cultura foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de promastigotas contadas} / 0,1 \text{ mm}^3 \cdot 1. 0,2 = n^{\circ} \text{ promastigotas/mL}$$

Sendo: 0,1 a altura da câmara de Neubauer

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

0,2 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, realizou-se regra de três para obtenção do volume de meio de cultura que possui 1000 formas promastigotas ( $10^3$ ):

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} \text{ -----} 6.350 \\ X \text{ mL} \text{ -----} 1.000 \end{array} \quad x = 0,1575 \text{ ml ou } \mathbf{157,5 \mu\text{L}}$$

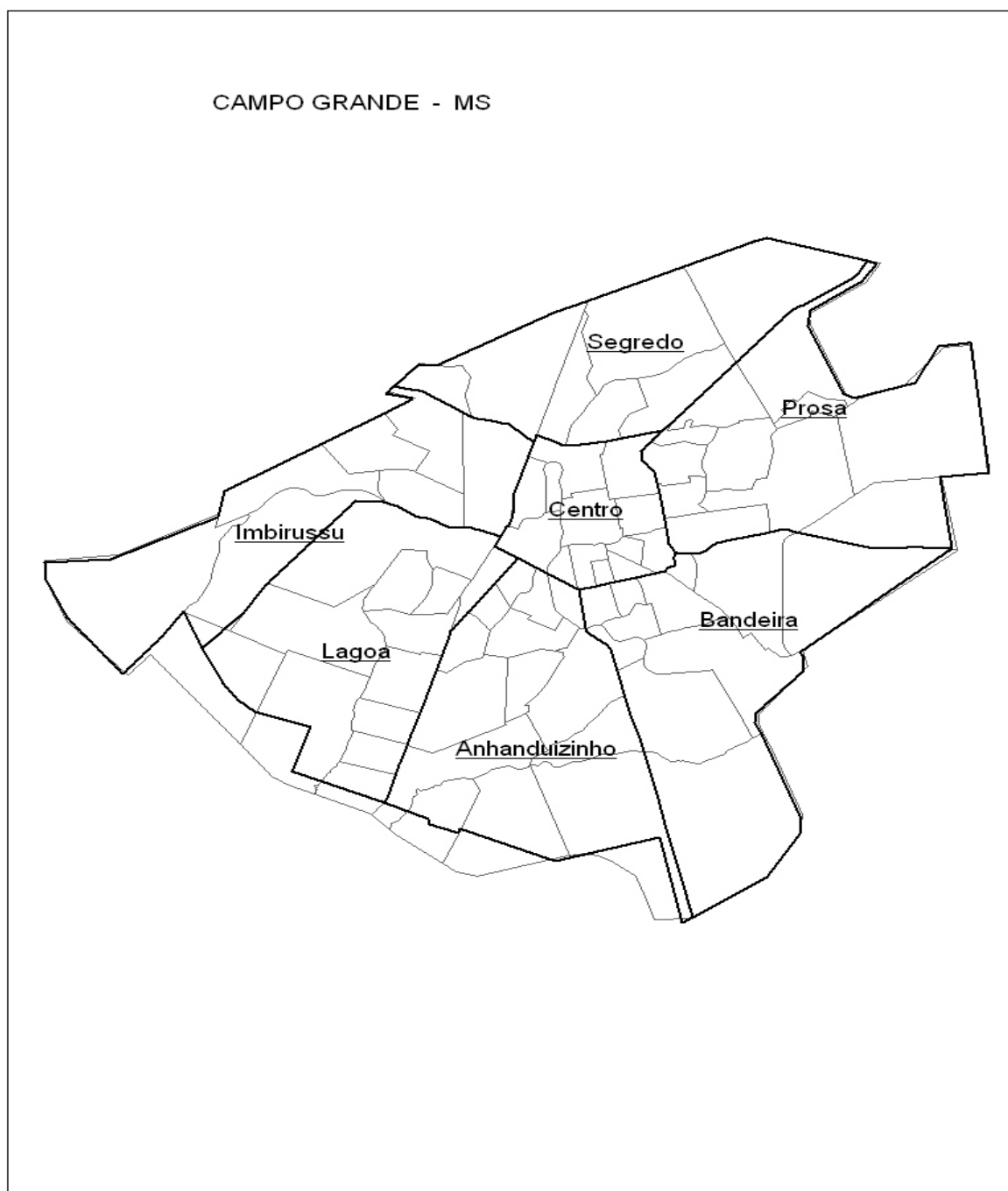
Em seguida, utilizou-se 157,5  $\mu\text{L}$  de meio de cultura em 842,5  $\mu\text{L}$  de água destilada totalizando 1 mL de amostra, ou seja,  $10^3$  parasitos por ml de solução.

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.

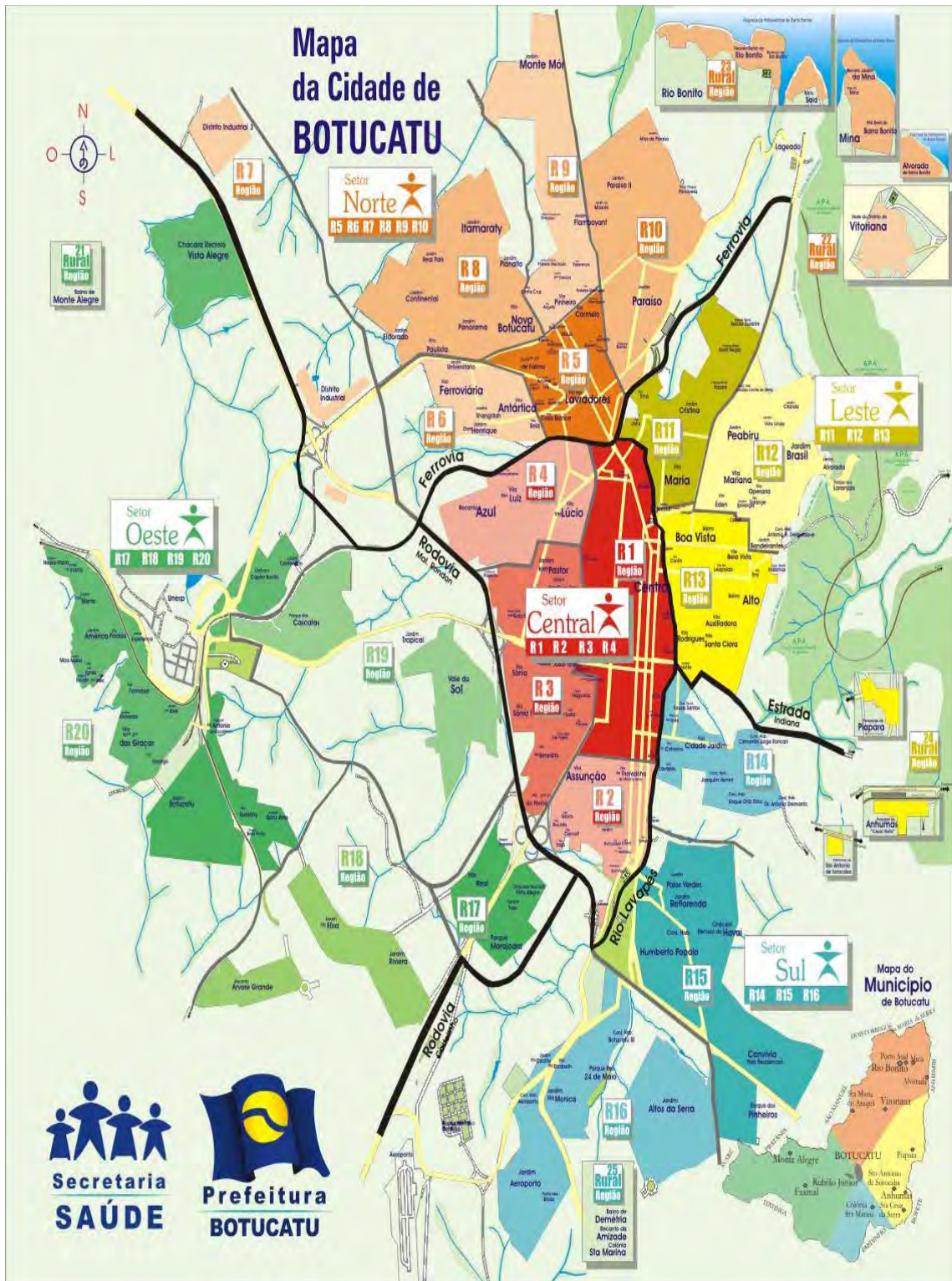
As soluções resultantes foram utilizadas para extração do DNA, utilizando o mesmo protocolo de extração das amostras. O DNA extraído foi amplificado com os iniciadores LIN R4 e LIN 19, para que se pudesse obter a concentração mínima de parasitos por mL de amostra detectável nas provas.

**Anexo 6** Mapa do município de Campo Grande (MS) dividido por regiões.



**FONTE:** Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande (MS).

Anexo 7 Mapa do município de Botucatu (SP) dividido por setores.



FONTE: [www.botucatu.sp.gov.br](http://www.botucatu.sp.gov.br)

*APÉNDICES*

## APÊNDICE 1

Número de identificação dos 50 cães de Botucatu (SP), sexo, sinais clínicos, procedência e resultados de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a leptospirose (2009).

Número	Sexo		Sinais clínicos								Assintomático	Procedência	H	
	Projeto	M	F	O	E	AD	Pn	L	A	Oc				Ou
1		X		X						X	X		Vila Paulista	
2			X		X					X	X		Jd. Aeroporto	
3			X	X							X		Cohab-2	
4			X	X	X						X		Cohab-2	
5			X	X	X					X			Jd. Monte- Mor	
6			X									X	Jd. Eldorado	
7	X			X						X	X		Vitoriana	
8			X									X	Alto do Paraíso	
9	X											X	Convívio	
10			X									X	Conchas	
11	X			X							X		24 de maio	
12			X								X		Cohab-4	
13	X										X		Cohab-4	
14	X			X							X		Jd. Riviera	
15	X			X							X		Desconhecida	
16	X											X	Santa Eliza	
17	X											X	Jd. Serra Negra	
18	X											X	Comerciários	
19			X									X	Vila Rodrigues	
20			X									X	Pq. Pinheiros	
21	X									X			Pq. Pinheiros	
22	X			X				X	X				Eldorado	
23			X	X				X			X		Chacara Recreio do Havaí	
24			X		X								Mariana	

25		X									X	Jd. Sta Monica		X
26		X			X							Palos Verdes		X
27		X		X				X	X	X		Horta comunitária		X
28		X						X		X		Horta comunitária		X
29	X			X				X		X		Cohab - 6		X
30	X			X	X					X		Cohab - 2		X
31		X		X	X					X		Cohab-6		X
32		X	X	X								Jd. Aeroporto		X
33	X										X	Cohab-1		X
34		X						X		X		Comerciários 3		X
35	X										X	V, Aparecida		X
36	X			X								Sta cecília		X
37		X						X		X		Cohab-6		X
38		X									X	Marajoara		X
39	X									X		Cecap		X
40	X			X						X		Vila Mariana		X
41		X		X						X		Reflorenda		X
42		X			X							Cohab I		X
43		X									X	Jardim Eldorado		X
44		X										Vila dos Lavradores		X
45	X											Reflorenda		X
46	X									X		Jardim Paraíso II		X
47		X		X								Reflorenda		X
48		X									X	Demétria		X
49	X										X	Jd. Cedro		X
50	X										X	Jd. Riviera		X
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>27</b>	<b>1</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>17</b>		<b>3</b>	<b>47</b>

**Legenda:** O-onicogrifose; E- emagrecimento, AD – alterações dermatológicas; Pn- pneumonia ou sinais respiratórios; lesões oculares, Ou- outras alterações. P – resultados positivos, N – resultados negativos.

## APÊNDICE 2

Número de identificação dos 50 gatos de Botucatu (SP), sexo, sinais clínicos, procedência hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase Botucatu, SP (2009).

Número Projeto	Sexo		Sinais clínicos								Assintomático	Procedência	Hemocultura	
	M	F	O	E	AD	Pn	L	A	Oc	Ou			P	N
1		X									X	Cohab 1		X
2	X										X	V. Antartica		X
3	X	X									X	Marajoara		X
4		X									X	Cohab 6		X
5		X									X	Demétria		X
6		X									X	Demétria		X
7		X									X	APA		X
8	X											APA		X
9	X										X	APA		
10		X									X	APA		X
11	X										X	APA		X
12		X									X	APA		X
13		X									X	APA		X
14	X										X	APA		X
15		X									X	APA		X
16		X									X	APA		X
17	X										X	APA		X
18		X									X	APA		X
19	X										X	APA		X
20	X										X	APA		X
21		X									X	APA		X
22		X									X	APA		X
23		X									X	APA		X
24	X										X	APA		X

25	X											X	APA		X
26		X										X	APA		X
27	X											X	APA		X
28		X										X	APA		X
29		X										X	APA		X
30	X											X	APA		X
31	X											X	APA		X
32		X										X	APA		X
33		X										X	APA		X
34		X										X	APA		X
35	X											X	APA		X
36	X											X	APA		X
37		X										X	APA		X
38		X										X	APA		X
39		X										X	APA		X
40	X											X	APA		X
41		X										X	APA		X
42	X											X	APA		X
43		X										X	APA		X
44		X										X	APA		X
45		X										X	APA		X
46		X										X	APA		X
47		X										X	APA	X	X
48		X										X	APA		X
49		X										X	APA	X	X
50		X										X	APA		X
<b>TOTAL</b>	18	32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	49		2	48

**Legenda:** O-onicogrifose; E- emagrecimento, AD – alterações dermatológicas; Pn- pneumonia ou sinais respiratórios; lesões oculares, Ou- outras alterações. P – resultados positivos, N – resultados negativos.

### APÊNDICE 3

Número de identificação dos 50 cães de Campo Grande (MS), sexo, sinais clínicos, procedência, hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) para o vírus da raiva em Botucatu, SP (2009).

Número Projeto	Sexo		Sinais clínicos								Assintomático	Procedência	Hemocultura		
	M	F	O	E	AD	Pn	L	A	Oc	Ou			P		
1	X		X	X							X		Santo Antônio		
2	X		X	X				X			X		Campo Novo		
3	X			X									Morada do Sossego		
4		X		X	X				X				Campo Belo	X	
5	X			X							X		Rita Vieira	X	
6	X		X	X	X			X		X			Novo Amazonas	X	
7		X						X					Aparecida Pedrossian		
8	X				X								Izabel Garde		
9		X			X				X				Santo Amaro		
10	X			X	X				X				Indu Brasil		
11		X										X	Santos Dumont		
12	X				X								Nova Lima	X	
13		X	X	X	X			X	X		X		Paulo C. Machado		
14	X			X									Desconhecido	X	
15	X			X						X			Portal Caiobá		
16	X			X	X								Dom Antônio		
17	X		X								X		Parque do Sol		
18	X											X	Dom Antônio		
19		X	X	X	X			X	X	X			Rancho Alegre	X	
20		X			X								Jd. Leblon	X	
21	X		X	X	X			X		X			Canguru	X	
22		X										X	Santa Carmélia	X	
23		X			X				X	X			Colibrim	X	
24		X		X	X			X		X			Marcos Roberto	X	

25	X				X		X						Monte Castelo	X
26		X	X	X			X						Monte Castelo	X
27		X		X			X						Taquarussu	X
28		X	X	X	X			X					Chácara Estancia Abreu	
29	X			X	X		X						Popular	X
30		X	X	X									Nova Lima	X
31		X									X		Hortências	
32	X												São Jorge da Lagoa	X
33	X			X	X			X	X				Cabreúva	X
34		X		X	X					X			Centro	X
35	X			X	X		X	X	X				Popular	
36		X	X	X	X								Manuel Taveira	
37	X			X	X	X							Anaí	X
38		X	X	X			X		X				Caiçara	X
39	X			X	X				X				Centro	X
40		X		X			X						Oliveira II	X
41		X		X	X								Vila Sobrinho	X
42	X			X	X			X					Desconhecido	
43	X		X	X	X		X						Santa Emília	X
44		X	X	X	X		X	X					Santa Luzia	X
45	X		X	X	X		X						Roselândia	
46		X		X									Vila Romana	X
47	X			X					X				Vila Kelly	
48	X			X	X		X						Santa Mônica	X
49	X		X	X	X		X	X					Vila Dede	
50	X			X									Popular	X
TOTAL	28	22	16	37	29	1	19	12	11	7	4			29

**Legenda:** O- onicogribose; E- emagrecimento, AD – alterações dermatológicas; Pn- pneumonia ou sinais respiratórios; L- linfocitos oculares, Ou- outras alterações. P – resultados positivos, N – resultados negativos; (80), (160), (320) e (640) – titulação

## APÊNDICE 4

Número de identificação dos 50 gatos de Campo Grande (MS), sexo, sinais clínicos, procedênc hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimera: Botucatu, SP (2009).

Número	Sexo		Sinais cínicos								Assintomático	Procedência	Hem P	
	Projeto	M	F	O	E	AD	Pn	L	A	Oc				Ou
1		X										1	Vila Carvalho	
2		X										1	Vila Carvalho	
3			X									1	Los Angeles	
4			X									1	Tiradentes	
5			X			X							Desconhecida	
6		X			X	X							Desconhecida	
7		X										1	Desconhecida	
8			X			X							Desconhecida	
9			X			X							Flamboyant	
10			X									1	Universitário II	
11			X									1	Aero Rancho	
12			X									1	Novo Maranhão	
13			X									1	Taquarussu	
14			X									1	Jockey Club	
15			X									1	Nova Bandeirantes	
16			X									1	Nova Bandeirantes	
17			X									1	Taquarussu	
18			X									1	Iracy Coelho	
19		X										1	Jd. Botafogo	
20			X									1	Coophavila II	
21			X									1	Guanandi	
22			X									1	Santa Luzia	
23			X									1	Coophavila II	
24		X										1	Santo Amaro	

25	X										X	Carandá Bosque	
26	X										X	Santo Amaro	
27		X									X	Cidade Morena	
28		X									X	Vial Nha Nha	
29		X									X	Taveiropolis	
30		X									X	São Lourenço	
31		X									X	Caranda Bosque	
32		X									X	Otavio Pecora	
33		X									X	Aero Rancho	
34		X									X	Centro	
35		X									X	Vila Jacy	
36		X									X	Cidade Morena	
37	X										X	Três Barras	
38		X									X	Guanandi	
39		X									X	Pioneiros	
40		X									X	Pioneiros	
41		X									X	Piratininga	
42		X									X	Via Nasser	
43		X									X	Botafogo	
44		X									X	Buriti	
45		X									X	Coopavila 1	
46		X									X	Coopavila1	
47		X									X	Sto Eugenio	
48		X									X	Jd. Antartica	
49		X									X	Santa Branca	
50		x									X	Taveirópolis	
TOTAL	9	41	0	1	4	0	0	0	0	0	46		0

**Legenda:** O-onicogribose; E- emagrecimento, AD – alterações dermatológicas; Pn- pneumonia ou sinais respiratórios; L-linfoad oculares, Ou- outras alterações. P – resultados positivos, N – resultados negativos; (40) (80), (160) e (320) – titulação p

*TRABALHO CIENTÍFICO*

*NORMAS  
PARA PUBLICAÇÃO*



## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- ? Objetivo e política editorial
- ? Apresentação de manuscritos

**ISSN 0100-736X**

**versión impresa**

**ISSN 1678-5150**

**versión online**

### Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Apesar de não serem aceitas comunicações ("Short communications") sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve porém conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Os trabalhos, em 3 vias, escritos em português ou inglês, devem ser enviados, junto com disquete de arquivos (de preferência em Word 7.0), ao editor da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**, no endereço abaixo. Devem constituir-se de resultados ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, os

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

editores, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias.

### **Apresentação de manuscritos**

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título**, **Abstract**, **Resumo**, **Introdução**, **Material e Métodos**, **Resultados**, **Discussão**, **Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos** e **Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, **Resumo** e **Abstract** trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917,

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

a em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

---

© 2009 *Colégio Brasileiro de Patologia Animal*  
Embrapa-CNPAB/PSA  
Km 47 - Seropédica  
23851-970 Rio de Janeiro RJ Brasil  
Tel.: +55 21 2682-2940



[colegio@cbpa.org.br](mailto:colegio@cbpa.org.br)

- 1 **TRABALHO CIENTÍFICO** (será encaminhado para a Revista
- 2 Pesquisa Veterinária Brasileira).
- 3

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: [audreybraga@hotmail.com](mailto:audreybraga@hotmail.com)

4 **Hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em**  
5 **Cadeia pela Polimerase para *Leishmania* spp. em cães e gatos**  
6 **provenientes de área endêmica e não endêmica pa ra leishmaniose<sup>1</sup>.**

7 Audrey Rennó Campos Braga<sup>2</sup>, Simone Baldini Lucheis<sup>3</sup>, Hélio Langoni<sup>2</sup>

8

9 **ABSTRACT:** BRAGA, A.R.C.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H., 2009.  
10 [Leishmaniosis is a zoonosis caused by protozoans of *Leishmania* genus and is  
11 transmitted by phlebotomine vectors. This study was aimed to evaluate the  
12 occurrence of *Leishmania* spp. in dogs and cats from endemic and non-  
13 endemic areas by three diagnostic tests: hemoculture in LIT (Liver Infusion  
14 Tryptose) media, Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Polymerase  
15 Chain Reaction (PCR). Fifty blood samples of dogs and fifty of cats from  
16 Zoonosis Control Center from Campo Grande, MS, an endemic area for canine  
17 visceral leishmaniasis (CVL), were collected randomly, as well as blood  
18 samples of dogs and cats from Municipal Kennel and Animal Protection  
19 Association (APA) from Botucatu, SP, considered by the moment as free-  
20 transmission, non-endemic area for the disease. From 50 hemocultures of the  
21 dogs from Botucatu, three (6%) were positive and of the blood of 50 cats,

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

two (4%) were positive. In Campo Grande, 29 hemocultures (58%) were positive for dogs and 100% of the cats were negative for this test. For the PCR detection of *Leishmania* spp., 100% of the samples from dogs and cats from Botucatu and all the cats from Campo Grande were negative. On the other hand, 36 dogs from Campo Grande were positive (72%) for the PCR. From Botucatu, by the IFAT, 100% of the dogs and cats were non reagent and 32 dogs (64%) and 15 cats (30%) from Campo Grande (MS) were positive for this test. The presented results show that a continuous epidemiological vigilance is important in non-endemic areas for leishmaniasis, as well as the research for an accurate diagnosis in endemic areas, and other studies based on the role of felines in epidemiological life cycle of this disease].

INDEX TERMS: Dog; Diagnosis; Cat; *Leishmania* spp.

**RESUMO:** A leishmaniose é uma zoonose, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por vetores flebotomíneos. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães e gatos provenientes de área endêmica e não endêmica para esta doença, através da associação de três técnicas diagnósticas: hemocultura em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. Foram coletadas aleatoriamente 50 amostras de sangue de cães e 50 amostras de sangue de

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

gatos, procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande - MS, onde a leishmaniose visceral canina (LVC) é endêmica, e aleatoriamente de 50 cães e 50 gatos do Canil Municipal e Associação de Proteção aos Animais (APA) de Botucatu - SP, considerada, até o momento, área não endêmica, silenciosa para esta enfermidade. Das 50 hemoculturas de cães procedentes de Botucatu, três (6%) foram positivas e das 50 hemoculturas dos gatos, duas (4%) foram positivas. Em Campo Grande, 29 hemoculturas (58%) de cães foram positivas e as dos gatos apresentaram 100% de negatividade. Quanto à PCR, 100% das amostras de cães e de gatos procedentes de Botucatu, assim como as dos gatos de Campo Grande foram negativas. Das 50 amostras de cães deste município, 36 foram positivas (72%) à PCR. À RIFI obteve-se 100% de negatividade nas amostras dos cães e gatos de Botucatu e 32 cães (64%) e 15 gatos (30%) de Campo Grande foram reagentes. Pelos resultados apresentados, podemos concluir que a contínua vigilância epidemiológica é importante em áreas não endêmicas para leishmaniose, bem como a busca de um diagnóstico seguro em áreas endêmicas, além de maiores estudos sobre o papel dos felinos no ciclo epidemiológico da doença.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cão; Diagnóstico; Gato; *Leishmania* spp.

## INTRODUÇÃO

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

As leishmanioses são consideradas primariamente como zoonoses, podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, caracterizando-se como antropozoonose. Em geral, apresentam clinicamente um caráter multifacetado e afetam o homem, além de várias espécies de animais silvestres e domésticos, em diferentes regiões do globo terrestre.

Com a urbanização da LVC (Leishmaniose Visceral Canina) em áreas metropolitanas e o cão vivendo em contato estreito com humanos atraindo a presença do vetor faz destes animais uma importante fonte de infecção e principal reservatório, sendo, portanto um dos alvos nas estratégias de controle. Nos últimos anos, além da pesquisa em cães, no homem e em outros reservatórios, o gato doméstico tem recebido atenção.

A maior dificuldade encontrada relaciona-se com o diagnóstico da LVC, já que os métodos utilizados para o seu controle são baseados na pesquisa de anticorpos, e estes apresentam limitações. Desta maneira, a identificação dos cães infectados é um ponto chave para interromper a cadeia epidemiológica da doença nos centros urbanos.

A detecção de anticorpos circulantes para *Leishmania* spp. vem sendo utilizada em estudo soropidemiológicos, constituindo-se em ferramenta importante no diagnóstico da LV. As técnicas mais utilizadas e recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são a Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), sendo a

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

primeira de eleição por apresentar vantagens, como fácil execução, rapidez, baixo custo e sensibilidade e especificidade adequadas quando comparada a outros métodos (DANTAS-TORRES et al., 2006; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007).

Exames parasitológicos baseados na demonstração das formas amastigotas do parasito, tanto dentro dos macrófagos como na forma livre, permitindo o diagnóstico definitivo da infecção, podem ser facilmente realizados, sendo os procedimentos corados por Giemsa ou Leishman (SUNDAR & RAI, 2002; SIMÕES-MATTOS; 2005, GREENE, 2006). O isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. por meios de cultura a partir de diversos tecidos, como o sangue no caso das hemoculturas, apesar de trabalhoso também é uma técnica possível.

Dentre os métodos moleculares, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como ferramenta em pesquisas epidemiológicas, bem como para identificação de espécies de *Leishmania* spp., por amplificação seletiva de sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados, e também no vetor (GREENE, 2006; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007).

Para uma melhor acuidade diagnóstica da LV faz-se necessário o uso de uma combinação de técnicas, uma vez que não está disponível um método que isoladamente reúna todas as características consideráveis desejáveis para o

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

diagnóstico, tais como: fácil execução, custo acessível, rapidez e especialmente sensibilidade e especificidade altas. Recomenda-se que o diagnóstico desta doença seja realizado baseando-se na sintomatologia clínica, nas características epidemiológicas da região e nos exames laboratoriais, desta forma contribuindo para o destino correto dos animais verdadeiramente positivos. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães e gatos de uma área endêmica para leishmaniose (Campo Grande – MS) e outra não-endêmica (Botucatu – SP). Para tanto, foi utilizada a associação de três métodos diagnósticos: hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeira pela Polimerase (PCR) à partir das culturas de sangue destes animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

As colheitas de sangue dos cães e gatos foram realizadas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS, no Canil Municipal de Botucatu - SP e na Associação de Proteção aos Animais (APA) do mesmo município, sendo previamente autorizadas pelos médicos veterinários responsáveis por estes locais.

### Local dos procedimentos laboratoriais

Todos os procedimentos laboratoriais a partir das coletas de sangue dos cães e gatos do Canil Municipal e da Associação de Proteção aos Animais

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

(APA) de Botucatu (SP) foram realizados no Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, campus de Botucatu-SP. Para a realização das hemoculturas dos animais provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), as amostras foram processadas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS.

### **Animais**

Os cães e os gatos foram escolhidos aleatoriamente e submetidos a exame clínico individual, antes da coleta do sangue para a hemocultura, registrando-se informações sobre procedência e alterações clínicas. No Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande (MS) foram utilizados 50 gatos (nove machos e 41 fêmeas) encaminhados para castração e 50 cães (28 machos e 22 fêmeas) eutanasiados por diversos motivos, incluindo doentes, indesejados, com sorologia positiva em inquéritos realizados pelo próprio centro, com sintomatologia sugestiva de LV e encontrados nas ruas, sendo a maioria sem raça definida. No Canil Municipal de Botucatu (SP) foram utilizados seis gatos (dois machos e quatro fêmeas) e 44 gatos (16 machos e 28 fêmeas) procedentes da Associação de Proteção aos Animais (APA), encaminhados a estes locais por serem indesejáveis, invasores,

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

doentes ou para doação e 50 cães ( 23 machos e 27 fêmeas) eutanasiados por vários motivos, incluindo doentes, agressores, invasores, indesejáveis e encontrados em via pública. A maioria era sem raça definida, com idades variadas, sendo a maioria adultos jovens.

### **Hemocultura**

Para hemocultura, foram separados três tubos contendo, em cada um, 5mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril .A manipulação das amostras de sangue foi realizada em capela de fluxo laminar, limpa previamente com álcool 70° e mantida sob a ação de luz ultravioleta, no mínimo por 15 minutos. Os tubos estavam estéreis e foram devidamente identificados com a espécie animal, numeração sequencial do projeto, procedência e respectivas frações do sangue cultivadas. Com uma seringa estéril de 1mL, retirou-se a porção plasmática e transferiu-se lentamente para o primeiro tubo. Este procedimento foi repetido para a porção leucocitária (localizada entre o plasma e o sedimento de hemácias), a qual foi transferida para o segundo tubo e, igualmente para o sedimento de hemácias, o qual foi transferido para o terceiro tubo. As culturas foram mantidas em estufa a 28 a 30°C, até quatro meses após a inoculação, quando então foram submetidas ao preparo para a extração do DNA de *Leishmania* spp. **(Figura 1)**.

Em capela de fluxo laminar, após dez dias da inoculação da amostra, realizou-se a primeira leitura, retirando-se cinco µL de cada tubo de cultura

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

inoculado, colocando-se entre lâmina e lamínula, fazendo-se a leitura de pelo menos cinco lâminas por tubo. As culturas foram observadas quinzenalmente, durante quatro meses, sob microscopia óptica no aumento de 1000X, com óleo de imersão. As culturas positivas foram imediatamente processadas para a extração do DNA parasitário, e as culturas negativas, após o término dos quatro meses de acompanhamento das leituras.

Tanto as culturas positivas, quanto as negativas, foram lavadas duas vezes em Solução Salina Tamponada (PBS) estéril, pH 7,2, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos e o sedimento armazenado em microtubos estéreis livres de DNAsas e RNAsas a -20°C, até o momento do uso para extração do DNA.

### **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Para pesquisa de anticorpos para *Leishmania* spp., utilizou-se como antígeno para sensibilização das lâminas de imunofluorescência *Leishmania major*, mantida pelo NUPEZO da FMVZ-UNESP, Botucatu – SP. A técnica e RIFI foi realizada de acordo com CAMARGO (1966). As amostras de soro foram diluídas a partir de 1:40 em PBS pH 7,2, bem como controles positivos e negativos. Foram consideradas positivas as amostras de soros com títulos iguais ou superiores a 40.

### **Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

A extração do DNA das hemoculturas foi realizada utilizando-se kit comercial Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare<sup>®</sup>), conforme instruções recomendadas pelo fabricante.

Cada microtubo de 0,2mL recebeu tampão de PCR 1X (50m Mol KCl, 10mMol de Tris-HCl), 1,5U de Taq-polimerase, 1,5mM de cloreto de magnésio, 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25mM de dNTP, e água ultra pura (MIX-PCR) para completar volume de 40uL. Após foi adicionado 10µL da amostra a ser testada.

As condições de amplificação em termociclador (GeneAmp PCR System 9600) foram seguidas conforme descritas por IKONOMOPOULOS et al. (2003), desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 33 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante um minuto e uma extensão final de 72°C durante sete minutos. Para amplificação dos fragmentos de minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores LINR4 (5' GGGGTTGGTGTAATAAGGG 3') e LIN19 (5' CAGAACGCCCCTACCCG 3'), descritos por IKONOMOPOULOS et al. (2003).

A identificação dos produtos amplificados foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado em tampão de Tris-borato-EDTA (TBE) 1,0 x e corado com brometo de etídeo. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão 100pb e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

## Metodologia de análise estatística

As técnicas diagnósticas utilizadas no estudo foram avaliadas pela estimativa da acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e coeficiente Kappa para concordância entre o diagnóstico obtido entre os testes, utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão-ouro. Para estimar a associação entre sinais clínicos e a positividade à *Leishmania* spp. foram utilizados o teste de quiquadrado e o teste exato de Fischer (MEDRONHO et al., 2009).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Resultados Gerais

Das hemoculturas analisadas de cães procedentes de Botucatu, três (6%) foram positivas e 47 (94%) foram negativas. Já em gatos, duas amostras (4%) foram positivas e 48 (96%) foram negativas. Na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 100% das amostras dos cães e 100% dos gatos foram negativas, assim como na prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. (**Tabela 1**).

Quanto às hemoculturas dos animais de Campo Grande (MS), 29 amostras de cães (58%) foram positivas e 21 (42%) negativas. As amostras dos gatos apresentaram 100% de negatividade à hemocultura, assim como na PCR para *Leishmania* spp. Quanto aos cães 36 amostras (72%) foram positivas e 14 (28%) negativas à PCR para *Leishmania* spp. Na RIFI 32 cães

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

(64%) foram positivos e 18 (36%) negativos. Quinze gatos (30%) apresentaram positividade à RIFI para *Leishmania* spp., enquanto que 35 (70%) foram negativos. **(Tabela 1)**. Os títulos variaram de 80 a 640 em soros dos cães e de 40 a 320 em soros dos gatos.

### **Sinais Clínicos**

Os cães estudados provenientes do Canil Municipal de Botucatu - SP apresentaram determinados sinais clínicos compatíveis com a LV, especialmente emagrecimento e lesões na pele, porém, não foi comprovada a infecção destes pelos testes diagnósticos utilizados. Isto se deve ao fato de que, por tratar-se de animais em sua maioria abandonados pelos proprietários ou capturados nas ruas, as suas condições de saúde eram ruins, além de algumas manifestações clínicas serem comuns a outras doenças. Já os 50 gatos (100%) do mesmo município não apresentaram qualquer sinal clínico de suspeita.

MANCIANTTI et al. (1988) classificaram os cães infectados por *Leishmania infantum* de acordo com a sintomatologia clínica, sendo os sintomáticos os que apresentavam três ou mais sinais, oligossintomáticos aqueles com um a três sinais e assintomáticos aqueles sem nenhum sinal. Em cães sintomáticos, apenas um teste de alta especificidade para diagnóstico de LV geralmente é suficiente; entretanto, torna-se mais complicado em relação a cães assintomáticos e oligossintomáticos. Nesses casos e para fins

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

epidemiológicos, é necessário um teste de elevada sensibilidade (GOMES et al., 2006).

Oito cães do município de Campo Grande - MS apresentaram resultados negativos em todas as técnicas, apesar de apresentarem sinais clínicos estabelecidos neste estudo compatíveis com manifestações mais comuns da doença. Todavia, como elucidado anteriormente, os sinais não são patognomônicos, apresentando-se também em outras afecções caninas. Portanto, pela associação das três provas diagnósticas, pode-se afirmar que esses animais não estavam infectados. Tratavam-se de animais errantes, doentes por outras causas ou indesejáveis pelos proprietários, pelo fato de apresentarem sintomatologia semelhante a LV, tornando -os suspeitos.

Os resultados neste estudo a partir da classificação sintomatológica de cães do município de Campo Grande (MS) foram, em sua maioria oligossintomáticos (57,1%), seguidos por sintomáticos (31,0%) e, por fim, os assintomáticos (11,9%), representados na **Tabela 2**, considerando animais positivos em pelo menos uma das técnicas diagnósticas. Esses resultados são equivalentes aos estudos de SONODA (2007) que, em um grupo de 36 casos caninos de LV, 50% eram oligossintomáticos, 47,2% sintomáticos e 2,8% assintomáticos e de AGUIAR et al. (2007) que, em um total de 61 cães identificados como soropositivos pelo teste de ELISA, 39 (65%) eram oligossintomáticos e 21 (35%) sintomáticos. Já MOREIRA et al. (2007), na região de Araçatuba – SP, avaliando 89 animais naturalmente infectados, 41

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

(46,1%) eram sintomáticos, 25 (28,1%) oligossintomáticos e 23 (25,8%) assintomáticos.

Uma característica importante da leishmaniose em cães é a forma inaparente da doença por longos períodos. Estes animais assintomáticos representam um grande problema na saúde pública, pois são mais difíceis de serem detectados para efetivação das medidas de controle. Dos 50 cães avaliados no município de Campo Grande - MS, somente cinco foram assintomáticos. No entanto, quatro das amostras foram positivas tanto à RIFI como pela PCR; dentre estas uma foi positiva também à hemocultura. Somente uma das amostras foi negativa aos dois primeiros testes, porém positiva à hemocultura.

Os sinais clínicos mais prevalentes observados nos animais oligossintomáticos e sintomáticos foram as alterações dermatológicas, sendo considerado alopecia, úlceras, lesões furfuráceas e descamação, seguido de emagrecimento, linfadenomegalia e onicogribose. Na **Tabela 3** são apresentadas as freqüências de sinais clínicos dos cães positivos e negativos a cada um dos métodos de diagnóstico utilizados.

Resultados semelhantes foram encontrados por MOREIRA et al.(2007), que constataram, nos grupos de animais sintomáticos e oligossintomáticos, uma freqüência maior de cães apresentando linfadenomegalia, emagrecimento, alterações dermatológicas e onicogribose. ALBUQUERQUE et al. (2007), avaliando 25 cães naturalmente infectados da região metropolitana de Recife

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

(PE), verificaram maiores prevalências de úlceras cutâneas (80%), linfadenomegalia (56%) e perda de peso (44%).

Dos 50 gatos avaliados do município de Campo Grande - MS, quatro possuíam lesões de pele, especialmente na região da cabeça (**Figuras 2 e 3**), sendo esta parte do corpo descrita por SIMÕES-MATTOS (2005) como área mais afetada em felinos infectados (74,0%), especialmente a região do nariz (42,0%), seguido de orelhas (24,0%), região ocular (20,0%) e lábios com 4,0%.

Além das alterações dermatológicas na região da cabeça, um animal apresentou emagrecimento severo. Dentre estes, dois apresentaram títulos de 40 e 320 pela técnica de RIFI e nos outros testes resultados negativos. Pode-se sugerir um possível envolvimento da espécie felina no ciclo epidemiológico da leishmaniose, apesar de que nos felinos a forma mais comum da enfermidade é a cutânea e as manifestações apresentadas são inespecíficas e muito semelhantes a outras enfermidades, especialmente nas infecções por fungos (histoplasmose, esporotricose e criptococose) e também nas doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e protozoários (LARUELLE-MEGALON e TOGA, 1996; HERVÁS et al., 1999, POLI et al., 2002). É de extrema importância a continuidade das investigações da doença nesta espécie, especialmente em áreas endêmicas e não endêmicas como forma de vigilância epidemiológica.

## Hemocultura

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

A hemocultura surgiu como uma alternativa para melhorar a positividade dos métodos parasitológicos indiretos, porém os dados são variáveis, segundo as condições empregadas. O maior problema é a contaminação por bactérias ou fungos, devido a isso é uma técnica que requer condições assépticas para coleta e manuseio das amostras de sangue além de possuir algumas outras limitações, como tempo prolongado para o resultado final (quatro meses) (JUNQUEIRA et al., 1996; CHIARI, 1999; DE CARLI, 2001). A hemocultura é um teste parasitológico cuja positividade demonstra a presença do parasita na corrente sangüínea, o qual é visualizado ao microscópio óptico. Esta é uma diferença importante em relação à prova molecular, a PCR, a qual tem capacidade de detectar fragmentos do parasita, não necessitando estar presente inteiro na circulação (LUCHEIS et al., 2005).

Segundo LUZ (1999), alguns cuidados devem ser seguidos para que haja uma maior positividade na técnica de hemocultura como: utilização do meio LIT, separação da capa leucocitária, período de manutenção da cultura até 120 dias e do lapso de tempo entre a coleta e a inoculação das amostras, além da manipulação mínima das amostras a serem cultivadas.

Consideram-se positivas as hemoculturas quando, na análise por microscopia óptica, observava-se a presença de parasitos flagelados, os quais, mantidos em meio de cultivo Liver Infusion Tryptose (LIT) podem ser caracterizados posteriormente por técnicas bioquímicas e/ou de biologia molecular (AVELAR, 2008). Por sua alta especificidade esta técnica faz com

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

que as culturas positivas apresentem um grande valor, sendo importantes para o isolamento e identificação do parasito (CHIARI, 1999; IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007).

Das 50 hemoculturas de cães do município de Campo Grande – MS, 29 (58,0%) foram positivas, porém a confirmação de que se tratava de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* spp. por meio da PCR foi verificada em 25 (86,2%) destes cultivos e a sensibilidade da técnica de hemocultura foi de 69,4% (**Tabela 4**). As formas flageladas observadas nas quatro amostras negativas à PCR, assim como nos três cultivos positivos de cães e dois cultivos positivos dos gatos do município de Botucatu – SP que nos testes de RIFI e PCR apresentaram 100% de negatividade, possivelmente tratavam-se de tripanossomatídeos, porém como não era o objetivo deste estudo a confirmação através da PCR específica não foi realizada. A suspeita acima descrita é devido a proximidade filogenética entre estes parasitos por pertencerem a mesma família (*Trypanosomatidae*), pois além de vários estudos demonstrando a reação cruzada existente em métodos sorológicos, a apresentação morfológica é semelhante em meios de cultivo.

Das 21 hemoculturas negativas destes cães, 10 (47,6%) apresentaram resultados negativos equivalentes aos obtidos pelo método de PCR, sendo que a técnica de hemocultura apresentou 71,4% de especificidade (**Tabela 4**). Da mesma forma, oito (38,0%) amostras de soro destes animais apresentaram RIFI negativa. A partir do citado sugere-se a ausência do parasito. As duas

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

amostras restantes apresentaram títulos elevados na RIFI, ambos com valores iguais ou superiores a 640 indicando que os cães poderiam estar infectados. Este fato ocorreu provavelmente devido a baixa carga parasitária no momento da coleta.

Onze hemoculturas (22,0%) dos cães de Campo Grande – MS apresentaram-se negativas, porém positivas à PCR para *Leishmania* spp. Isto se deve ao fato da técnica possuir baixa sensibilidade, sendo capaz de gerar resultados negativos ou inconclusivos, especialmente quando a parasitemia é baixa, sendo a visualização dos parasitos por microscopia óptica dificultada.

As amostras dos gatos oriundos de Campo Grande – MS apresentaram 100% de negatividade na hemocultura e PCR, porém com título na RIFI variando entre 40 e 320. Neste caso uma análise criteriosa deve ser realizada, pois acredita-se que a doença nesta espécie vem sendo subdiagnosticada (SIMÕES-MATTOS, 2005).

### **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) vem sendo amplamente utilizada para detectar anticorpos circulantes para *Leishmania* spp. A RIFI é o teste sorológico de confirmação, recomendado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006) e ainda é o método de eleição para ser utilizado em inquéritos epidemiológicos. O surgimento dos anticorpos demora um período variável,

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

após o estabelecimento da infecção, entretanto, tornam-se distintamente elevados após o desenvolvimento dos sinais clínicos ou a partir do momento em que é possível o isolamento do parasito. Além disso, uma parcela significativa da população nunca desenvolve altos títulos em resposta à infecção e não se torna clinicamente doente ou transmite o parasito. Caso houvesse uma boa correlação entre títulos de anticorpos e infectividade, a eliminação seletiva de cães removeria de maneira efetiva os animais responsáveis pela transmissão (DYE et al., 1993).

A utilização da PCR em conjunto com a RIFI não somente ajuda a determinar a extensão de infecções subclínicas, como também permite estimar o número de cães que deve ser alvo para medidas de controle da enfermidade, já que a PCR é capaz de detectar infecções subclínicas.

A soroprevalência para leishmaniose nos 50 cães avaliados do CCZ de Campo Grande (MS) foi de 64% (32/50), com títulos de anticorpos variando entre 80 e iguais ou superiores a 640, considerada elevada, quando comparada aos índices de prevalência obtidos em inquéritos epidemiológicos, realizados em outras áreas endêmicas brasileiras. É de extrema importância ressaltar que, apesar das amostras de cães neste trabalho terem sido coletadas aleatoriamente no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, em áreas endêmicas as prevalências dos cães eutanasiados são mais elevadas que as reais prevalências da população canina total, pois a maioria

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

dos animais destinados a estes Centros apresenta suspeita clínica para LV, estão doentes, ou são sorologicamente identificados em inquéritos de massa.

ALBUQUERQUE et al. (2007) também verificaram soropositividade em 64% (16/25), porém utilizando apenas animais sintomáticos do município de Recife-PE. No mesmo Estado, porém no município de Paulista, também região endêmica para LV, DANTAS-TORRES & BRANDÃO FILHO (2005) avaliaram 322 cães e destes, 130 (40,3%) foram sorologicamente positivos pela técnica de RIFI.

Em nosso estudo, das 32 amostras positivas na RIFI, 29 (90,6%) também apresentaram positividade na PCR para *Leishmania* spp. e das 18 amostras negativas, 11 (61,1%) foram equivalentes na PCR. A sensibilidade da técnica de RIFI foi de 80,6% e a especificidade de 78,6% (**Tabela 4**).

Apesar do Ministério da Saúde preconizar a eutanásia de animais positivos à RIFI, em nosso estudo dois cães apresentaram títulos baixos (80), podendo representar reações cruzadas com outros patógenos filogeneticamente semelhantes à *Leishmania* spp., enquanto que os outros 30 apresentaram títulos mais elevados, que normalmente indicam infecção. Todavia, estes dois reagiram positivamente à PCR gênero-específica de hemoculturas, sugerindo que títulos baixos também estejam relacionados com infecção.

Apenas três amostras de cães de Campo Grande - MS foram negativas à PCR e positivas à RIFI. Esta diferença detectada entre os resultados de

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares, pode ser devida a alguns fatores, como a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasito, baixa quantidade de *Leishmania* spp. circulante no momento da coleta e conseqüentemente não detectado na PCR, e ainda algumas reações cruzadas da sorologia que podem dever-se à existência de determinantes antigênicos e de proteínas comuns a parasitos como *Trypanosoma cruzi*.

A infecção em cães por *Leishmania* spp. de Campo Grande - MS à RIFI foi menor quando comparada à PCR, que apresentou 72,0% de positividade, sendo que sete cães foram não reagentes a RIFI, porém positivos à PCR. A imunodeficiência de alguns cães ou a existência de animais cujo sistema imune consegue debelar a infecção e o parasito permanecer inerte no organismo podem ter contribuído para esses resultados. LACHAUD et al. (2002) comparou a PCR com a sorologia e obteve uma prevalência da infecção canina de 79,8% pela PCR e 29,6% pela sorologia e demonstraram que os antígenos oriundos de cinetoplasto foram mais sensíveis, principalmente o K13A -K13B e o RV1-RV2, detectando  $10^{-3}$  parasitas por mililitro de sangue. Os iniciadores provenientes do cinetoplasto provaram ser mais adaptados, porque foram capazes de detectar os parasitos em 100% dos cães soropositivos. A sorologia mostrou-se ineficiente na detecção da LVC em grande porcentagem dos casos com sinais clínicos, enquanto que a PCR detectou *Leishmania* spp. em casos assintomáticos e sintomáticos.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

LEONTIDES et al. (2002), estudaram 73 cães saudáveis provenientes de área endêmica da Grécia, utilizando RIFI e PCR em soro e medula óssea. Na PCR foram obtidas 46 (63%) amostras positivas, enquanto que na RIFI foram obtidas apenas 9 (12,3%), demonstrando claramente que a maioria dos cães provenientes de áreas endêmicas tornam-se infectados, porém permanecem soronegativos.

Um aspecto importante, que provavelmente está associado com o insucesso do controle da LV, refere-se à utilização apenas de técnicas sorológicas para seleção de cães a serem eutanasiados, já que estas possuem baixa sensibilidade e especificidade, acarretando taxas de infecções subestimadas (falsos negativos), permitindo assim a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas e conseqüentemente interferindo no impacto que a eliminação de cães produz no controle da LV (DA SILVA et al., 2005; ANDRADE et al., 2006).

Pode-se concluir pelo descrito acima que associando técnicas sorológicas e moleculares, um maior número de animais infectados pode m ser detectados e conseqüentemente eliminados, contribuindo para o controle da enfermidade. Por outro lado, muitos animais podem ser poupados com a análise criteriosa dos seus resultados e utilização de mais de uma técnica .

Após a realização dos procedimentos para a avaliação do limiar de detecção do DNA de *Leishmania* spp. pela PCR, verificou-se à eletroforese a presença de bandas com 720pb, na amostra pura de cultura, bem como nas

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

diluições  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$ , Não houve presença de banda na diluição  $10^0$ . Com isso, conclui-se que a sensibilidade analítica da PCR, utilizando os iniciadores LIN R4 e LIN19, foi de 10 parasitos/mL. A **Figura 4** ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores LIN19 e LINR4.

Em Campo Grande (MS), das 50 amostras de gatos, 15 (30%) foram positivas à RIFI, com títulos variando de 40 a 320. Positividade semelhante foi encontrada em pesquisa realizada por MARTINS et al. (2008), observando-se que pelo método sorológico de ELISA em 112 amostras de soro de felinos provenientes do CCZ de Araçatuba (SP), município também endêmico para leishmaniose, verificaram 27,6% de positividade. DA SILVA et al. (2008) utilizando a RIFI para examinar oito amostras de soros de gatos, obtiveram duas amostras (25%) positivas para LV, com títulos de 40 e 320. Na Espanha, MARTÍN-SANCHEZ et al.(2007) encontraram soropositividade de 60% , na análise de 183 soros. Já em estudo realizado na Itália, POLI et al. (2002) identificaram apenas uma amostra (0,9%) positiva de 110 analisadas pelo método de RIFI.

A sorologia de gatos infectados geralmente é menos específica que em cães, pois a produção de anticorpos para *Leishmania* spp é menor, podendo permanecer soronegativos (POLI et al., 2002). Em inquéritos sorológicos realizados por diferentes técnicas, demonstrando que a prevalência de anticorpos para *Leishmania* spp. nos gatos examinados ao redor do mundo

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

variou de zero a 68,0%. Esta soroprevalência felina pode variar sensivelmente de acordo com a metodologia utilizada (amostragem, técnica sorológica e ponto de corte adotado) e da região geográfica onde foi realizado o estudo.

Acredita-se que a infecção por *Leishmania* spp., com ou sem sintomas clínicos, está sendo sub-diagnosticada nos países onde a enfermidade é endêmica. Isto justificaria a discrepância verificada entre as altas taxas de infecção obtidas em estudos epidemiológicos e o baixo número de casos clínicos descritos em todo mundo. Talvez esta baixa quantidade de casos relatados seja devido aos poucos inquéritos sorológicos em áreas endêmicas, às dificuldades em distinguir a LF de outras doenças comuns em felinos e muitos dos casos serem apenas diagnosticados somente quando os animais tornam-se sintomáticos (DA SILVA et al., 2008).

As 50 amostras de soro de cães e as 50 dos gatos provenientes de Botucatu – SP foram 100% negativas pela RIFI, resultados que LANGONI et al. (2001), utilizando a mesma técnica diagnóstica obtiveram testando 781 soros de cães nesta localidade. Este 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, visando evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão (BRASIL, 2006).

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

## Conclusões

Não houve ocorrência de *Leishmania* spp. nas amostras dos animais do município de Botucatu (SP). Em Campo Grande (MS) a técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para o diagnóstico de *Leishmania* spp. nos cães demonstrou maior acurácia em relação à hemocultura, considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão -ouro, bem como apresentou melhor sensibilidade e especificidade. Um número maior destes cães infectados foi identificado com a utilização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) melhorando e contribuindo na identificação de animais reservatórios e, conseqüentemente, para o controle da leishmaniose.

A positividade dos gatos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em Campo Grande (MS) sugere um possível envolvimento da espécie felina no ciclo epidemiológico da leishmaniose, sendo de grande importância a continuidade das investigações da doença nesta espécie.

## Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio a pesquisa e às equipes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), Canil Municipal e Associação de Proteção aos Animais (APA) de Botucatu (SP) pela autorização para realização da pesquisa e suporte com os animais.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

## Referências Bibliográficas

AGUIAR, P.H.P.; SANTOS, S.O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D.V.V.; COSTA, R.L.G., JULIÃO, F.S.; SANTOS, W.L.C. & BARROUIN-MELO, S.M. Quadro clínico de cães infectados por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.**, v.8, p.283-294, 2007.

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. **Clínica Veterinária**, n.71, p.78-80, 2007.

ANDRADE, H. M.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J. & ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.231-238, 2006.

AVELAR, J.B. **Caracterização molecular de isolados de *Trypanossoma cruzi* obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas.** 2008.69p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.8, p.227-234, 1966.

CHIARI, E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.299-300, 1999.

DA SILVA, A.V.M.; DE PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A. & CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, 21 (1), p. 324-328, 2005.

DA SILVA, A. V. M.; CÂNDIDO, C. D. S.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P. & CARREIRA, J. C. A. The first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v.105 p. 92-94, 2008.

DANTAS-TORRES, F. & BRANDÃO FILHO, S.P. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no município de Paulista, Pernambuco, Brasil. In: XXVI Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, 2005, Salvador. **Anais...Salvador**, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATOS, L.; BRITO, F.L.C.; FIGUJEREDO, L.A. & FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose Felina: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, ano XI, n. 61, p.32-39, 2006.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico de Parasitoses Humanas**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, RJ, 2001,810p.

DYE, C.; VIDOR, E. & DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology & Infection**, v. 103, p.647-656, 1993.

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 fo canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 234-241, 2006.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Canadá: Sauders/Elsevier, 2006, 1387p.

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

IKEDA-GARCIA, F. A. & MARCONDES M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, ano XII, n. 71, p.34-42, 2007.

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

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.99-103, 2003.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI, E. & WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of North-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** . v.90 p. 129-132, 1996.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.210-215, 2002.

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 country of Botucatu, SP, Brazil. **ARS Veterinária**, v.17, p.196-200, 2001.

LAURELLE-MAGALON, C. & TOGA, I. Un cas de leishmaniose feline. **Pratique Médicale Chirurgicale de l'Animal de Compagnie** , v. 31, p. 255-261, 1996.

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

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

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. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 11, n.4, p.492-509, 2005.

LUZ, Z.M.F. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 295-298, 1999.

MACIANTI, F. & MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and count-immunoelectrophoresis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p.1409-1411, 1988.

MARTINS, A.O.; ROSSI, C.N.; MARCONDES, M.; NETO, L.S. & LIMA, V.M.F. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em *Felis catus* na área endêmica de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.2, supl.1, ago., p.56, 2008.

MARTÍN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C., MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O. & MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology** v.145, p. 267-273, 2007.

MEDRONHO, A.R., BLOCH, K.V., LUIZ, R.R. & WERNECH, G.L. **Epidemiologia**, Ed. Atheneu, 2 Ed., São Paulo, Brasil, 2009, 685p.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618-000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA,J.F.; CORBETT, C.D. & LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs.

**Veterinary Parasitology**, v.145, p.245-252, 2007.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A. & MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy.

**Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 181-191, 2002.

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico - epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.** 2007.115f Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo, SP, 2007.

SUNDAR, S. & RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p.951-958, 2002.

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M.R.F.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA-LIMA, J.W.;BEVILAQUA, C.M.L.; PRATA-JÚNIOR, R.C.; HOLANDA, C.M.; RONDON, F.C.M.;BASTOS, K.M.S.; COÊLHO, Z.C.B.; COÊLHO, I.C.B.; BARRAL, A. & POMPEU,M.M.L. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 199-208, 2005.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**TABELA 1** Estimativa do percentual de animais com diagnóstico positivo para *Leishmania* spp. pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo local e espécie. Botucatu – SP, 2009.

Exame	Local	Espécie	% Relativo <sup>(1)</sup>	IC (95%; %Relativo) <sup>(2)</sup>
PCR	Botucatu-SP	Cão	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
	Campo Grande-MS	Cão	72,0%	(59,0% - 84,0%)
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
Hemocultura	Botucatu-SP	Cão	6,0%	(0,0% - 12,7%)
		Gato	4,0%	(0,0% - 9,5%)
	Campo Grande-MS	Cão	58,0%	(44,0% - 71,9%)
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
RIFI	Botucatu-SP	Cão	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
		Gato	0,0%	--- <sup>(3)</sup>
	Campo Grande-MS	Cão	64,0%	(50,4% - 77,5%)
		Gato	30,0%	(17,0% - 42,9%)

(1) Ao total de 50 animais examinados por espécie e local;

(2) Considerando erro-padrão do estimador da proporção associado ao plano amostral "Amostra Aleatória Simples com reposição" e variância populacional desconhecida;

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

(3) Impossibilidade de estimação devida variabilidade amostral nula.

**TABELA 2** Resultados positivos pela técnica de hemocultura, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em 50 cães do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande (MS), classificados segundo sintomatologia. Botucatu-SP, 2009.

<b>Classificação</b>	<b>Frequência<sup>(1)</sup> (n=42)</b>	<b>Hemocultura <sup>(2)</sup> (n=29)</b>	<b>RIFI <sup>(2)</sup> (n=32)</b>	<b>PCR <sup>(2)</sup> (n=36)</b>
Sintomáticos	13 (31,0%)	8 (27,6%)	11 (34,4%)	11 (30,5%)

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

Oligossintomáticos	24 (57,1%)	19 (65,5%)	17 (53,1%)	21 (58,3%)
Assintomáticos	5 (11,9%)	2 (6,9%)	4 (12,5%)	4 (11,1%)

(3) Número de cães classificados segundo sintomatologia positivos em ao menos uma das técnicas diagnósticas utilizadas.

(4) Número de cães positivos em cada uma das técnicas diagnósticas utilizadas.

**TABELA 3** Estimativa da distribuição dos sinais clínicos segundo diagnóstico par *Leishmania* spp. pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), hemocultura e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em 50 cães de Campo Grande (MS). Botucatu – SP, 2009.

<i>Exame</i>	<i>Sinais Clínicos</i>	<i>Diagnóstico</i>		<i>P</i>
		<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

		(n=14)	(n=36)	
PCR	Onicogrifose (%)	35,7	30,6	0,726 <sup>(2)</sup>
	Emagrecimento (%)	64,3	77,8	0,329 <sup>(2)</sup>
	Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	50,0	61,1	0,475 <sup>(2)</sup>
	Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	2,8	1,000 <sup>(1)</sup>
	Linfadenomegalia (%)	28,6	41,7	0,522 <sup>(1)</sup>
	Alopecia (%)	14,3	27,8	0,468 <sup>(1)</sup>
	Lesões oculares (%)	7,1	27,8	0,148 <sup>(1)</sup>
	Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	28,6	8,3	0,085 <sup>(1)</sup>
Quadro assintomático (%)	0,0	11,1	0,566 <sup>(2)</sup>	
		(n=21)	(n=29)	
Hemocultura	Onicogrifose (%)	38,1	27,6	0,432 <sup>(2)</sup>
	Emagrecimento (%)	66,7	79,3	0,314 <sup>(2)</sup>
	Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	52,4	62,1	0,493 <sup>(2)</sup>
	Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	3,4	1,000 <sup>(1)</sup>
	Linfadenomegalia (%)	28,6	44,8	0,242 <sup>(2)</sup>
	Alopecia (%)	33,3	17,2	0,189 <sup>(2)</sup>
	Lesões oculares (%)	14,3	27,6	0,319 <sup>(1)</sup>
	Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	23,8	6,9	0,115 <sup>(2)</sup>
Quadro assintomático (%)	14,3	3,4	0,297 <sup>(2)</sup>	
		(n=18)	(n=32)	
RIFI	Onicogrifose (%)	27,8	34,4	0,631 <sup>(2)</sup>
	Emagrecimento (%)	66,7	78,1	0,375 <sup>(2)</sup>
	Alterações dermatológicas <sup>(a)</sup> (%)	38,9	68,8	0,040 <sup>(2)</sup>
	Pneumonia ou sinais respiratórios (%)	0,0	3,1	1,000 <sup>(1)</sup>
	Linfadenomegalia (%)	33,3	40,6	0,610 <sup>(2)</sup>
	Alopecia (%)	11,1	31,3	0,170 <sup>(1)</sup>
	Lesões oculares (%)	11,1	28,1	0,286 <sup>(1)</sup>
	Outras alterações <sup>(b)</sup> (%)	27,8	6,3	0,082 <sup>(1)</sup>
Quadro assintomático (%)	0,0	12,5	0,282 <sup>(1)</sup>	

(1) Teste exato de Fisher;

(2) Teste de Qui-quadrado;

(a) Úlceras, lesões furfuráceas e descamação;

(b) Alterações neurológicas.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

**TABELA 4** Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo, acurácia e coeficiente Kappa pela técnica de hemocultura em amostras de 50 cães e 50 gatos de Campo Grande (MS) e 50 cães e 50 gatos de Botucatu (SP), considerando a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) como padrão -ouro. Botucatu – SP, 2009.

Exame teste	Município	Animal	(nr/np/nt) <sup>(1)</sup>	Sens (%) <sup>(2)</sup>	Esp (%) <sup>(3)</sup>	Ac (%) <sup>(4)</sup>	Kappa <sup>(5)</sup>	p <sup>(6)</sup>
Hemocultura	Botucatu/SP	Cão	(3/0/50)	---	94,0	---	---	---
		Gato	(2/0/50)	---	96,0	---	---	---
	Campo Grande/MS	Cão	(29/36/50)	69,4	71,4	70,0	0,35	0,009
		Gato	(0/0/50)	---	100,0	---	---	---
RIFI	Botucatu/SP	Cão	(0/0/50)	---	100,0	---	---	---
		Gato	(0/0/50)	---	100,0	---	---	---
	Campo Grande/MS	Cão	(32/36/50)	80,6	78,6	80,0	0,54	< 0,01
		Gato	(15/0/50)	---	70,0	---	---	---

(1)nr: Número de diagnósticos positivos de Leishmaniose pelo exame teste ; np: Número de diagnósticos positivos para *Leishmania* spp. pelo exame PCR; nt: Total de cães;

(2)Estimativa da sensibilidade (% de verdadeiros positivos de Leishmaniose);

(3)Estimativa de especificidade (% de verdadeiros negativos de Leishmaniose);

(4)Estimativa da acurácia (% de diagnósticos corretos pela hemocultura e RIFI);

(5)Estimativa do coeficiente de concordância kappa;

(6)Nível descritivo associado à estimativa do coeficiente Kappa .

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com



**FIGURA 1** Hemoculturas prontas para serem armazenadas em estufa com temperatura de 28° a 30° C.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com

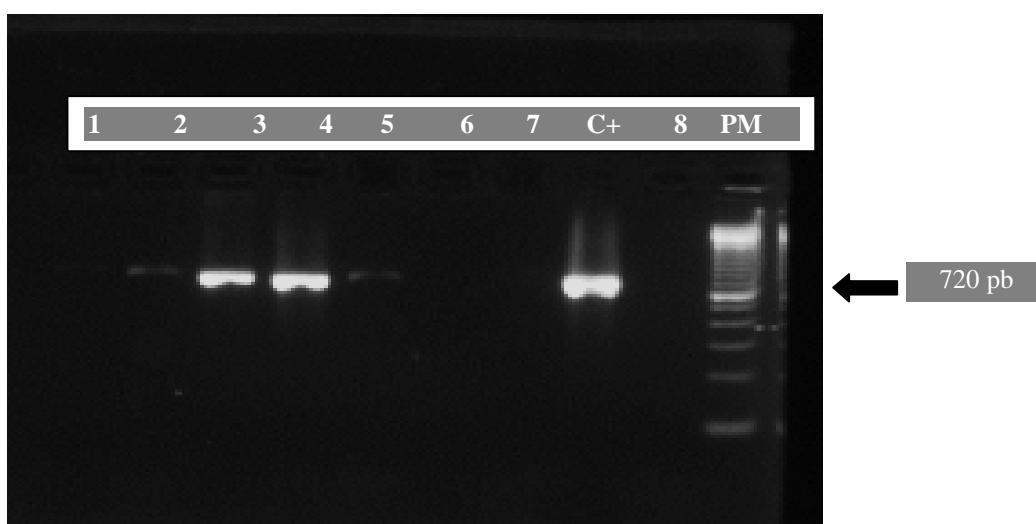


**FIGURAS 2 e 3.** Dois gatos apresentando alterações dermatológicas na região da cabeça. Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande – MS.

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga,** Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com



**FIGURA 4** Produtos da amplificação dos fragmentos de minicírculo do kDNA de *Leishmania* spp., pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a partir das hemoculturas de cães do município de Campo Grande (MS). Amostras amplificadas utilizando -se os iniciadores LIN 19 e LIN R4. Gel de agarose 2%.

**Legenda:** pb – pares de bases; PM – peso molecular; C+ - controle positivo (*L. major*); 2, 3, 4 e 5 – amostras positivas; 1 e 6 – amostras negativas; 7- controle negativo da extração (água miliQ); 8 – controle negativo da PCR (MIX-PCR).

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, 18618.000, C.P. 560, Brasil.

<sup>3</sup> Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA –Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência: Audrey Rennó Campos Braga**, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) UNESP, campus de Botucatu -SP, Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP 18618-000, Caixa Postal 560, Fone/Fax: (14) 3811-6270, R. 24, e-mail: audreybraga@hotmail.com