

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

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SP. EM
CÃES DO MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS, SANTA
CATARINA**

Acácio Duarte Pacheco
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2013

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

**OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SP. EM
CÃES DO MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS, SANTA
CATARINA**

Acácio Duarte Pacheco

Orientadora: Prof^a. Adjunto Mary Marcondes

Co-Orientador: Prof. Adjunto Paulo Cesar Ciarlini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais).

**ARAÇATUBA – SP
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P116o Pacheco, Acácio Duarte.
Ocorrência de Leishmania spp. em cães do município de Florianópolis, Santa Catarina / Acácio Duarte Pacheco. - Araçatuba: [s.n.], 2012
72 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária
Orientadora: Profa. Dra. Mary Marcondes
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Ciarlini

1. Leishmaniose visceral 2. RIFI 3. ELISA 4. PCR
5. Diagnóstico

CDD 636.70896



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Ocorrência de infecção por Leishmania spp. em cães do município de Florianópolis,
Santa Catarina.

AUTOR: ACACIO DUARTE PACHECO

ORIENTADORA: Dra. MARY MARCONDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dr. WAGNER LUIS FERREIRA

Dra. MARCIA DALASTRA LAURENTI

Dra. MARY MARCONDES

DATA DA REALIZAÇÃO: 8 de janeiro de 2013.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. MARY MARCONDES
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ACÁCIO DUARTE PACHECO – Nascido em Florianópolis em 12 de maio de 1985. Iniciou e concluiu o curso de Medicina Veterinária na Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, em Lages, Santa Catarina (2003-2008). Ingressou no programa de residência em Clínica Médica, Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais, com ênfase em Clínica Médica, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo (2009-2011). Iniciou o programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Mestrado), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo (2011).

*“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

*“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e nesse
dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a
Humanidade”*

Leonardo Da Vinci

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Irany e Rozete, que nunca mediram esforços para que meus sonhos pudessem ser realizados.

Aos meus irmãos, Felipe e Bruna, pelo apoio e simplesmente por existirem em minha vida.

Ao meu grande amor, Juliana, por ser tão companheira e confidente. Espero que essa seja a primeira de muitas conquistas juntos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Irany e Rozete, por todo o amor, carinho que me foram dados durante todos estes anos. Toda a vontade de crescer e de me tornar uma pessoa melhor foi em função dos bons exemplos que sempre me foram dados. Nunca mediram esforços para que tudo de melhor acontecesse em minha vida. Não existe uma palavra que possa ser escrita em um papel para descrever o qual grande é o meu amor por vocês. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Felipe e Bruna, muito obrigado por fazerem parte da minha vida. Tenho a certeza que a conquista de cada um deva fazer o outro muito mais feliz. Amos vocês!

Ao meu grande amor, Jú, te amo! Vir para Araçatuba foi uma das melhores coisas que aconteceu em minha vida, principalmente por ter conhecido você. Muito obrigado pelo amor, carinho e amizade. Sem você esse caminho teria sido muito mais árduo. E que essa seja a primeira de muitas conquistas juntos! Te amo!

A minha querida orientadora, professora Mary Marcondes, por aceitar me orientar e pela confiança depositada durante este período. Muito obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência e por ser este exemplo de profissional em que me espelho todos os dias. Se um dia conseguir ser uma parte do profissional que você é, sem dúvida terei alcançado meus objetivos! Muito obrigado!

Aos amigos, residentes e pós-graduandos, Gabriel, Talita, Silmara, Fernando, Tatianna, Juliana Peloi, Camila, Verônica, Maíra e Fernanda Müller que fizeram com que a distância de casa fosse menos dolorosa. Muito obrigado pelo companheirismo, risadas e apoio durante esse período.

Ao professor Wagner, muito obrigado pela orientação durante a residência, e por ser um exemplo de profissionalismo e paciência.

A professora Flávia pela amizade e pelos ensinamentos.

As meninas da Clínica Médica Flávia Volpato e Karina, pelas risadas e companheirismo durante este ano, sem dúvida foi muito bom e divertido trabalhar com vocês.

A Bia pelos ótimos conselhos e pela paciência durante os momentos de estresse.

A todos os funcionários do HV que estiveram presentes durante todo o período de residência e mestrado.

A todos do laboratório de imunologia. Profa. Valéria Lima, Juliana, Larrisa e Mari por me ajudarem durante a realização dos ELISAS. Muito obrigado!

A todos do LIM-50 da USP, especialmente a Profa. Marcia Dalastra e a Thay pelo auxílio durante a realização da RIFI. Sem dúvida na semana em que estive lá pude aprender muitas coisas! Muito obrigado!

A profa. Caris e a Fernanda Muller por auxiliarem durante a realização das extrações e também pelo auxílio durante a PCR.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, por viabilizar a realização do projeto de pesquisa.

A FAPESP pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que participaram deste projeto, direta ou indiretamente.

E por último, porém não menos importante, a Deus por me guiar durante toda esta jornada.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Área de Estudo.....	14
4.2. Animais.....	14
4.3. Delineamento Experimental.....	14
4.4. Colheita das Amostras.....	16
4.5. Pesquisa de anticorpos Anti- <i>Leishmania</i> sp.....	16
4.5.1. Obtenção do antígeno de <i>L. infantum chagasi</i>	16
4.5.2. Técnica de ELISA indireto.....	17
4.5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	18
4.6. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> e anti- <i>Dirofilaria immitis</i>	19
4.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional para pesquisa de DNA de <i>Leishmania</i> spp.	19
4.7.1. Extração de DNA.....	19
4.7.2. PCR Convencional.....	19
4.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real para pesquisa de DNA de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	20
4.8.1. Extração de DNA.....	20
4.8.2. Amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	20
4.9. Análise Estatística.....	21
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICES.....	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Distribuição etária de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de Janeiro e Julho de 2011. Número absoluto e percentagem..... **22**
- Tabela 2-** Distribuição racial de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de Janeiro e Julho de 2011. Número absoluto e percentagem..... **23**
- Tabela 3-** Distribuição, quanto aos distritos administrativos de origem, de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de Janeiro e Julho de 2011. Número absoluto e percentagem..... **24**
- Tabela 4-** Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA indireto, em número absoluto e percentagem, de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados no período de Janeiro e Julho de 2011..... **24**
- Tabela 5-** Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados no período de Janeiro e Julho de 2011..... **24**
- Tabela 6-** Resultados individuais de ELISA e RIFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp., de PCR para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp., e do kit rápido de ELISA (Snap 4Dx®) para pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*D. Immitis*, de 25 animais sororeagentes, provenientes de uma amostragem de 491 cães oriundos do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de Janeiro e Julho de 2011..... **25**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Figura demonstrando os diferentes Distritos Administrativos do município de Florianópolis, Santa Catarina, e o número de amostras avaliadas, para pesquisa de leishmaniose visceral, por distrito. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php..... 15
- Figura 2-** Figura demonstrando a localização dos bairros nos diferentes Distritos Administrativos do município de Florianópolis, Santa Catarina, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes, triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes e triângulo em verde demonstra o bairro onde a infecção pelo parasita foi confirmada por PCR. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php..... 26
- Figura 3-** Figura demonstrando bairros situados no distrito administrativo Sede Continental de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes, triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php..... 27
- Figura 4-** Figura demonstrando bairros situados no distrito administrativo sede insular (direita), de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes, triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes e o triângulo em verde demonstra o bairro onde a infecção pelo parasita foi confirmada por PCR. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php..... 28
- Figura 5-** Figura demonstrado bairros situados nos distritos administrativos da região norte do município de Florianópolis, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes e triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php..... 29
- Figura 6-** Figura demonstrado os bairros dos distritos administrativos da região sul do Município de Florianópolis, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os

bairros onde não havia cães sororeagentes e o triângulo vermelho demonstra bairro onde havia cães sororeagentes.

Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php..... 30

Figura 7- Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. Produtos da amplificação de fragmentos de kDNA de *Leishmania* sp. de 120 pb, através de técnica de PCR, em amostra de cão (C491) proveniente do município de Florianópolis, Santa Catarina. PM = Marcador de peso molecular em escada de 120 pb (Invitrogen®)..... 31

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	Quadro demonstrando a relação dos bairros, agrupados em 13 distritos administrativos, de onde foram colhidas as amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti- <i>L. infantum chagasi</i> em cães do município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.....	46
Apêndice B	Quadro representando os resultados individuais dos exames sorológicos e da PCR dos 491 animais avaliados durante o período de janeiro a junho de 2011, no centro de controle de zoonoses do município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.....	48

OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SP. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA

RESUMO – O presente estudo teve por objetivo pesquisar a ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em 491 cães domiciliados no município de Florianópolis, Santa Catarina, região até então considerada indene para leishmaniose visceral, mas que apresenta notificação de casos autóctones da doença canina no ano de 2011. A soroprevalência na população avaliada foi de 0,4% (2/491) por ELISA indireto e 4,09% (24/491) por RIFI. A concordância entre as técnicas sorológicas foi fraca ($k=0,069$). Somente um cão apresentou sororeatividade em ambos os métodos sorológicos. No mesmo animal foi amplificado o DNA de *Leishmania* sp. no sangue total, por PCR convencional e PCR em Tempo Real. Não foi possível realizar o sequenciamento do material amplificado e, deste modo, determinar a espécie de *Leishmania* envolvida. Os resultados do presente estudo salientam a necessidade de uma investigação epidemiológica minuciosa no município.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, diagnóstico, ELISA, RIFI, PCR

SURVEY FOR *LEISHMANIA* SP. INFECTION IN DOGS FROM FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA.

ABSTRACT -The aim of the present study was to investigate the occurrence of *Leishmania infantum chagasi* infection in 491 dogs living in Florianópolis, Santa Catarina, a region considered non-endemic for visceral leishmaniasis, but with notification of autochthonous of canine cases in 2011. The seroprevalence in this population was 0.4% (2/491) by ELISA and 4.09% (24/491) by IFAT. There was a poor agreement between the serological techniques ($k = 0.069$). Only one dog presented seroreactivity in both serological methods. In the same animal *Leishmania* sp. DNA was amplified from whole a blood sample by conventional PCR and Real-Time PCR. It was not possible to sequence the amplicons and, thereby, to determine the *Leishmania* specie involved. The results of this study highlight the necessity of epidemiological investigation in the county.

Keywords: visceral leishmaniasis, diagnosis, ELISA, IFAT, PCR

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, com distintas formas clínicas na dependência da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro. Em seres humanos apresenta-se sob quatro formas clínicas: visceral, cutânea, mucocutânea e cutânea difusa. Das quatro, a leishmaniose visceral é a mais grave, por ser geralmente fatal quando não tratada.

Até o presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença, o cão é considerada a espécie mais importante, pois há um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral. Como a doença canina normalmente precede a doença em seres humanos, o diagnóstico precoce, com a finalidade de aplicar medidas preventivas adequadas, se faz necessário, principalmente em regiões endêmicas.

Com uma mortalidade global estimada em 59.000 óbitos por ano, a leishmaniose visceral permanece como um importante problema de saúde pública em vários países do mundo. Nas Américas, a doença ocorre desde o México até a Argentina, com cerca de 90% dos casos humanos procedentes do Brasil. A leishmaniose visceral americana (LVA) vem se expandindo gradativamente no Brasil. Enquanto a região nordeste concentravam 92,9% dos casos de LVA em 1999 e a região sudeste apenas 2,6%, em 2006 o quadro se alterou, com 56,2% dos casos concentrados no nordeste e 21% no sudeste.

A região sul do Brasil era considerada indene para leishmaniose visceral até poucos anos atrás. Entretanto, em 2009 o município de São Borja, no Rio Grande do Sul, apresentou um surto de leishmaniose visceral canina com relato de casos também em humanos.

Em função da ocorrência de surtos de leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Sul e do acompanhamento de cães, residentes em Florianópolis – SC, com sintomas sugestivos da doença, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a ocorrência de infecção por *Leishmania infantum chagasi* em uma

população canina atendida no Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Florianópolis, Santa Catarina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose é uma zoonose causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), transmitidas por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (REY, 2001; STRAUSS; BANETH, 2001; WHO, 2001). Considerada com uma das seis principais endemias mundiais, a leishmaniose encontra-se mundialmente distribuída, sendo endêmica em 88 países dos cinco continentes. Estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas e que ocorram dois milhões de novos casos a cada ano. Desse total, 500.000 são casos de leishmaniose visceral, com 90% dos mesmos ocorrendo em países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Iran, Arábia Saudita e Sudão. Anualmente são apontadas em torno de 50.000 mortes pela doença. Os outros um milhão e meio de novos casos estão relacionados à forma tegumentar (BANETH; SOLANO-GALLEGO 2012; DESJEUX, 2004; STRAUSS; BANETH, 2001; WHO, 2001).

As leishmanias do complexo *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* são os agentes causadores da leishmaniose tegumentar. Já os agentes etiológicos da leishmaniose visceral fazem parte complexo *Leishmania donovani*, sendo a *Leishmania (L.) donovani* o agente etiológico encontrado na África e Ásia; *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas. Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças estruturais verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que a *L. chagasi* e a *L. infantum* sejam a mesma espécie, permitindo a denominação *L. infantum chagasi* para o agente etiológico desta enfermidade também nas Américas (MAURICIO et al., 2000; SHAW et al., 2006).

A leishmaniose tegumentar, também conhecida como “úlceras de Bauru”, tem ampla distribuição mundial. O Brasil representa a área endêmica de maior extensão territorial nas Américas, e um dos países com as mais elevadas taxas de notificação da infecção em humanos. É ainda encontrada em todos os estados, constituindo-se, portanto, numa das mais importantes afecções dermatológicas, devido não só à magnitude da doença, como também ao risco de ocorrência de deformidades no homem (BRASIL, 2006).

A leishmaniose visceral caracteriza-se pela forma mais grave da doença, podendo apresentar taxas de mortalidade próximas a 10% em seres humanos, quando não tratada, principalmente em pacientes portadores de doenças imunossupressoras, como o Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (BRASIL, 2006). Mesmo ocorrendo em pacientes de todas as faixas etárias, crianças, até os 10 anos de idade e idosos são os mais comumente acometidos (GONTIJO; MELO, 2004).

No Brasil, a espécie do flebotomíneo normalmente associada com a transmissão da leishmaniose visceral é a *Lutzomyia longipalpis*. Entretanto, no Mato Grosso do Sul a *Lutzomyia cruzi* também já foi relacionada à transmissão da doença. A *Lutzomyia* é um inseto pequeno, medindo em torno de um a três milímetros, facilmente reconhecido pelo seu comportamento de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Apresenta o corpo revestido por pêlos e uma coloração clara (BRASIL, 2006).

Nos últimos anos tem-se observado uma expansão populacional da *Lutzomyia longipalpis* relacionada com a alta capacidade adaptativa do vetor, principalmente a regiões periurbanas. Esse aumento populacional fez com que o número de cidades com presença do mesmo, no Estado de São Paulo, aumentasse de 41 municípios, no ano de 2002, para um total de 79 apenas cinco anos após (BRASIL, 2006; CAMARGO-NEVES, 2007).

A transmissão da LV para o hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea. No momento da sucção as formas infectantes, promastigotas metacíclicas, são liberadas na pele e fagocitadas por macrófagos. Em seguida perdem o flagelo e transformam-se em formas amastigotas. Começam, então, a se multiplicar por divisão binária até causar a ruptura da célula, com posterior infecção de novas células e disseminação do parasito por via hematógena e linfática (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; MELO, 2004). A infecção no flebotomíneo ocorre no momento do repasto sanguíneo, quando as formas amastigotas são ingeridas pelo vetor. No tubo digestório do vetor as formas amastigotas sofrem um processo de diferenciação que, ao final de seis a 10 dias, culmina na formação de formas promastigotas metacíclicas, que irão infectar um novo hospedeiro vertebrado (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; MELO, 2004).

Após penetrar no organismo do hospedeiro, o parasito estimula uma resposta imune na tentativa de controlar a multiplicação do protozoário e, com isso, combater de forma eficaz a infecção. Os macrófagos parasitados agem como células apresentadoras de antígenos, induzindo à formação de uma resposta imune mediada principalmente por linfócitos T (CD4) auxiliares do Tipo 1 (Ta1) ou ainda por linfócitos T auxiliares do Tipo 2 (Ta2) (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; MELO, 2004; STRAUSS; BANETH, 2001). Normalmente ocorre a estimulação dos dois tipos celulares, com predominância de um deles. Quando as células Ta1 são mais estimuladas, desenvolve-se uma resposta imune do tipo celular com produção de IFN- γ , TNF- α e algumas interleucinas, como a IL-2, IL-3 e IL12. Por outro lado, um estímulo predominantemente Ta2 leva ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo humoral, com produção de anticorpos circulantes por linfócitos B. Nesse tipo de resposta, observam-se níveis aumentados das interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 IL-9 e IL-10. O desenvolvimento de uma resposta do tipo Ta2, ou seja, mediado por anticorpos, além de não ter ação protetora ainda agrava o quadro clínico do paciente, por estar associada com a formação e depósito de imunocomplexos nos tecidos (BANETH; SOLANO-GALEGO, 2012; MELO, 2004; STRAUSS; BANETH, 2001).

Até algumas décadas atrás as leishmanioses eram consideradas doenças que acometiam indivíduos vivendo em ambiente silvestre ou em áreas rurais, no entanto, nos últimos anos o quadro vem se modificando. Alterações ambientais levaram a uma adaptação dos vetores ao ambiente urbano e condições higiênico-sanitárias também propiciaram a reprodução do vetor e a introdução dos agentes etiológicos em áreas indenes e grandes centros urbanos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Os fatores relacionados a este fenômeno de urbanização da doença são resultantes das condições epidemiológicas favoráveis, principalmente em função da expansão das favelas com grande densidade populacional que possuem péssimas condições sanitárias, onde indivíduos e cães infectados, provenientes de áreas endêmicas, encontram sua opção de moradia nas grandes cidades. Outros fatores associados a este fenômeno são as mudanças ambientais e climáticas, redução dos investimentos em saúde e educação, falhas nas ações de controle e adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, ocorrendo conseqüentemente a expansão da doença para novas regiões (DUJARDIN et al,

2008; GONTIJO; MELO, 2004; LINDOSO; GOTO, 2006; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Os mamíferos domésticos, silvestres e o homem são os hospedeiros vertebrados mais comumente associados com a manutenção da doença no ambiente doméstico. Apesar da ampla quantidade de espécies afetadas, o cão é a espécie mais comumente relacionada com a manutenção do agente no ambiente, possuindo uma maior relevância epidemiológica, principalmente quando se leva em consideração que taxas de prevalência na espécie podem chegar até 40% em regiões endêmicas para LV, precedendo ainda a incidência no ser humano, que costuma ser de 2 a 4% (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; BRASIL, 2003; FEITOSA, 2000; GONTIJO; MELO, 2004; MELO, 2004; SANTA ROSA, 1997).

A importância do cão na epidemiologia da doença não reside somente no fato do mesmo apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas a espécie humana (BRASIL, 2006), mas também nos altos níveis de animais infectados assintomáticos que estão presentes em uma região endêmica, podendo chegar a 80% (BRASIL, 2006; FERRER et al., 2002). Estes cães servem de fonte de infecção para o vetor e, muitas vezes, deixam de ser identificados numa população, devido a ausência de sintomas da doença (MOLINA et al, 1994; GUARGA et al, 2000; TRAVI et al 2001).

Embora o cão seja considerado o principal reservatório doméstico da doença, outras espécies animais que apresentam convívio próximo com os seres humanos, tais como os gatos, podem se tornar infectadas. Costa et al. (2010), ao avaliarem 200 gatos em uma região endêmica para LVC, por exame parasitológico direto e métodos sorológicos, encontraram uma prevalência de infecção em 23 (11,5%) animais. Por outro lado, Vides et al. (2011), ao avaliarem 55 gatos com dermatopatias na mesma área endêmica, observaram um número significativamente maior quando comparado ao estudo anterior, com uma taxa de prevalência de infecção da ordem 49%. Apesar da contribuição da espécie na manutenção da doença não ter sido comprovada, demonstrou-se a presença de *Leishmania infantum chagasi*, por meio de xenodiagnóstico, em flebotomíneos que realizaram o repasto sanguíneo em gatos infectados (MAROLIA et al., 2007; SILVA et al., 2010).

Na Europa, estudos sobre a prevalência da doença em animais supõem que aproximadamente 2,5 milhões de cães sejam portadores da LV, principalmente em países como França, Espanha, Itália e Portugal. Nas Américas a leishmaniose visceral encontra-se distribuída em todo o continente, ocorrendo relatos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, onde foi descrito o primeiro caso autóctone da doença em uma criança de oito anos de idade, no município de Posadas e, onde desde então, têm sido identificados inúmeros casos da enfermidade em cães (SALOMON et al., 2008). Já na América do Sul, acredita-se que o número de cães também chegue aos milhões, com diferentes prevalências sendo observadas em várias regiões do Brasil, e a maioria dos casos ocorrendo principalmente nas regiões nordeste e sudeste (BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012; BRASIL, 2006).

No Brasil, a leishmaniose visceral já foi identificada em 25 dos 27 estados, com grandes centros urbanos transformando-se em áreas endêmicas, tais como o que ocorreu em Recife (PE), Natal (RN), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Brasília (DF), Belo Horizonte (MG), Bauru (SP) e Araçatuba (SP) (SILVA et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003, SÃO PAULO, 2006; DANTAS-TORRES, 2006; BRASIL, 2003; RIBEIRO, 2007; RONDON et al. 2008; ALMEIDA et al., 2009).

Na tentativa de implementar medidas de controle da doença, o programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil classifica os municípios em silenciosos, em investigação e com transmissão (BRASIL, 2006). Municípios silenciosos são aqueles que não apresentam casos autóctones em seres humanos ou animais. Estes podem ainda ser classificados em receptivos, quando da presença do vetor e vulneráveis na dependência da proximidade a eixos viários que permitam maior migração. Os municípios em investigação são municípios silenciosos com notificação de caso humano ou canino clinicamente suspeito, cão parasitologicamente positivo ou cão sororeagente aguardando conclusão de outros itens de investigação epidemiológica. Por último, os municípios com transmissão podem ser aqueles somente com transmissão canina, ou aqueles com transmissão humana. Diante da classificação do município, são recomendadas ações de vigilância vetorial tais como levantamento entomológico, e de vigilância do reservatório, como inquérito canino (BRASIL, 2006).

Nos estados com transmissão, estudos de prevalência da doença em cães vêm sendo realizados em alguns municípios. Os resultados são bastante divergentes, na dependência da seleção dos animais, características populacionais e do teste diagnóstico empregado, chegando a atingir 75% em alguns locais (FRANÇA-SILVA et al., 2003; DANTAS-TORRES et al., 2006; CAMARGO-NEVES et al., 2007; CORTADA et al., 2004). Estudos conduzidos no estado de São Paulo, em municípios considerados silenciosos para a doença, têm identificado alguns animais infectados. Os valores de soroprevalência nas populações estudadas foram de 1,5% e 2,45% (OLIVEIRA, 2004; DE NARDO et al., 2011).

A região sul do Brasil era considerada indene para leishmaniose visceral até 2003 apresentando apenas relatos da doença sob a forma tegumentar, tanto em seres humanos quanto em animais, nos estados do Paraná e Santa Catarina (SÃO THIAGO; GUIDA, 1990; LIMA-FILHO; STEINDEL, 1998; ZANZARINI et al., 2005; ROSSETO et al., 2006; AQUINO, 2008). Os primeiros relatos de leishmaniose visceral canina na região foram realizados no município de Santa Maria, com cinco casos identificados *post mortem* no período de 1985 a 1997. Entretanto, não houve confirmação de que se tratavam de casos autóctones. (POCAI et al., 1998). Em 2007, dois municípios gaúchos, Cruz Alta e Uruguaiana, apresentaram casos alóctones da doença sob a forma visceral em cães (KRAUSPENHAR et al., 2007; DALMOLIN et al., 2007). Dois anos mais tarde, o município de São Borja apresentou um surto de leishmaniose visceral, com acometimento de 87 cães. Juntamente ao surto canino, quatro casos em seres humanos também foram confirmados na mesma cidade, o que gerou grande preocupação por parte dos órgãos de saúde (BRASIL, 2010a).

No estado de Santa Catarina os primeiros relatos de leishmaniose tegumentar em humanos datam de 1990, identificados em pacientes de áreas rurais de Coronel Freitas e Quilombo (SÃO THIAGO; GUIDA, 1990). A partir de então, outros municípios tais como Balneário Camboriú, Chapecó e Blumenau também registraram casos autóctones da doença no homem e em cães (LIMA-FILHO; STEINDEL, 1998; ROSSETO et al., 2006) sendo possível, alguns anos após, identificar por métodos moleculares, a presença de *L. amazonenses* e *L. braziliensis* das amostras dos pacientes atendidos nos de Coronel Freitas, Quilombo, Chapecó e Piçarras (GRISARD et al., 2000).

No ano de 2006, na região de Piçarras, município litorâneo localizado ao norte do estado, identificou-se a presença de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* infectadas por *Leishmania* sp.; entretanto, a identificação da espécie não foi realizada (MARCONDES et al., 2009). Apesar de se tratar de um vetor relacionado à transmissão de leishmaniose tegumentar, Saraiva et al. (2009) demonstraram infecção do mesmo flebotomíneo por *Leishmania infantum chagasi* no estado de Minas Gerais, por meio de inoculação em hamsters e reação em cadeia de polimerase (PCR).

Em Florianópolis, capital do estado, até o ano de 2010 alguns relatos da forma tegumentar da doença haviam sido realizados em seres humanos (AQUINO, 2009). Correa et al. (2010), ao avaliarem 102 cães por métodos sorológicos identificaram anticorpos anti-*Leishmania* sp em sete deles, sem comprovação da espécie envolvida. No mesmo ano, foram identificadas *Lutzomyia neivai* infectadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp. (BRASIL, 2010b). Figueiredo et al (2012), ao avaliarem cinco cães com suspeita de leishmaniose visceral, isolaram, por meio de cultivo de fragmentos de pele e linfonodo, formas promastigotas do parasito em três. Nestes, por métodos imunoenzimáticos, comprovaram tratar-se de *L. infantum chagasi*.

As manifestações clínicas da LVC são inespecíficas, incluindo febre, linfadenomegalia, anemia, perda progressiva de peso e epistaxe (GENARO, 1993, STRAUSS; BANETH, 2012). Alterações dermatológicas tais como dermatite descamativa e ulcerativa, além da presença de onicogribose, são comumente encontradas (GENARO, 1993; FEITOSA, 2000). Apesar dos diversos sistemas envolvidos, a principal causa de morte de cães com LVC é a insuficiência renal (FEITOSA, 2000, SOARES, 2005). Devido a variedade e inespecificidade dos sintomas da doença, o diagnóstico clínico da LVC torna-se difícil de ser realizado, salientando a necessidade da utilização de métodos sorológicos e parasitológicos para sua confirmação (FEITOSA et al., 2000; SINGH et al., 2003).

A forma mais segura de diagnóstico da doença é o exame parasitológico direto, considerado o teste ouro para o diagnóstico da LV (DYE et al., 1993; LEONTIDES et al., 2002; SINGH et al., 2003). O exame consiste na observação de formas amastigotas da *Leishmania* em esfregaços obtidos por citologia aspirativa de

linfonodos, baço e fígado, aspirados de medula óssea e esfregaços sangüíneos corados com corantes de rotina (SWENSON et al., 1988; WOLSCHRIJN et al., 1996). Apesar de simples e de fácil realização, resultados negativos não são incomuns, principalmente em animais com uma resposta imune predominantemente celular e baixa carga parasitária (IKEDA GARCIA; FEITOSA, 2006).

As técnicas sorológicas até então recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito sorológico em cães são o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Quando realizados em associação, aumentam a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, constituindo dessa forma um instrumento essencial no diagnóstico da LVC (BRASIL, 2006). Apesar de amplamente utilizados, atualmente o Ministério da Saúde tem recomendado e implementado a utilização do teste rápido (DPP®) para triagem e teste ELISA para confirmação dos casos positivos.

Apesar de amplamente utilizados, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados em algumas fases da doença. O tempo de soroconversão nos animais é muito variável, podendo ser de 22 meses, não sendo possível, durante este período, a detecção de animais infectados perante a realização dos métodos sorológicos (QUINELL et al., 1997; MORENO; ALVAR, 2002; SOLANO-GALEGO et al., 2005). Outro fator a ser considerado é que cães com uma resposta predominantemente celular podem não fazer soroconversão e, dessa forma, não são identificados por diagnóstico sorológico (SOLANO-GALEGO et al., 2005). Em um estudo realizado por Queiróz et al. (2010) cães assintomáticos foram subdiagnosticados pelos métodos sorológicos, uma vez que 5/8 cães tiveram o diagnóstico da doença confirmado por PCR do tecido cutâneo, com ELISA e RIFI negativos.

O teste ELISA indireto é considerado um teste rápido, de fácil execução e leitura, permitindo o processamento de grande número de amostras de forma simultânea. Dependendo do tipo de antígeno empregado e do protocolo experimental, pode apresentar valores de sensibilidade e especificidade variando entre 92% e 100% e 77% e 100%, respectivamente (MANCIANTI et al., 1995; SANTA BRIGIDA, 2004; LAURENTI et al., 2005; ZANETTE, 2006).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é um teste que foi amplamente utilizado em inquéritos epidemiológicos, possuindo, contudo, a desvantagem da subjetividade e por demandar de um tempo grande para leitura das lâminas por parte do profissional quando existe um número considerável de amostras. O método apresenta resultados de sensibilidade e especificidade variando em torno de 98% e 100%, respectivamente (MANCIANTI et al., 1995; ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER et al., 2005).

Apesar de apresentarem elevadas taxas de sensibilidade e especificidade quando realizadas em associação (BRASIL, 2006), as provas sorológicas podem culminar em resultados falso positivos devido a ocorrência de reações cruzadas com outros agentes infecciosos, tais como *Erlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006; OTRANTO et al., 2009), e outros membros da família Trypanosomatidae, incluindo o *Trypanosoma cruzi* e os agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar (ZANETTE, 2006). Embora esse tipo de reação possa existir, durante a avaliação por métodos sorológicos, o que se tem observado é que normalmente esses animais apresentam densidades ópticas próximas ao ponto de corte.

Tendo em vista a ocorrência de resultados falso positivos em diagnósticos sorológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada de forma adicional no diagnóstico da LV (REITHINGER et al., 2003). Ela permite identificar e amplificar seletivamente seqüências de DNA do parasito em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, aspirados de linfonodos, baço e fígado, biópsias cutâneas, conjuntiva e sangue (MIRÓ et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010). De maneira geral a técnica de PCR é melhor para detectar estágios iniciais de infecções, enquanto a sorologia é melhor para diagnosticar estágios mais avançados. A escolha do tecido onde será realizada a pesquisa do DNA do parasito influencia a sensibilidade da reação. Em amostras de sangue a sensibilidade é menor, principalmente quando comparada com a reação proveniente de outros tecidos, como linfonodo, pele e medula óssea (MIRÓ et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010). Por essa razão, a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR), que apresenta sensibilidade e especificidade mais elevadas quando comparada ao método convencional, pode ser a melhor opção quando a investigação é feita em amostras de sangue total (SOLANO-GALEGO, 2001; FRANCINO, 2006; MANNA, 2008).

Apesar da ocorrência de casos autóctones de leishmaniose tegumentar em seres humanos no município de Florianópolis, e da identificação de três casos autóctones de leishmaniose visceral canina, estudos envolvendo um maior número de cães de várias regiões do município não foram realizados até a presente data.

3. OBJETIVOS

3.1. Principal

- Pesquisar a ocorrência de *Leishmania* sp. em cães do município de Florianópolis, Santa Catarina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O município de Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina, localiza-se no litoral catarinense, entre 27° 35' 48" S e 48° 32' 57" W, apresentando uma área total de 433 km². Destaca-se por ser a capital de maior Índice de Desenvolvimento Humano entre as capitais brasileiras. Apresenta um clima subtropical, com temperaturas médias em torno de 21°C. A população foi estimada em 421.240 habitantes (IBGE, 2010). É o segundo município mais populoso do Estado e tem sua economia baseada nos setores de tecnologia, prestação de serviços e turismo. O município é composto por 85 bairros, distribuídos em 13 Distritos Administrativos (Figura 1).

4.2. Animais

Para o presente estudo foram selecionados por conveniência amostras de sangue total e soro de 491 cães, independentes de sexo ou raça, com idade superior a seis meses, provenientes do Município de Florianópolis, Santa Catarina (Figura 1), encaminhados para procedimentos cirúrgicos eletivos no Centro de Controle de Zoonoses do município, no ano de 2011. Uma das condições para que o Centro de Controle de Zoonoses permitisse a coleta de amostras de cães para a realização do presente estudo, foi a de que uma alíquota de soro de cada animal seria encaminhado à rede pública para realização de sorologia para leishmaniose visceral pelos órgãos oficiais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal da UNESP câmpus de Araçatuba, protocolo n°01248/2012.

4.3. Delineamento Experimental

Após o consentimento esclarecido dos proprietários, os animais foram submetidos a um exame físico geral, sendo posteriormente colhida uma amostra de sangue para detecção de anticorpos séricos anti-*Leishmania* sp. pelas técnicas de ELISA indireto e pela Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), segundo Zanette (2006), e pesquisa de DNA de *Leishmania* sp. pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os proprietários não consentiram a colheita de nenhuma outra amostra biológica.

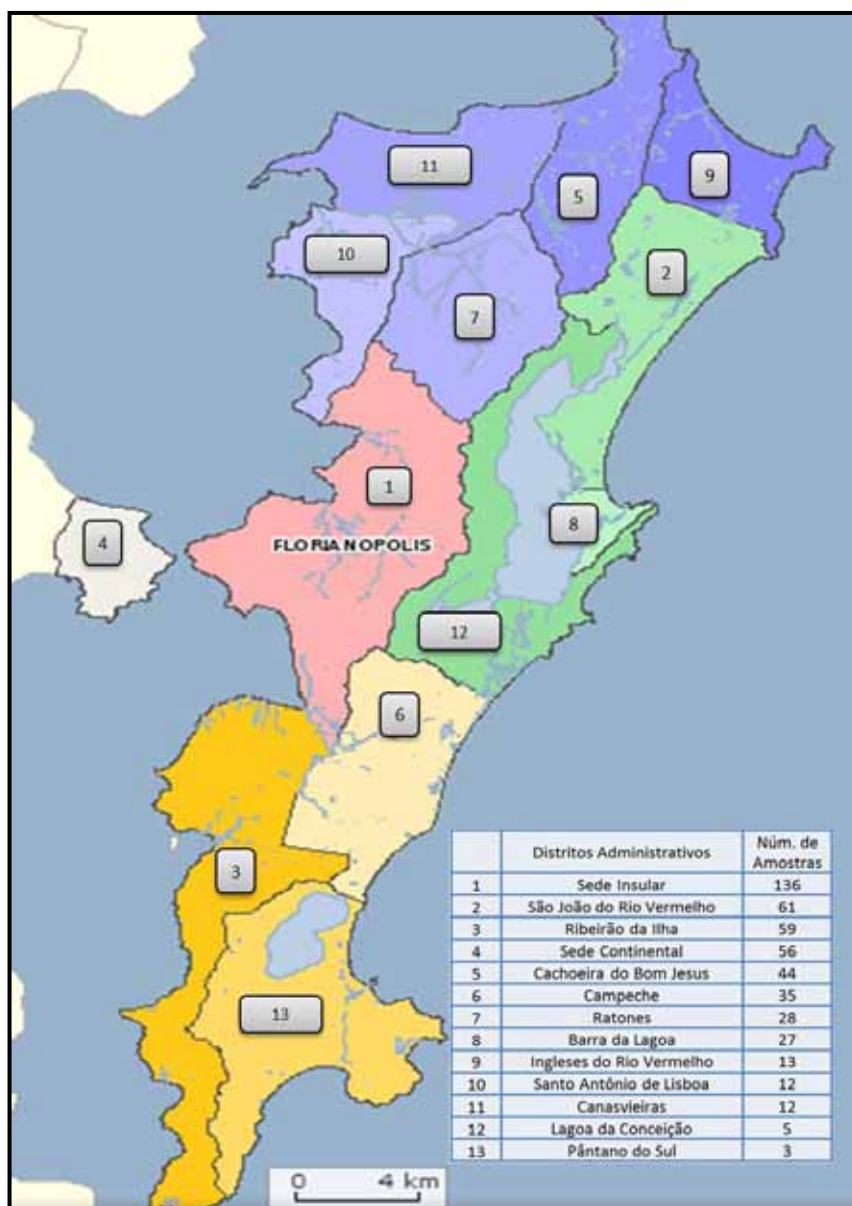


FIGURA 1 – Figura demonstrando os diferentes Distritos Administrativos do município de Florianópolis, Santa Catarina, e o número de amostras avaliadas, para pesquisa de leishmaniose visceral, por distrito. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php

Os proprietários responderam, ainda, a um questionário sobre o local de nascimento do animal e, se havia tido ou não deslocamento do mesmo durante algum período da vida para regiões endêmicas para leishmaniose visceral ou para regiões sob investigação. Os animais que sofreram deslocamento para uma dessas

regiões foram excluídos do estudo. Nenhum dos animais incluídos no estudo havia sido previamente vacinado contra leishmaniose visceral.

4.4. Colheita das amostras

Após a realização da tricotomia local e antissepsia adequada, a colheita de sangue foi realizada por punção da veia jugular. O sangue colhido foi dividido em duas alíquotas, uma em um tubo contendo anticoagulante do tipo EDTA e outra em um tubo livre de anticoagulante. O segundo tubo foi mantido em temperatura ambiente até a visualização da retração do coágulo, sendo posteriormente submetido à centrifugação a 1620g durante cinco minutos. O soro proveniente da centrifugação foi alíquotado em minitubos e armazenado a -20°C até o seu processamento. O tubo contendo anti-coagulante foi congelado a temperatura de -20°C até o momento da realização da PCR.

4.5. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.

4.5.1. Obtenção do antígeno de *L. i. chagasi*

Foram isoladas, em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina, formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa46 para a realização da RIFI e a cepa MHOM/BR/PP75 para o ELISA, proveniente de baço de hamster cronicamente infectado. Após duas a três passagens em cultura as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm (1620g) a 4°C, em centrífuga refrigerada¹, durante 10 minutos, e conservadas a -80°C na forma de precipitado no fundo do tubo.

¹ Eppendorf, Modelo 5804R, Hamburg, Germany

Para a preparação do antígeno o precipitado contendo as formas promastigotas foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por três vezes consecutivas. Utilizou-se, então, uma alíquota para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford². Para a realização da RIFI o precipitado no fundo do tubo foi ressuspenso em solução de formalina tamponada 2% e mantido a 4°C por 24 horas. Após a fixação das formas promastigotas, foram novamente lavadas em solução salina e contadas em câmara de Neubauer. A concentração de parasitos foi ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL.

4.5.2. Técnica de ELISA indireto

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania infantum chagasi*, cepa MHOM/BR/PP75, numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6, e incubadas por 12-18 horas a 4°C, sendo as placas lavadas, entre cada uma das etapas posteriores, por quatro vezes, com PBS-T. As placas foram bloqueadas com 200 µL de soro fetal bovino (BSF) 10% em PBS e incubadas a temperatura ambiente, durante duas horas. Foram adicionadas a cada poço e incubadas, por três horas, à temperatura ambiente 100 µL do controle positivo, do controle negativo e das amostras de soro, diluídas em 1:400 em PBS-T e 1% de BSA. Após nova lavagem adicionou-se, em cada poço, 100 µL de anticorpo anti-IgG de cão marcado com peroxidase³, na diluição de 1:80000 em PBS-T. Para o início da reação adicionou-se, após um período de incubação de 45 minutos a 37°C, em cada poço 100 µL de uma solução de tetrametilbenzidina dihidroclorada (TMB). A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µL de H₂SO₄ 1M e a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492 nm utilizando-se leitor de ELISA⁴. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida das amostras em duplicata.

² Bio-Rad Protein Assay, Hercules, USA

³ Sigma Aldrich, Brasil

⁴ Labsystems Multiskan EX

Como controle positivo da reação utilizou-se amostra de soro de dois cães parasitologicamente positivos com elevados títulos de IgG anti-*Leishmania* sp. provenientes do município de Araçatuba, São Paulo; como controle negativo, amostra de soro de cinco cães provenientes de área não endêmica para a doença. Para a determinação do ponto de corte foi realizado o teste de ELISA em amostras de 20 cães sadios de área não endêmica para leishmaniose visceral. O ponto de corte foi estipulado a partir da média, acrescida de três desvios-padrões da leitura da densidade óptica (DO) resultando no valor de densidade óptica de 0,270.

4.5.3. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para a realização da reação de imunofluorescência indireta as lâminas foram inicialmente sensibilizadas adicionando-se 20 µL de suspensão de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa46, em PBS em cada círculo. As lâminas foram colocadas em estufa, para secagem, por 15 a 20 minutos. Realizou-se a diluição no soro de 1:40 das amostras a serem testadas e dos controles positivo e negativo. Em seguida, foram adicionados em cada círculo 20 µL de cada amostra e dos controles. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos à 37°C e, em seguida, lavadas por imersão em PBS (pH 7,2) por três vezes. Foi realizada então a diluição de 1:100 do anticorpo anti-IgG de cão fluoresceinado⁵ em azul de Evans, e 20 µL desta solução foram adicionados em cada círculo das lâminas, as quais foram incubadas durante 30 minutos a 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, pH 7,2 durante 5 minutos, adicionou-se glicerina tamponada e recobriu-se com lamínula para leitura imediata em microscópio de fluorescência. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em amostras com diluições iguais a 1:40.

⁵ Sigma Aldrich, Brasil

4.6. Pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Dirofilaria immitis*

As amostras reagentes ao ELISA ou a RIFI foram submetidas a pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Dirofilaria immitis* por meio da técnica de ELISA, utilizando-se o kit SNAP 4DX[®] test⁶ de acordo com as instruções do fabricante.

4.7. Reação em Cadeia da Polimerasa (PCR) convencional para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp.

4.7.1 Extração de DNA

A extração de DNA de sangue total foi realizada após lise (acetato de sódio 0,2M, duodecil sulfato de sódio 10%), digestão com proteinase K, extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol 100% de acordo com SAMBROOK et al. (1989)

4.7.2. PCR convencional

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990) [13A (5'- GTC GGG GAG GGG CGT TCT -3')] e [13B (5'- ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT -3')] que resultam na amplificação de fragmento de 120 pares de base de cinetoplasto de *Leishmania* sp. (kDNA). A reação foi realizada em tubos de polipropileno de 0,2mL contendo 10mM de Tris-HCl, 200μM de desoxiribonucleosídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 10μM de cada primer, 1μU de Taq DNA polimerase e 2μl de DNA (com aproximadamente 20 pg/μl, com volume final de 25μl. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador⁷ com desnaturação inicial de 95°C por 5min, 34 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação, 63°C por 45s para anelamento, 72°C por 30s para extensão, e 72°C por 5min para extensão final. As amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.

⁶ IDEXX Laboratories Inc, USA

⁷ GeneAmp[®], PCR System 9700, Applied Biosystems, Cingapura

4.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp.

As amostras de sangue total em EDTA foram conservadas a -20°C e encaminhadas, em gelo seco, até o Laboratório de Biologia Molecular da IDEXX Reference Laboratories (West Sacramento, Califórnia, USA) onde foi realizada a reação de PCR em Tempo Real e posterior sequenciamento.

4.8.1. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de sangue total foi realizada por meio de protocolo padrão do sistema Corbett XTractor-Gene platform⁸ segundo instruções do fabricante. Em cada placa de extração foi colocado um controle negativo (“negative control for extraction”), constituído pela solução de lise acrescida de PBS. Na solução de lise era acrescentado, ainda, um fragmento de DNA construído artificialmente (lambda), para avaliar a qualidade do DNA extraído.

4.8.2. Amplificação de DNA de *Leishmania* sp.

Sequências altamente conservadas do gene que codifica a proteína de superfície gp63 da *Leishmania infantum* foram alinhadas e selecionou-se uma região para o desenho de dois primers e uma “probe” usando o programa PrimerExpress⁹. As sequências dos primers e da “probe” são propriedade da IDEXX Laboratories e, por isso, não foram reveladas. A reação de PCR em Tempo Real foi realizada com concentrações padronizadas de primer e probes utilizando-se Master Mix comercial. As amostras foram então amplificadas usando-se o aparelho termociclador¹⁰. Em cada amostra foi amplificado fragmento do gene que codifica a fração 18S do rRNA (controle de qualidade da amostra) e o controle positivo (lambda) (“internal positive control”), para assegurar que a extração ocorreu corretamente e que não haviam inibidores resultantes do processo de extração. Os produtos amplificados foram submetidos a sequenciamento de acordo com o protocolo padrão.

⁹ Qiagen®, Valencia, CA, USA

¹⁰ Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

¹¹ Roche LightCycler® 480 Probes Master, Roche Applied Science, Indianapolis, IN

4.9. Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o programa “Statistical Analysis System” (SAS). O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar a concordância entre os métodos ELISA e RIFI. A interpretação da concordância entre os métodos a partir dos valores de Kappa foi realizada de acordo com Landis e Koch (1977).

Kappa	Concordância
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1	Perfeita

5. RESULTADOS

Do total de 491 animais avaliados, 337 (68,6%) eram fêmeas e 151 (31,4%) machos. A idade dos animais variou de seis meses a 12 anos, com uma média de três anos. As diferentes faixas etárias dos animais incluídos no presente estudo encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição etária de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de janeiro e julho de 2011. Número absoluto e percentagem.

Faixas Etárias	Número cães	Percentagem (%)
6 meses a 2 anos	176	35,85
2 a 4 anos	161	32,79
4 a 6 anos	82	16,70
Acima de 6 anos	72	14,66
Total	491	100

No que diz respeito à raça, 408 (83,1%) cães não apresentavam raça definida e 83 (16,9%) possuíam definição racial (Tabela 2). Os animais avaliados eram provenientes de 52 dos 85 bairros do município de Florianópolis, abrangendo tanto os bairros da ilha como do continente, distribuídos nos 13 distritos administrativos (figuras 2 a 6). A relação dos distritos, bem como o número de amostras colhidas por distrito, encontram-se apresentados na tabela 3. A relação dos bairros dentro de cada distrito administrativo, bem como o número de amostras colhidas em cada bairro encontram-se no quadro 1 (APÊNDICE A).

Das 491 amostras de soro testadas, 25 (5,09%) foram consideradas sorologicamente positivas, quer por ELISA indireto quer por RIFI. No teste ELISA duas (0,4%) amostras encontravam-se acima do ponto de corte da reação. Por meio da RIFI, 24 (4,9%) amostras foram consideradas sororeagentes. Somente uma das amostras testadas foi reagente nos dois métodos sorológicos simultaneamente. Deste modo a concordância entre as técnicas de ELISA e RIFI foi considerada ruim ($k=0,0699$).

O número de animais reagentes e sua respectiva percentagem em cada uma das técnicas sorológicas, encontram-se apresentados nas tabelas 4 e 5. Os resultados individuais de ELISA, RIFI e PCR para leishmaniose visceral, encontram-se apresentados na tabela 6. Os valores individuais de densidade óptica do ELISA e os resultados da RIFI dos 491 cães, encontram-se dispostos no quadro 2 (APÊNDICE B).

Os 25 cães sororeagentes para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. resultaram em negativos para a presença de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*D. immitis* (Tabela 6).

Tabela 2 – Distribuição racial de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de janeiro e julho de 2011. Número absoluto e percentagem.

Raça	Número de animais	Percentagem (%)
SRD	408	83,10
Poodle	22	4,48
Pitt Bull	12	2,44
Labrador	10	2,04
Pinscher	9	1,83
Cocker Spaniel	4	0,81
Teckel	4	0,81
Boxer	3	0,61
Fox Paulistinha	2	0,41
Lhasa Apso	2	0,41
Pastor Alemão	2	0,41
Rottweiler	2	0,41
Shar Pei	2	0,41
Beagle	1	0,20
Basset	1	0,20
Bull Terrier	1	0,20
Chow Chow	1	0,20
Fila Brasileiro	1	0,20
Pequinês	1	0,20
Pointer	1	0,20
Shih Tzu	1	0,20
Total	491	100

Tabela 3 – Distribuição, quanto aos distritos administrativos de origem, de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de janeiro e julho de 2011. Número absoluto e percentagem.

Distritos Administrativos	Número de amostras	Percentagem (%)
Sede Insular	136	28
São João do Rio Vermelho	61	12
Ribeirão da Ilha	59	12
Sede Continental	56	11
Cachoeira do Bom Jesus	44	9
Campeche	35	7
Ratones	28	6
Barra da Lagoa	27	5
Ingleses do Rio Vermelho	13	3
Santo Antônio de Lisboa	12	2
Canasvieiras	12	2
Lagoa da Conceição	5	1
Pântano do Sul	3	1
Total	491	100

Tabela 4 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA indireto, em número absoluto e percentagem, de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados no período de Janeiro e Julho de 2011.

ELISA	Número de animais	Percentagem (%)
Positivo	2	0,4
Negativo	489	99,6
Total	491	100,0

Tabela 5 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 491 cães provenientes do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados no período de janeiro e julho de 2011.

RIFI	Número de animais	Percentagem (%)
Positivo	23	4,9
Negativo	468	95,3
Total	491	100,0

Tabela 6 – Resultados individuais dos testes ELISA e RIFI para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp., da PCR para pesquisa de DNA de *Leishmania* sp., e do kit rápido de ELISA (Snap 4Dx®) para pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*D. Immitis*, de 25 animais sororeagentes, provenientes de uma amostragem de 491 cães oriundos do município de Florianópolis, Santa Catarina, avaliados para pesquisa de leishmaniose visceral, no período de Janeiro e Julho de 2011.

Animal	ELISA*	RIFI	PCR	Snap 4Dx®	
				<i>E. canis</i>	<i>D. immitis</i>
C14	0,032	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C23	0,116	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C112	0,06	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C113	0,06	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C123	0,02	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C131	0,019	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C153	0,016	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C158	0,023	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C159	0,03	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C164	0,037	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C168	0,001	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C171	0,04	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C176	0,005	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C183	0,002	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C184	0,012	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C185	0,029	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C186	0,005	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C190	0,007	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C191	0,027	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C311	0,038	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C438	0,03	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C456	0,06	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C459	0,03	Reagente	Negativo	Negativo	Negativo
C401	0,32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C491	0,54	Reagente	Positivo	Negativo	Negativo

* Ponto de corte da reação de ELISA previamente determinado em 0,270.

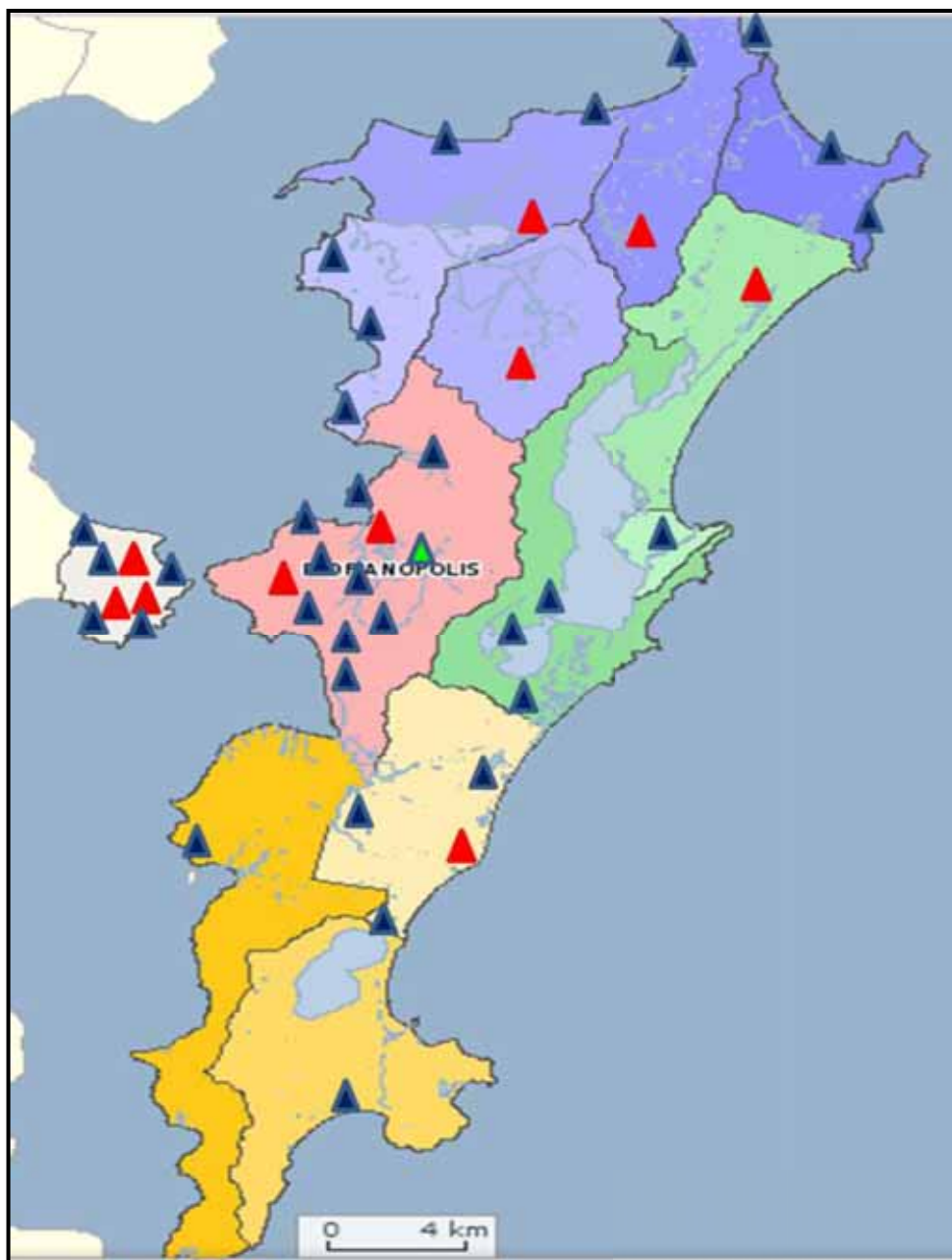


FIGURA 2 – Figura demonstrando a localização dos bairros nos diferentes Distritos Administrativos do município de Florianópolis, Santa Catarina, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes, triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes e triângulo em verde demonstra o bairro onde a infecção pelo parasito foi confirmada por PCR. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php.

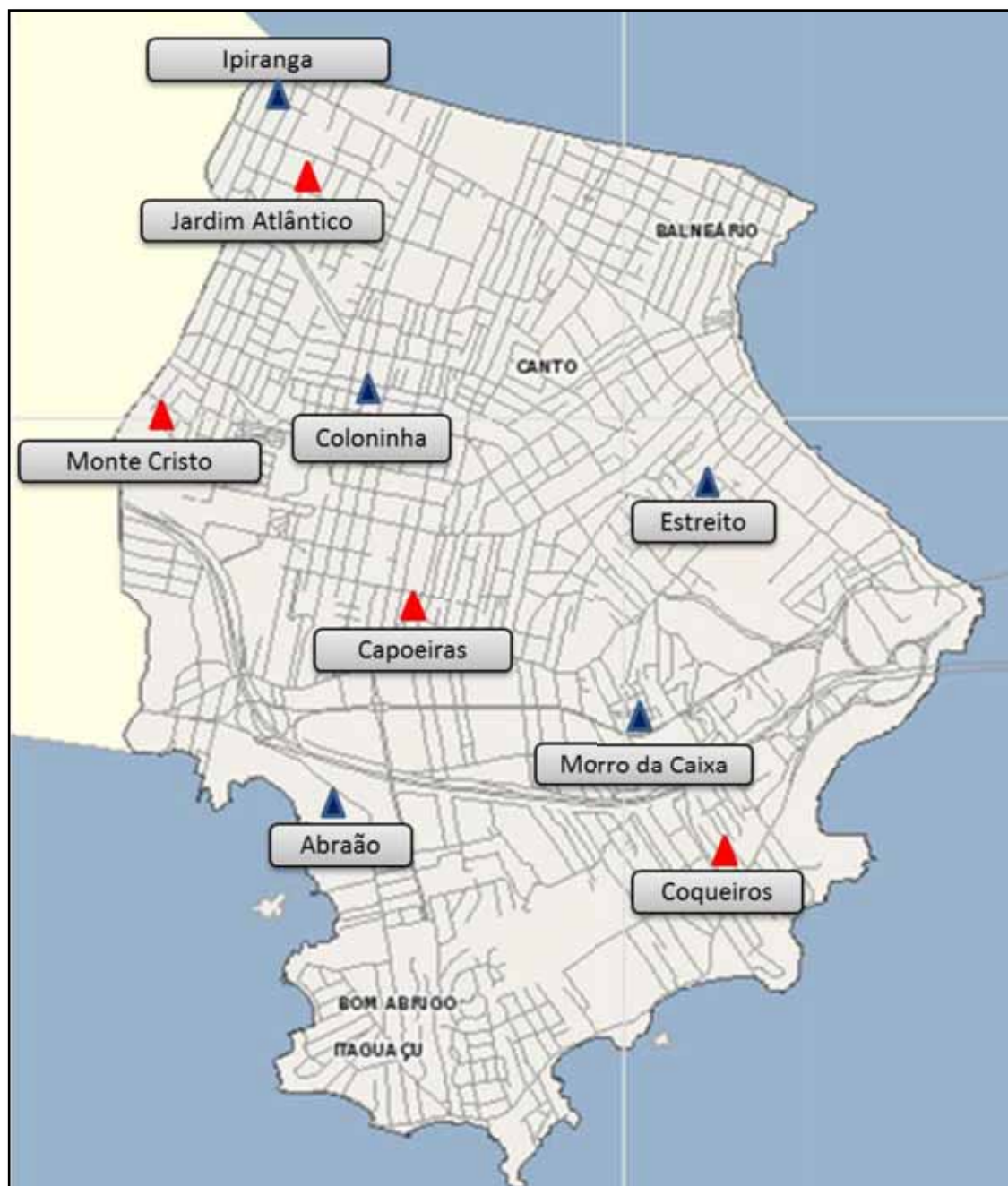


FIGURA 3 - Figura demonstrando bairros situados no distrito administrativo Sede Continental, do município de Florianópolis, Santa Catarina, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes, triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php.

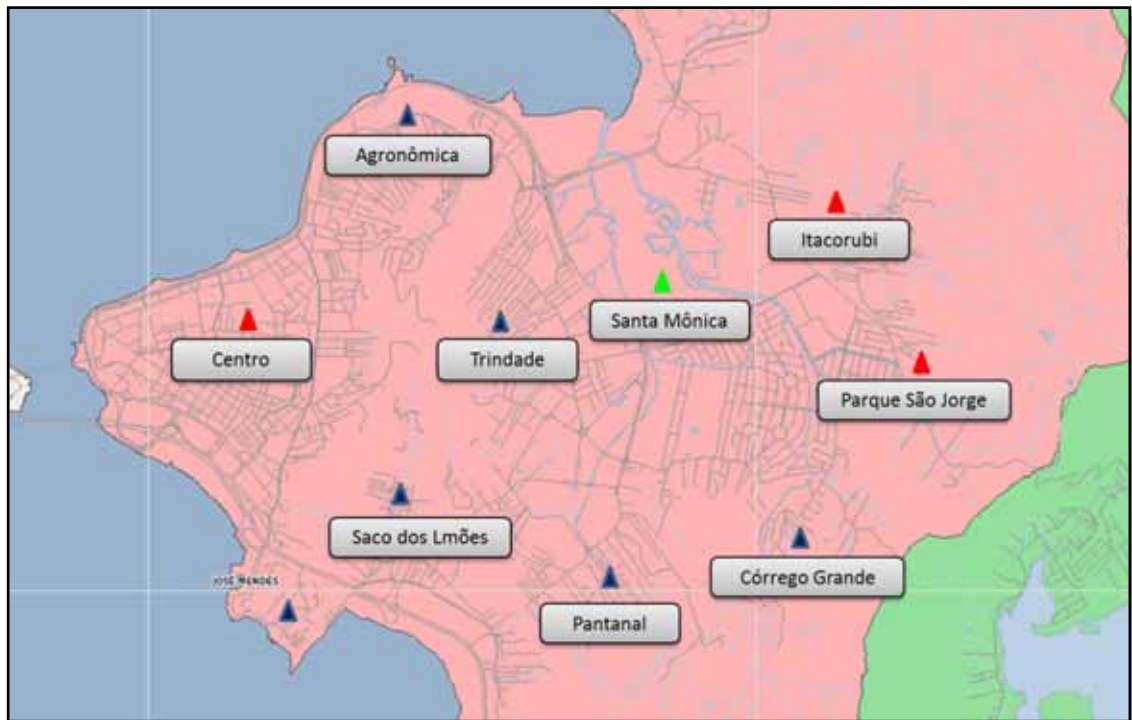


FIGURA 4 - Figura demonstrando bairros situados no distrito administrativo Sede Insular, do município de Florianópolis, Santa Catarina, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes, triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes e o triângulo em verde demonstra o bairro onde a infecção pelo parasito foi confirmada por PCR. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php.

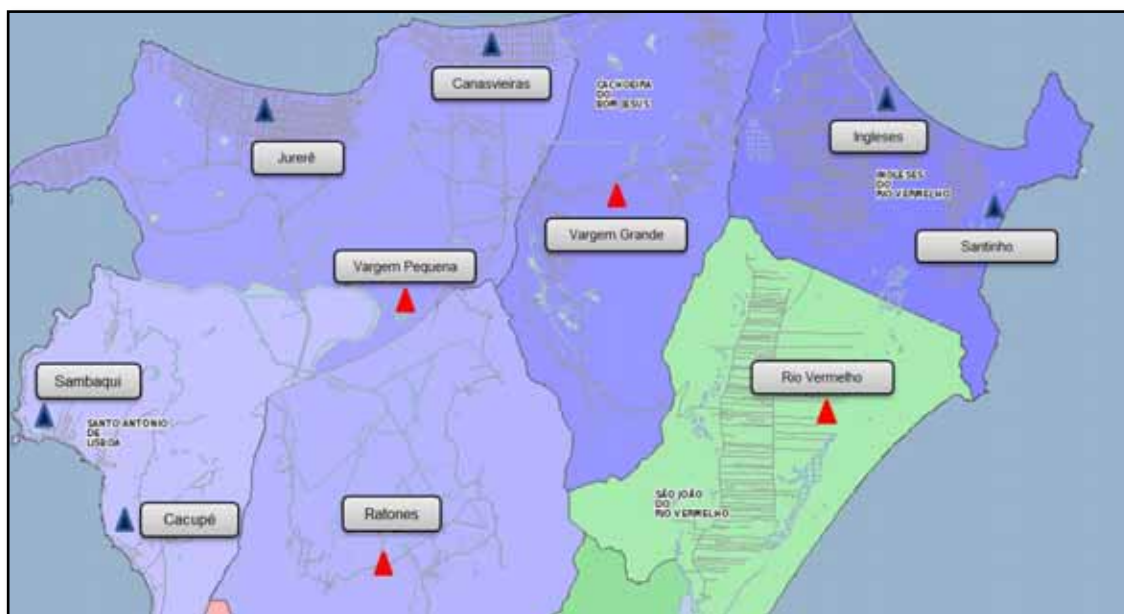


FIGURA 5 - Figura demonstrado bairros situados nos distritos administrativos da região norte do município de Florianópolis, Santa Catarina, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes e triângulos vermelhos demonstram bairros onde havia cães sororeagentes.

Fonte:

http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php.

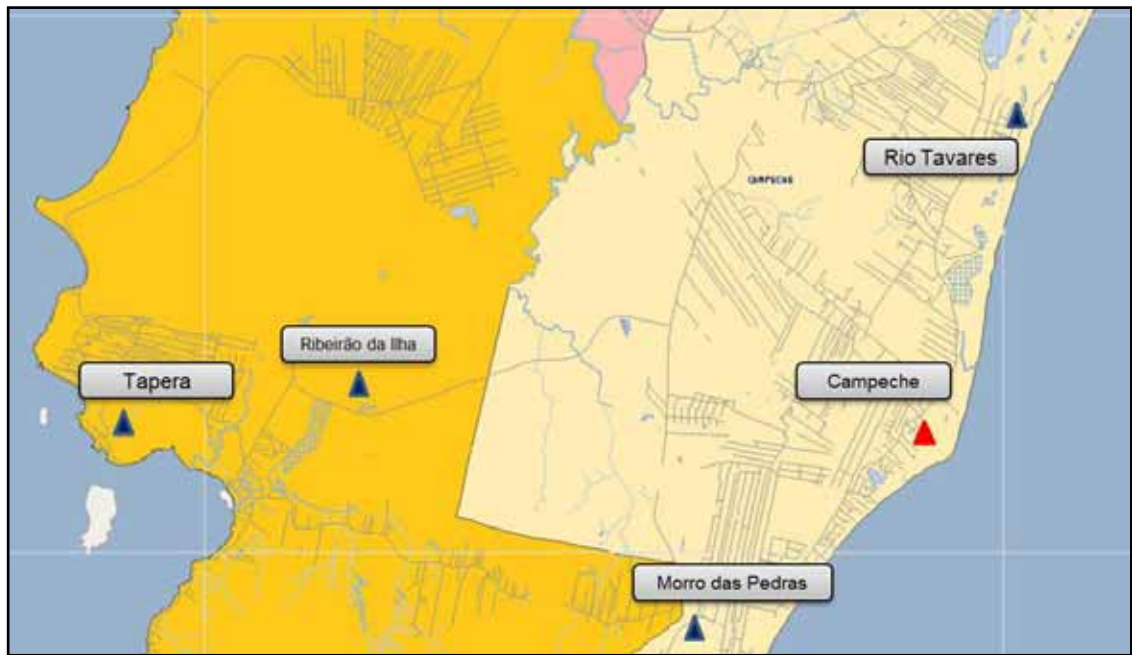


FIGURA 6 - Figura demonstrado os bairros dos distritos administrativos da região sul do município de Florianópolis, Santa Catarina, de onde foram obtidas amostras de sangue de cães para pesquisa de leishmaniose visceral por sorologia e PCR. Triângulos azuis demonstram os bairros onde não havia cães sororeagentes e o triângulo vermelho demonstra bairro onde havia cães sororeagentes. Fonte: http://geo.pmf.sc.gov.br/geo_fpolis/index3.php.

Os animais sorologicamente positivos em qualquer um dos testes tiveram suas amostras de sangue total avaliadas por meio de PCR convencional (Figura 7) e por meio do PCR em Tempo Real, para pesquisa do DNA do parasito. Em apenas um cão (C491) foi possível confirmar a presença de *Leishmania* sp. em ambas as reações.

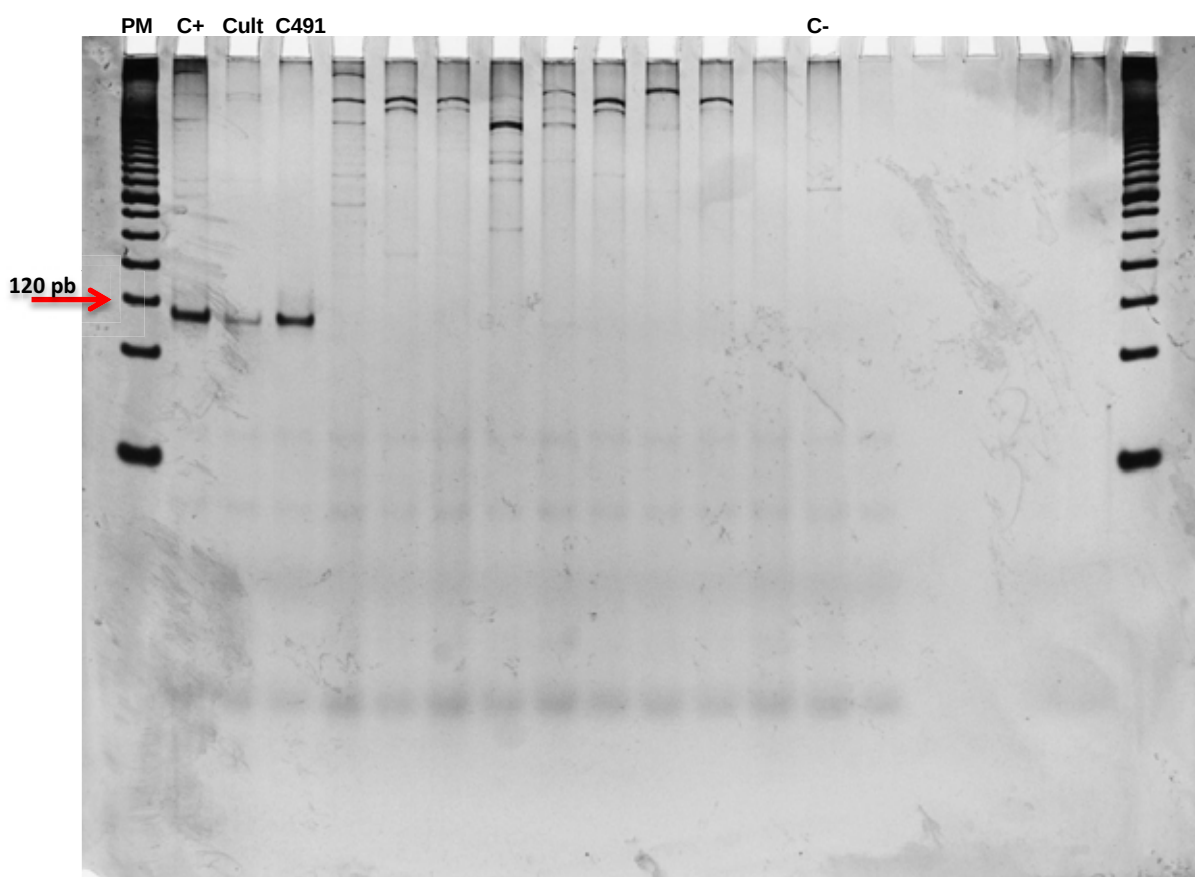


FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos da amplificação, por PCR, de fragmentos de kDNA de *Leishmania* sp. de 120 pb, através de técnica de PCR, em amostra de sangue de cão proveniente do município de Florianópolis, Santa Catarina. PM = Marcador de peso molecular em escada de 50 pb (Invitrogen®). C+ = controle positivo, Cult = cultura de *Leishmania infantum chagasi*, C- = controle negativo e C491 = amostra avaliada.

Todas as amostras testadas por PCR em Tempo Real apresentaram amplificação do fragmento do gene 18S do rRNA, e em todas as reações de PCR houve amplificação do lambda. A eficiência de amplificação foi de 99%. O “cross-threshold” (Ct) de amplificação da amostra de sangue do cão C491 foi 36,63.

O sequenciamento dos “amplicons” foi realizado, porém, devido à pequena quantidade de DNA, a qualidade do resultado não foi adequada. Tentou-se um novo sequenciamento, a partir de outra extração da amostra, entretanto, o resultado foi semelhante, não permitindo a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida.

Após a confirmação do diagnóstico de LVC, o proprietário do cão 491 foi contactado para que novas amostras biológicas (linfonodos e medula óssea) fossem colhidas, na tentativa de se obter material para realizar o sequenciamento e confirmação da espécie de *Leishmania*. Entretanto, o animal havia sido submetido a eutanásia, por apresentar sororeatividade quando da realização dos testes sorológicos pelo Centro de Controle de Zoonoses.

6. DISCUSSÃO

Tendo em vista a ocorrência de leishmaniose visceral canina para regiões que até então não apresentavam relatos da doença (BRASIL, 2010a; DALMOLIN et al., 2007; KRAUSPENHAR et al., 2007), torna-se evidente que a vigilância de possíveis reservatórios, dentre eles o cão, espécie esta normalmente associada com a manutenção da doença no ambiente peridoméstico, e que medidas preventivas e de controle devem ser realizadas de maneira rápida e eficaz. Apesar de existirem relatos de casos de leishmaniose tegumentar em humanos (AQUINO, 2008) e de leishmaniose visceral em cães (CORRÊA et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2012) no município de Florianópolis, até a presente data não foi realizado um inquérito epidemiológico nos cães do município.

A soroprevalência observada nas amostras do presente estudo foi de 5,3% (25/491). Por meio da técnica de ELISA duas (0,4%) amostras foram consideradas reagentes, enquanto à RIFI 24 (4,9%) animais apresentaram soroconversão. Os resultados são próximos aos observados por Côrrea et al. (2010) que, ao avaliarem pelos mesmos métodos 102 cães do município, observaram reatividade em sete (6,86%). Entretanto a avaliação foi realizada em um único bairro, na Lagoa da Conceição, onde os autores já haviam encontrado animais soropositivos para LVC (CORRÊA et al., 2010). Apesar de terem sido avaliados animais sorologicamente positivos previamente naquele bairro, no presente estudo, as cinco amostras proveniente daquele mesmo bairro não reagiram em nenhum dos métodos sorológicos.

Mesmo sendo possível observar animais sororeativos no presente estudo, a soroprevalência foi menor do que a observada em estudos realizados em regiões endêmicas. Em cidades como Montes Claros (MG), Araçatuba (SP), Paulista (PE), e Anastácio (MS) a soroprevalência em cães foi de 9,7%, 12,1%, 40% e 75%, respectivamente (CAMARGO-NEVES et al., 2007; CORTADA et al., 2004; DANTAS-TORRES, 2006; FRANÇA- SILVA et al., 2003).

Quando se comparam os resultados das técnicas sorológicas empregadas no presente estudo, observa-se uma concordância fraca, semelhante ao observado por De Nardo et al. (2010) que, ao avaliarem uma população de 584 cães no município

de São José do Rio Preto, por ELISA e RIFI, verificaram uma concordância sofrível entre os dois métodos sorológicos. Por outro lado, Zanete (2006), utilizando as mesmas técnicas (tipo de antígeno, anticorpos e cromógeno) que o presente estudo e que De Nardo et al (2010), verificou uma ótima concordância entre elas. Uma possível justificativa para tal discrepância seria o fato de que o último autor avaliou 50 amostras séricas de cães sabidamente infectados por *L. infantum chagasi*, com soroprevalências de 94% pelo ELISA e 98% pela RIFI.

No único animal que obteve resultados positivos ao ELISA e à RIFI, também foi possível identificar a presença de DNA do parasito no sangue, por meio da PCR convencional e em Tempo Real. No outro cão com densidade óptica (DO) acima do ponto de corte pelo ELISA, e nos cães sororeagentes pela RIFI, não foi possível amplificar o fragmento de DNA do parasito. Apesar de apresentar sensibilidade e especificidade mais elevadas do que outros métodos diagnósticos, principalmente o parasitológico direto e o sorológico (QUEIRÓZ et al., 2010), a possibilidade de amplificação do DNA de *Leishmania* sp. de amostras de sangue total depende da parasitemia e, portanto, da fase da doença. De maneira geral a PCR é mais sensível quando realizada em tecidos como a medula óssea, os linfonodos e a pele (PALTRINIERI et al., 2010); contudo, a colheita de outros tecidos nos animais do presente estudo não foi possível por falta de consentimento da maioria dos proprietários. Deste modo, o resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção. Entretanto, mesmo apresentando sensibilidade menor, quando comparada a outros materiais biológicos, a PCR do sangue apresentou amplificação ideal do controle positivo da reação, mais precisamente da fração 18S do rRNA.

O outro cão em que foram identificados anticorpos anti-*Leishmania* sp. (C401) apresentou DO de 0,320, valor este próximo ao ponto de corte. Um consenso para realizar diagnóstico de LVC, publicado por um grupo de estudos de leishmaniose canina ("Canine Leishmaniasis Working Group"), afirma que títulos de anticorpos até duas vezes acima do ponto de corte, sem a identificação do parasito, não são confirmatórios de infecção em cães e outros métodos diagnósticos devem ser utilizados (PALTRINIERI et al., 2010).

Por se tratarem de animais que vivem em uma cidade litorânea, onde existem casos de dirofilariose canina e, por existirem relatos de ocorrência de reações

sorológicas cruzadas entre anticorpos anti-*Leishmania* sp. e anti-*E. canis* pela técnica de ELISA (ZANETTE et al., 2008), a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com esses agentes foi avaliada e descartada, por não terem sido identificados anticorpos anti-*D. immitis* e anti-*E. canis* nos animais considerados positivos aos testes. De forma semelhante, descartou-se a possibilidade de reação cruzada com *Trypanossoma cruzi*, comumente descrita por vários autores (ZANETTE, 2006; PALTRINIERI et al., 2010; VIOL et al., 2012), uma vez que os cães avaliados nunca saíram de Florianópolis, município onde não foi identificado o vetor e nem existem casos notificados de doença de Chagas até a presente data. Entretanto, não se descarta a possibilidade de reação cruzada com anticorpos contra agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar, tais como *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, isoladas de casos autóctones em seres humanos residentes no estado de Santa Catarina (GRISARD et al, 2000).

Apesar de Florianópolis ser classificada, para o controle da leishmaniose visceral, como município com transmissão canina desde o ano de 2011 (FIGUEIREDO et al., 2012), baixas taxas de soroprevalência na população estudada eram esperados, o que vão de encontro aos resultados encontrados por Correa et al (2010). Mais ainda, por se tratarem de animais encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses para realização de cirurgias eletivas e, deste modo, não apresentarem alterações clínicas sugestivas de doença infecciosa, a possibilidade de confirmação sorológica no caso de uma infecção por *L. infantum chagasi* é pequena. Animais com leishmaniose visceral e ausência de sintomas da doença geralmente desenvolvem uma imunidade predominantemente celular, com baixos títulos de anticorpos séricos (STRAUSS; BANETH, 2001; BANETH, 2012; MELO, 2004). Além disso, o tempo para ocorrência de soroconversão em casos de LVC pode chegar a 22 meses, período durante o qual a confirmação da doença só pode ocorrer por métodos parasitológicos (MORENO; ALVAR, 2002; QUINNELL et al., 1997; SOLANO-GALEGO et al., 2005).

No único cão em que se confirmou a infecção por *Leishmania* sp. não foi possível realizar o sequenciamento dos produtos de amplificação porque a quantidade de DNA não foi suficiente. A tentativa de obter material de órgãos linfóides do referido animal foi frustrada, uma vez que o mesmo havia sido submetido a eutanásia por apresentar resultado sorológico positivo nos exames

realizados pelo órgão oficial. Dessa forma, não é possível afirmar que se tratava de um caso de leishmaniose visceral, já que existem casos relatados de leishmaniose tegumentar no estado de Santa Catarina (GRISARD et al., 2000).

Os resultados encontrados no presente estudo, associados aos relatos prévios de casos autóctones de LVC e à presença de possíveis vetores da doença em Florianópolis, salientam a necessidade de uma investigação epidemiológica minuciosa no município e a intensificação das medidas preventivas, tanto aquelas relativas a proliferação vetorial quanto as referentes a proteção do homem e do cão.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

- Há ocorrência de infecção por *Leishmania* sp. em cães da cidade de Florianópolis, SC; observada tanto pela presença de anticorpos como pela presença de DNA de *Leishmania* sp. no sangue periférico confirmando a existência de casos autóctones de leishmaniose canina no município de Florianópolis, possivelmente *L. infantum chagasi*.

8. REFERÊNCIAS

AQUINO, A.C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana em Santa Catarina – Casuística do Hospital Nereu Ramos no período de abril de 2005 a janeiro de 2009. 70p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina.

ALMEIDA, A.B.P.F.; FARIA, R.P.; PIMENTEL, M.F.A.; DAHROUG, M.A.A.; TURBINO, N.C.M.R.; SOUSA, V.R.F. Inquérito epidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.156-159, 2009.

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

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L.; Canine Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Elsevier Saunders, p.735-748, 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota técnica conjunta da Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a. 3p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses. **Estudo da prevalência e perfis de infecção por Leishmania sp. em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2010b. 25p.

CAMARGO-NEVES, V.L. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.4, n.48, p.12-14, 2007.

CORRÊA, G.L.B.; INDÁ, F.M.C.; OTA, E.V.S.; ALMEIDA, E.M.; IACOVSKI, R.B. **Inquérito Canino Censitário de Leishmaniose Visceral no Município de Florianópolis, em 2010.** Disponível em: <http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/PDF/16_11_2011_10.24.22.2871ae70a3883368f5fb35793a3b4b00.PDF> Acesso em 10 outubro 2012.

CORTADA, V.M.C.L.; DOVAL, M.E.C.; SOUZA LIMA, M.A.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.V.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.F.; CARDOSO, F.O.; VALLE, T.Z.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; DA COSTA, S.C.G. Canine Visceral Leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.28, p.365-374, 2004.

COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; GOMES, A.A.D.; VIDES, J.P.; SOBRINHO, L.S.V.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010.

DALMOLIN, F.; BRACCINI, E.T.; PINTO FILHO, S.T.L.; MONTEIRO, S.G.; GAIRA, M.; MELLO, F.P.S.; PICOLLI, T.A. **Leishmaniose em canino – relato de cão em Uruguaiana, Rio Grande do Sul.** Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0191-3.pdf> Acesso em 18 de Agosto de 2010.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual de epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v.40, p.537-541, 2006.

DE NARDO, C.D. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em cães do Município de São José do Rio Preto, São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado) 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.

DE NARDO, C.D.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D.; MARCONDES, M. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum syn chagasi* em cães do município de São José do Rio Preto, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.48, n.5, p.425-428, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation e new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. n.27, p.305–318, 2004.

DUJARDIN, J.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DEDET, J.; GRADONI, L.; SOTERIOU, K.; MAZERIS, A.; OZBEL, Y.; BOELAERT, M. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.7, p.1013-1018, 2008.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detectind infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v.110, n.3, p.647-656, 1993.

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

FERRER, L. Canine Leishmaniosis: Evaluation of the Immunocompromised Patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8, 2002, GRANADA. Proceedings... Disponível em:

<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653>

Acesso em 18 agosto de 2012.

FIGUEIREDO, F.B.; LIMA-JÚNIOR, F.E.F.; TOMIO, J.E.; INDÁ, F.M.C.; CORRÊA, G.L.B.; MADEIRA, M.F. Leishmaniose Visceral Canina: Três casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.1, p.1026, 2012.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÀNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO- GALEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÀNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.214-221, 2006.

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

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizontal, 1993. 202p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

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

GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.; CARVALHO-PINTO, C.J.; EGER-MANGRICH, I.; TOMA, H.K.; LIMA, J.H.; ROMANHA, A.J.; CAMPBELL, D.A. Characterization of *Leishmania* sp. Strains isolated from authohtonous cases of human cutaneous leishmaniosis in Santa Catarina state, southern Brazil. **Acta Tropica**, v.74, p.89-93, 2000.

GUARGA, J.L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M.J.; PERIBANEZ, M.A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J.A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in Veterinary Science**, v.69, p.249-253, 2000.

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

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.907-910, 2007.

LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CORBETT, C.E.P.; DIETZE, R. Evaluation of Kalazar detect rapid test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. In: **WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS**, 3., 2005. Italy. Abstract book...Italy, 2005. p160.

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* sp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.1-2, p.19-27, 2002.

LIMA-FILHO, J.H.C.; STEINDEL, M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose cutânea no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Catarinense Medicina**, v.27, n.1-4, p.25-31, 1998.

LINDOSO, J.A.L.; GOTO, H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. . **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.68, p.7-11, 2006.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Caderno Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 294-2947, 2008.

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

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PICILLO, E.; PAVONE, L.M.; GRAVINO, A.E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The veterinary journal**, n.177, p.279-282, 2008.

MARCONDES, C.B.; BITTENCOURT, I.A.; STOCO, P.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926)(Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Vianna)* sp. in Brazil. **The Royal Society of Tropical Medicine and Higyene**, v. 103, pag.1093-1097, 2009.

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

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology today**, v.16, n.5, p.188-189, 2000.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: Desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.23, suplemento 1, 2004.

METTLER, M.; GRIMN, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H. DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5515-5519, 2005.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in parasitology**, v.24, n.8, p.371-377, 2008.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS, M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.88, p.491-493, 1994.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental mode. **TRENDS in parasitology**, v.18, n.9, 2002.

OLIVEIRA, T.M.F.S. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em soros de cães do município de Jaboticabal, área não endêmica para a doença. 2004. 46f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; De CAPRARIIS, D.; STANNECK, D.; TESTINI, G.; GRIMM, F.; DEPLAZES, P.; CAPELLI, G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.3, p.337-343, 2009.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.236, n.11, p.1184-1191, 2010.

POCAI, E.A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.501-505, 1998.

QUEIRÓZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKE-BUZETTI, A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.34-40, 2010.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v.122, p.253-261, 1997.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.M.; KAYE, P.M.; SHAW, M.A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral

leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.31, p.161-168, 2003.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J.C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C.R. Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass-Screening Tool To Detect *Leishmania (Viannia)* sp. In Domestic Dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, p.1486-1493, apr, 2003.

REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.

RIBEIRO, C.R. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão no Distrito Federal – DF – Brasil. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 93f. 2007.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, n.3, p.267-275, 1990.

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

ROSS, R. Further notes on Leishmans bodies. *British Medical Journal*, v.1903, p. 1401, 1903.

ROSSETO, A.L.; EGER-MANGRICH, I.; FAYAD, L.; MACHADO, D.S.B.; SPECH, C.M.; MORAES, M.A. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana: Estudo Clínico e Epidemiológico de 50 casos autóctones no Vale do Itajaí, SC. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.39 (suppl 1), p134, 2006.

SALOMON, O.D.; SINAGRA, A.; NEVOT, M.C.; BARBERIAN, G.; PAULIN, P.; ESTEVEZ, J.O.; RIARTE, A.; ESTEVEZ, J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113, p.109-111, 2008.

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

SANTA ROSA, I.C.A; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, ano II, n.11, p.24-28, 1997.

SANTA BRÍGIDA, R.J.B.S. Estudo comparativo de diferentes substratos antigênicos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) utilizando teste imunoenzimático Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), no diagnóstico laboratorial sorológico das leishmanioses. 2004. 54f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2004.

SÃO THIAGO, P.T.; GUIDA, U. Leishmaniose Tegumentar no Oeste do estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina. Tropical**, v. 23, p.201-203, 1990.

SARAIVA, L.; CARVALHO, G.M.; GONTIJO, C.M.; QUARESMA, P.F.; LIMA, A.C.; FALCÃO, A.L. ANDRADE FILHO, J.D. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.46, p.1159-1163, 2009.

SHAW, JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. n.101, p.577-579, 2006.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p. 285-291, 2001.

SILVA, S.M.; RABELO, P.F.B.; GONTIJO, N.F.; RIBEIRO, R.R.; MELO, M.N.; RIBEIRO, V.M.; MICHALICKA, M.S.M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.174, p.150-154, 2010.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduated Medicine**, v.49, n.1, p.55-60, 2003.

SOARES M.J.V.; MORAES J.R.E.; PALMEIRA BORGES, V.; MIYAZATO L.G.; MORAES F.R. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**., v.11, n.4, p.579-593, 2005.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMIS, A.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; RODRIGUEZ, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for Leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, n.2, p.815-818, 2005.

STRAUSS, A.I.D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis (last pdate: 26 - Sep - 2001). In: CARMICHAEL, L. (Ed.) Recent advances in canine infectious diseases. Disponível em:<<http://www.lvis.org/advances/InfectDisCarmichael/baneth>> Acesso em 10 outubro 2012.

SWENSON, C.L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P.C.; JOHNSON, S.E.; WILKIE, D.A.; EATON, K.A.; KOCIBA, G.J. Visceral leishmaniasis in an English Foxhound from an Ohio research colony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, n.9, p.1090-1092, 1988.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSÓRIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sandflies. **Americana Journal of Tropical Medicine and Higyene**, v.64, p.119-124, 2001.

VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, L.S.V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M.D.; BIONDO, A.W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p.22-28, 2011.

VIOL, M.A.; LIMA, V.M.F.; AQUINO, M.C.C.; GALLO, G.; ALVES, I.P.; GENEROSO, D.; PERRI, S.H.V.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H.; NUNES, C.M.; BRESCIANI, K.D.S. Detection of cross infections by *Leishmania* sp. and *Trypanossoma* sp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitology research**, v.111, p.1607-1613, 2012.

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

WHO, World Health Organization. Magnitude of the problem (last update - 2001). Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html Acesso em 10 Outubro 2012.

ZANZARINI, P.D.; DOS SANTOS, D.R.; DOS SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.21, n.6, p.1957-1961, 2005.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.L.M.; LAURENTI, M.D.; VIDES, J.P.; SILVA, D.L.; ROSSI, C.N.; IKEDA-GARCIA, F.A.; ROSA, F.A.; SOBRINHO, L.S.V.; COSTA, D.C.; PERRI, S.H.V.; HAGIWARA, M.K.; MARCONDES, M. Occurrence of cross-reaction between canine visceral leishmaniasis and ehrlichiosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and immunochromatographic dipstick test. In American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) Forum, 2008. San Antonio, Texas. 26th Annual ACVIM Forum Proceedings, v.1, 2008.

ZANETTE, M.F. Comparação entre os métodos de ELIS, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Quadro demonstrando a relação dos bairros, agrupados em 13 distritos administrativos, de onde foram colhidas as amostras de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*L. i. chagasi* em cães do município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

DISTRITOS ADMINISTRATIVOS		
SEDE CONTINENTAL		
Bairros	Número de Amostras	Número Relativo
Capoeiras	17	3,5%
Jardim Atlântico	15	3,1%
Coqueiros	4	0,8%
Estreito	4	0,8%
Ipiranga	1	0,2%
Coloninha	3	0,6%
Abraão	2	0,4%
Morro da Caixa	2	0,4%
Monte Cristo	8	1,6%
SEDE INSULAR		
Itacorubi	44	9,0%
Agrônômica	20	4,1%
Trindade	16	3,3%
Centro	6	1,2%
João Paulo	6	1,2%
Córrego Grande	5	1,0%
Monte Verde	2	0,4%
Parque São Jorge	2	0,4%
Pantanal	7	1,4%
Santa Mônica	1	0,2%
Saco dos Limões	9	1,8%
Costeira	11	2,2%
Saco Grande	2	0,4%
Serrinha	2	0,4%
Morro da Cruz	1	0,2%
Morro do Horácio	1	0,2%
Pontal	1	0,2%
BARRA DA LAGOA		
Barra da Lagoa	27	5,5%
SÃO JOÃO DO RIO VERMELHO		
Rio Vermelho	61	12,4%
INGLESES DO RIO VERMELHO		
Inglese	12	2,4%

Santinho	1	0,2%
LAGOA DA CONCEIÇÃO		Continua
Costa da Lagoa	2	0,4%
Lagoa da Conceição	1	0,2%
Canto da Lagoa	2	0,4%
SANTO ANTÔNIO DE LISBOA		
Santo Antônio de Lisboa	1	0,2%
Sambaqui	7	1,4%
Cacupé	4	0,8%
RIBEIRÃO DA ILHA		
Ribeirão da Ilha	23	4,7%
Tapera	30	6,1%
Carianos	6	1,2%
CACHOEIRA DO BOM JESES		
Cachoeira do Bom Jesus	4	0,8%
Vargem do Bom Jesus	23	4,7%
Vargem Grande	16	3,3%
Praia Brava	1	0,2%
CAMPECHE		
Campeche	11	2,2%
Rio Tavares	16	3,3%
Morro das Pedras	8	1,6%
CANASVIEIRAS		
Canasvieiras	9	1,8%
Vargem Pequena	2	0,4%
Jurerê	1	0,2%
RATONES		
Ratones	28	5,7%
PÂNTANO DO SUL		
Pântano do Sul	3	0,6%
Total	491	100,0%

Apêndice B – Quadro representando os resultados individuais dos exames sorológicos e da PCR dos 491 animais avaliados durante o período de janeiro a junho de 2011, no centro de controle de zoonoses do município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

AMOSTRA	ELISA	RIFI	PCR
1	0,043	Negativo	-
2	0,084	Negativo	-
3	0,065	Negativo	-
4	0,030	Negativo	-
5	0,060	Negativo	-
6	0,058	Negativo	-
7	0,045	Negativo	-
8	0,050	Negativo	-
9	0,024	Negativo	-
10	0,051	Negativo	-
11	0,029	Negativo	-
12	0,068	Negativo	-
13	0,043	Negativo	-
14	0,079	Positivo	Negativo
15	0,056	Negativo	-
16	0,081	Negativo	-
17	0,117	Negativo	-
18	0,123	Negativo	-
19	0,098	Negativo	-
20	0,038	Negativo	-
21	0,038	Negativo	-
22	0,028	Negativo	-
23	0,152	Positivo	Negativo
24	0,146	Negativo	-
25	0,057	Negativo	-
26	0,055	Negativo	-
27	0,109	Negativo	-
28	0,066	Negativo	-
29	0,031	Negativo	-
30	0,032	Negativo	-
31	0,050	Negativo	-
32	0,028	Negativo	-
33	0,064	Negativo	-
34	0,136	Negativo	-
35	0,061	Negativo	-
36	0,033	Negativo	-
37	0,170	Negativo	-
38	0,039	Negativo	-
39	0,127	Negativo	-
40	0,057	Negativo	-
41	0,014	Negativo	-

Continua

Continuação

42	0,048	Negativo	-
43	0,076	Negativo	-
44	0,073	Negativo	-
45	0,061	Negativo	-
46	0,027	Negativo	-
47	0,062	Negativo	-
48	0,063	Negativo	-
49	0,022	Negativo	-
50	0,086	Negativo	-
51	0,046	Negativo	-
52	0,031	Negativo	-
53	0,049	Negativo	-
54	0,045	Negativo	-
55	0,038	Negativo	-
56	0,062	Negativo	-
57	0,026	Negativo	-
58	0,021	Negativo	-
59	0,035	Negativo	-
60	0,051	Negativo	-
61	0,054	Negativo	-
62	0,038	Negativo	-
63	0,025	Negativo	-
64	0,031	Negativo	-
65	0,039	Negativo	-
66	0,052	Negativo	-
67	0,057	Negativo	-
68	0,040	Negativo	-
69	0,019	Negativo	-
70	0,045	Negativo	-
71	0,046	Negativo	-
72	0,058	Negativo	-
73	0,040	Negativo	-
74	0,053	Negativo	-
75	0,067	Negativo	-
76	0,017	Negativo	-
77	0,060	Negativo	-
78	0,037	Negativo	-
79	0,057	Negativo	-
80	0,073	Negativo	-
81	0,054	Negativo	-
82	0,018	Negativo	-
83	0,146	Negativo	-
84	0,057	Negativo	-
85	0,018	Negativo	-
86	0,051	Negativo	-
87	0,033	Negativo	-
88	0,028	Negativo	-
89	0,058	Negativo	-

Continua

Continuação

90	0,052	Negativo	-
91	0,029	Negativo	-
92	0,061	Negativo	-
93	0,060	Negativo	-
94	0,055	Negativo	-
95	0,077	Negativo	-
96	0,050	Negativo	-
97	0,073	Negativo	-
98	0,053	Negativo	-
99	0,050	Negativo	-
100	0,039	Negativo	-
101	0,014	Negativo	-
102	0,073	Negativo	-
103	0,030	Negativo	-
104	0,019	Negativo	-
105	0,075	Negativo	-
106	0,032	Negativo	-
107	0,024	Negativo	-
108	0,041	Negativo	-
109	0,058	Negativo	-
110	0,035	Negativo	-
111	0,024	Negativo	-
112	0,056	Positivo	Negativo
113	0,043	Positivo	Negativo
114	0,063	Negativo	-
115	0,058	Negativo	-
116	0,030	Negativo	-
117	0,125	Negativo	-
118	0,055	Negativo	-
119	0,100	Negativo	-
120	0,015	Negativo	-
121	0,020	Negativo	-
122	0,015	Negativo	-
123	0,020	Positivo	Negativo
124	0,004	Negativo	-
125	0,007	Negativo	-
126	0,006	Negativo	-
127	0,026	Negativo	-
128	0,013	Negativo	-
129	0,008	Negativo	-
130	0,010	Negativo	-
131	0,034	Positivo	Negativo
132	0,012	Negativo	-
133	0,044	Negativo	-
134	0,013	Negativo	-
135	0,034	Negativo	-
136	0,066	Negativo	-
137	0,079	Negativo	-

Continua

Continuação

138	0,060	Negativo	-
139	0,047	Negativo	-
140	0,171	Negativo	-
141	0,062	Negativo	-
142	0,047	Negativo	-
143	0,062	Negativo	-
144	0,026	Negativo	-
145	0,083	Negativo	-
146	0,090	Negativo	-
147	0,054	Negativo	-
148	0,052	Negativo	-
149	0,040	Negativo	-
150	0,037	Negativo	-
151	0,038	Negativo	-
152	0,060	Negativo	-
153	0,053	Positivo	Negativo
154	0,052	Negativo	-
155	0,055	Negativo	-
156	0,044	Negativo	-
157	0,048	Negativo	-
158	0,060	Negativo	-
159	0,073	Positivo	Negativo
160	0,028	Positivo	Negativo
161	0,039	Negativo	-
162	0,056	Negativo	-
163	0,051	Negativo	-
164	0,071	Positivo	Negativo
165	0,051	Negativo	-
166	0,036	Negativo	-
167	0,057	Negativo	-
168	0,041	Positivo	Negativo
169	0,083	Negativo	-
170	0,056	Negativo	-
171	0,077	Positivo	Negativo
172	0,139	Negativo	-
173	0,174	Negativo	-
174	0,046	Negativo	-
175	0,095	Negativo	-
176	0,045	Positivo	Negativo
177	0,074	Negativo	-
178	0,083	Negativo	-
179	0,091	Negativo	-
180	0,038	Negativo	-
181	0,018	Negativo	-
182	0,013	Negativo	-
183	0,039	Positivo	Negativo
184	0,034	Positivo	Negativo
185	0,056	Positivo	Negativo

Continua

Continuação

186	0,038	Positivo	Negativo
187	0,014	Negativo	-
188	0,030	Negativo	-
189	0,025	Negativo	-
190	0,044	Positivo	Negativo
191	0,055	Positivo	Negativo
192	0,051	Negativo	-
193	0,030	Negativo	-
194	0,018	Negativo	-
195	0,042	Negativo	-
196	0,017	Negativo	-
197	0,023	Negativo	-
198	0,029	Negativo	-
199	0,033	Negativo	-
200	0,055	Negativo	-
201	0,015	Negativo	-
202	0,044	Negativo	-
203	0,040	Negativo	-
204	0,027	Negativo	-
205	0,014	Negativo	-
206	0,023	Negativo	-
207	0,079	Negativo	-
208	0,046	Negativo	-
209	0,022	Negativo	-
210	0,010	Negativo	-
211	0,031	Negativo	-
212	0,015	Negativo	-
213	0,018	Negativo	-
214	0,037	Negativo	-
215	0,012	Negativo	-
216	0,006	Negativo	-
217	0,030	Negativo	-
218	0,018	Negativo	-
219	0,030	Negativo	-
220	0,054	Negativo	-
221	0,024	Negativo	-
222	0,036	Negativo	-
223	0,021	Negativo	-
224	0,053	Negativo	-
225	0,053	Negativo	-
226	0,042	Negativo	-
227	0,061	Negativo	-
228	0,057	Negativo	-
229	0,092	Negativo	-
230	0,030	Negativo	-
231	0,061	Negativo	-
232	0,032	Negativo	-
233	0,081	Negativo	-

Continua

Continuação

234	0,060	Negativo	-
235	0,034	Negativo	-
236	0,049	Negativo	-
237	0,045	Negativo	-
238	0,077	Negativo	-
239	0,025	Negativo	-
240	0,124	Negativo	-
241	0,070	Negativo	-
242	0,058	Negativo	-
243	0,048	Negativo	-
244	0,055	Negativo	-
245	0,051	Negativo	-
246	0,091	Negativo	-
247	0,168	Negativo	-
248	0,027	Negativo	-
249	0,051	Negativo	-
250	0,190	Negativo	-
251	0,030	Negativo	-
252	0,070	Negativo	-
253	0,072	Negativo	-
254	0,036	Negativo	-
255	0,051	Negativo	-
256	0,051	Negativo	-
257	0,067	Negativo	-
258	0,113	Negativo	-
259	0,023	Negativo	-
260	0,025	Negativo	-
261	0,019	Negativo	-
262	0,035	Negativo	-
263	0,018	Negativo	-
264	0,017	Negativo	-
265	0,022	Negativo	-
266	0,025	Negativo	-
267	0,017	Negativo	-
268	0,009	Negativo	-
269	0,023	Negativo	-
270	0,027	Negativo	-
271	0,017	Negativo	-
272	0,041	Negativo	-
273	0,043	Negativo	-
274	0,080	Negativo	-
275	0,051	Negativo	-
276	0,029	Negativo	-
277	0,017	Negativo	-
278	0,037	Negativo	-
279	0,018	Negativo	-
280	0,022	Negativo	-
281	0,010	Negativo	-

Continua

Continuação

282	0,049	Negativo	-
283	0,018	Negativo	-
284	0,084	Negativo	-
285	0,022	Negativo	-
286	0,017	Negativo	-
287	0,019	Negativo	-
288	0,022	Negativo	-
289	0,024	Negativo	-
290	0,044	Negativo	-
291	0,022	Negativo	-
292	0,030	Negativo	-
293	0,036	Negativo	-
294	0,026	Negativo	-
295	0,048	Negativo	-
296	0,058	Negativo	-
297	0,036	Negativo	-
298	0,022	Negativo	-
299	0,013	Negativo	-
300	0,018	Negativo	-
301	0,023	Negativo	-
302	0,015	Negativo	-
303	0,055	Negativo	-
304	0,033	Negativo	-
305	0,040	Negativo	-
306	0,008	Negativo	-
307	0,044	Negativo	-
308	0,030	Negativo	-
309	0,059	Negativo	-
310	0,059	Negativo	-
311	0,043	Positivo	Negativo
312	0,023	Negativo	-
313	0,035	Negativo	-
314	0,019	Negativo	-
315	0,094	Negativo	-
316	0,044	Negativo	-
317	0,023	Negativo	-
318	0,063	Negativo	-
319	0,056	Negativo	-
320	0,137	Negativo	-
321	0,049	Negativo	-
322	0,044	Negativo	-
323	0,016	Negativo	-
324	0,020	Negativo	-
325	0,036	Negativo	-
326	0,062	Negativo	-
327	0,024	Negativo	-
328	0,049	Negativo	-
329	0,009	Negativo	-

Continua

Continuação

330	0,035	Negativo	-
331	0,119	Negativo	-
332	0,036	Negativo	-
333	0,058	Negativo	-
334	0,041	Negativo	-
335	0,057	Negativo	-
336	0,053	Negativo	-
337	0,044	Negativo	-
338	0,067	Negativo	-
339	0,060	Negativo	-
340	0,025	Negativo	-
341	0,036	Negativo	-
342	0,009	Negativo	-
343	0,062	Negativo	-
344	0,022	Negativo	-
345	0,063	Negativo	-
346	0,018	Negativo	-
347	0,010	Negativo	-
348	0,018	Negativo	-
349	0,037	Negativo	-
350	0,036	Negativo	-
351	0,070	Negativo	-
352	0,025	Negativo	-
353	0,009	Negativo	-
354	0,012	Negativo	-
355	0,041	Negativo	-
356	0,056	Negativo	-
357	0,057	Negativo	-
358	0,031	Negativo	-
359	0,040	Negativo	-
360	0,015	Negativo	-
361	0,019	Negativo	-
362	0,088	Negativo	-
363	0,061	Negativo	-
364	0,050	Negativo	-
365	0,031	Negativo	-
366	0,099	Negativo	-
367	0,185	Negativo	-
368	0,097	Negativo	-
369	0,074	Negativo	-
370	0,038	Negativo	-
371	0,054	Negativo	-
372	0,047	Negativo	-
373	0,054	Negativo	-
374	0,055	Negativo	-
375	0,043	Negativo	-
376	0,059	Negativo	-
377	0,068	Negativo	-

Continua

Continuação

378	0,064	Negativo	-
379	0,084	Negativo	-
380	0,030	Negativo	-
381	0,101	Negativo	-
382	0,065	Negativo	-
383	0,054	Negativo	-
384	0,062	Negativo	-
385	0,083	Negativo	-
386	0,084	Negativo	-
387	0,039	Negativo	-
388	0,035	Negativo	-
389	0,096	Negativo	-
390	0,062	Negativo	-
391	0,046	Negativo	-
392	0,030	Negativo	-
393	0,094	Negativo	-
394	0,044	Negativo	-
395	0,023	Negativo	-
396	0,063	Negativo	-
397	0,056	Negativo	-
398	0,137	Negativo	-
399	0,049	Negativo	-
400	0,044	Negativo	-
401	0,350	Negativo	Negativo
402	0,093	Negativo	-
403	0,027	Negativo	-
404	0,046	Negativo	-
405	0,042	Negativo	-
406	0,035	Negativo	-
407	0,099	Negativo	-
408	0,100	Negativo	-
409	0,042	Negativo	-
410	0,098	Negativo	-
411	0,040	Negativo	-
412	0,029	Negativo	-
413	0,055	Negativo	-
414	0,050	Negativo	-
415	0,142	Negativo	-
416	0,045	Negativo	-
417	0,071	Negativo	-
418	0,046	Negativo	-
419	0,095	Negativo	-
420	0,050	Negativo	-
421	0,080	Negativo	-
422	0,091	Negativo	-
423	0,044	Negativo	-
424	0,027	Negativo	-
425	0,033	Negativo	-

Continua

Continuação

426	0,065	Negativo	-
427	0,055	Negativo	-
428	0,037	Negativo	-
429	0,043	Negativo	-
430	0,051	Negativo	-
431	0,082	Negativo	-
432	0,077	Negativo	-
433	0,036	Negativo	-
434	0,148	Negativo	-
435	0,193	Negativo	-
436	0,057	Negativo	-
437	0,063	Negativo	-
438	0,062	Positivo	Negativo
439	0,075	Negativo	-
440	0,252	Negativo	-
441	0,061	Negativo	-
442	0,111	Negativo	-
443	0,098	Negativo	-
444	0,041	Negativo	-
445	0,069	Negativo	-
446	0,079	Negativo	-
447	0,038	Negativo	-
448	0,037	Negativo	-
449	0,045	Negativo	-
450	0,036	Negativo	-
451	0,074	Negativo	-
452	0,053	Negativo	-
453	0,033	Negativo	-
454	0,057	Negativo	-
455	0,033	Negativo	-
456	0,109	Positivo	Negativo
457	0,140	Negativo	-
458	0,014	Negativo	-
459	0,036	Positivo	Negativo
460	0,029	Negativo	-
461	0,018	Negativo	-
462	0,027	Negativo	-
463	0,023	Negativo	-
464	0,022	Negativo	-
465	0,026	Negativo	-
466	0,004	Negativo	-
467	-0,001	Negativo	-
468	0,002	Negativo	-
469	0,044	Negativo	-
470	0,053	Negativo	-
471	0,019	Negativo	-
472	0,029	Negativo	-
473	0,006	Negativo	-

Continua

Continuação

474	0,012	Negativo	-
475	0,029	Negativo	-
476	0,028	Negativo	-
477	0,011	Negativo	-
478	0,027	Negativo	-
479	0,033	Negativo	-
480	0,008	Negativo	-
481	0,020	Negativo	-
482	0,019	Negativo	-
483	0,008	Negativo	-
484	0,026	Negativo	-
485	0,035	Negativo	-
486	0,006	Negativo	-
487	0,028	Negativo	-
488	0,015	Negativo	-
489	0,029	Negativo	-
490	0,031	Negativo	-
491	0,45	Positivo	Positivo