



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose
canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.**

ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Sanidade de Animais Domésticos e Selvagens
Orientadora: Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa
Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato.

Cuiabá - MT
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida

Título: Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em 09 de fevereiro de 2009.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa (Orientadora)
(Departamento de Clínica Médica Veterinária/FAMEV/UFMT)

Dra. Maria de Fátima Madeira
(Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dr. Luciano Nakazato
(Departamento de Clínica Médica Veterinária/FAMEV/UFMT)

Profa. Dra. Valéria Dutra
(Departamento de Clínica Médica Veterinária/FAMEV/UFMT)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me sustentar e motivar em todos os momentos da minha vida.

Agradeço grandemente a minha família, em especial a minha mãe Maria da Glória Ferreira, pelas orações, amor, confiança e incentivo.

A minha orientadora, Prof. Dra. Valéria Régia Franco Sousa pela amizade, carinho, dedicação e por ser tão presente na minha vida. Obrigada pelo apoio, ensinamentos, pelas õbrigasö, como vou sentir falta delas e por me lembrar a quem devo dedicar a minha vida.

As Médicas Veterinárias Maria Fernanda Aranega Pimentel, Renata Pereira de Faria, mestrandas Magyda Arabia Araji Dahroug e Nívea Clarice Monteiro Rocha Turbino e técnica de laboratório Maricilda de Abreu e todos os estagiários que me ajudaram nas coletas a campo. Obrigada pelo auxílio, pois sem a ajuda de vocês o trabalho seria mais difícil e por tornarem as coletas mais prazerosas. Passamos por bons momentos!!!!!!

A todos os funcionários do HOVET-UFMT, membros do setor administrativo, técnicas de enfermagem e pessoal do serviço geral que sempre me auxiliaram e se preocuparam comigo, me proporcionando ambiente familiar, composto de muita solidariedade, fraternidade e alegria.

Aos residentes, mestrandos e estagiários do HOVET-UFMT pelo auxílio no desenvolvimento do projeto, além dos inúmeros momentos de descontração. Obrigada por tornarem meus dias mais alegres!!!!!!!!!!

As bolsistas de iniciação científica Agrádia Gonçalves de Freitas, Luana Gabriela Ferreira dos Santos e Eveline da Cruz Boa Sorte pelo auxílio nas coletas e processamento das amostras.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos ensinamentos, em especial ao Prof. Dr. Luciano Nakazato pela co-orientação e a Profa. Dra. Valéria Dutra.

Aos estagiários e mestrandos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular por me acolherem em seu local de trabalho, em especial a Daphine Ariadne Jesus de Paula pela ajuda no desenvolvimento das técnicas moleculares, sempre prestativa e paciente.

A Profa. Dra. Adriane Jorge Mendonça pela atenção, carinho e exemplo e por ceder espaço no seu laboratório para montarmos o Laboratório de Leishmanioses, propiciando desenvolvimento do projeto. A técnica de laboratório Maria do Carmo Aragão pelos auxílios laboratoriais.

A Coordenação de Apoio a Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), FAPEMAT e CNPq-DECIT pelo apoio financeiro.

RESUMO

ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soropidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.** 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

Leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem e outros vertebrados, por dípteros da subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus* sp e *Lutzomyia* sp). Consideradas doença de ambiente rural, as leishmanioses vêm passando por mudança em seu perfil epidemiológico, sendo registradas em ambiente urbano, tendo o cão importante papel na manutenção da doença neste ambiente. Este trabalho objetivou estudar a leishmaniose canina através da pesquisa de anticorpos e DNA de *Leishmania* sp em cães domiciliados em áreas endêmicas de Cuiabá, Mato Grosso, bem como diferenciar as espécies de *Leishmanias* presentes na infecção canina do município. Dos 468 cães analisados, 16 (3,4%) foram reagentes na imunofluorescência indireta. Não foi observada predisposição racial, sexual e etária para a ocorrência da leishmaniose canina. Os principais fatores de risco elencados na ocorrência da doença canina na cidade de Cuiabá foram à localização dos cães no peridomicílio, bem como a proximidade das residências a matas, evidenciando mudanças na ocorrência da doença no ambiente urbano. De 181 destes cães realizou-se PCR-RFLP em amostras de medula óssea e linfonodo obtendo-se positividade em 45 (24,9%). O aspirado de medula óssea apresentou superioridade estatisticamente significativa em detectar DNA de *Leishmania* sp na presente pesquisa ($p < 0,05$). Através da PCR-RFLP identificou-se *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agente da leishmaniose visceral, nas amostras de cães domiciliados em Cuiabá, podendo desta forma auxiliar nas medidas de prevenção e controle da doença na região.

Palavras Chaves: Leishmanioses, cão, epidemiologia, PCR-RFLP, Cuiabá, Mato Grosso

ABSTRACT

ALMEIDA, A. B. P. F. **Seroepidemiological investigation and characterization of canine leishmaniasis by PCR-RFLP in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil.** 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

Leishmaniasis are zoonosis caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted to humans and other vertebrates, flies in the subfamily Phlebotominae (*Phlebotomus* sp and *Lutzomyia* sp). Disease considered rural environment, the leishmaniasis comes through change in its epidemiological profile, and is registered in the urban environment, taking the dog important role in maintaining the disease in this environment. This study investigated the canine leishmaniasis through search of antibodies and DNA of *Leishmania* sp in dogs residing in endemic areas of Cuiaba, Mato Grosso, as well as differentiate the species of *Leishmania* infection in the canine the council. From the 468 dogs examined, 16 (3,4%) were reactive in indirect immunofluorescence. There was no racial bias, sexual and age for the occurrence of canine leishmaniasis. The main risk factors listed in the occurrence of canine disease in the city of Cuiaba to the location of the dogs were peridomiliary and the proximity of residences to forests, showing changes in the occurrence of the disease in the urban environment. 181 of these dogs was carried out PCR-RFLP in samples of bone marrow and lymph node was positive in getting 45 (24,9%). The bone marrow aspirate showed statistically significant superiority to detect DNA of *Leishmania* sp in this study ($p < 0.05$). By PCR-RFLP was identified *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agent of visceral leishmaniasis, in samples of dogs domiciled in Cuiaba and can thus help in prevention measures and control of disease in the region.

Key words: Leishmaniasis, dog, epidemiology, PCR-RFLP, Cuiaba, Mato Grosso

SUMÁRIO

1. Capítulo 1. INTRODUÇÃO	8
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
1.2.1. Histórico.....	10
1.2.2. Agente Etiológico e Classificação.....	11
1.2.3. Ciclo Biológico e Formas de Transmissão das Leishmanioses.....	12
1.2.4. Principais Reservatórios das Leishmanioses.....	14
1.2.5. Aspectos Epidemiológicos das Leishmanioses.....	15
1.2.6. Características Clínicas das Leishmanioses.....	18
1.2.7. Métodos Diagnósticos.....	21
1.2.7.1 Exames Parasitológicos.....	21
1.2.7.2 Métodos Imunológicos.....	22
1.2.7.3 Métodos Moleculares.....	24
1.2.8. Tratamento.....	25
1.2.9. Prevenção e Controle.....	27
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
2. Capítulo 2. INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LEISHMANIOSE CANINA EM ÁREAS ENDÊMICAS DE CUIABÁ, MATO GROSSO	41
3. Capítulo 3. CHARACTERIZATION OF CANINE LEISHMANIASIS BY PCR-RFLP IN CUIABA, MATO GROSSO, BRAZIL	53

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses, doenças endêmicas registradas em países do Velho Mundo e do Novo Mundo, são doenças infecciosas que acometem humanos e outros vertebrados, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por dípteros da subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus* sp. e *Lutzomyia* sp.). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie envolvida e da relação parasita com seu hospedeiro. Tais doenças são importantes pelo impacto que produzem na saúde pública e nas implicações econômicas que geram, apresentando alta incidência, letalidade, constituindo em sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho (Boraschi e Nunes, 2007), sendo consideradas doenças negligenciadas e em expansão no Brasil.

Essas zoonoses vêm apresentando ampla distribuição geográfica, sendo registrada em áreas consideradas, previamente como não endêmicas, passando de doenças de ambiente silvestre e rural, que acometiam pessoas que adentravam em florestas, para doenças de ambiente urbano, associada a adaptação do vetor a estes locais, proporcionado pelas alterações sofridas em seu habitat natural aliado a condições higiênico-sanitárias precárias da população que comumente residem na periferia das grandes cidades.

Diversos mamíferos podem se infectar com *Leishmania* sp., no entanto, com a urbanização das leishmanioses, o cão adquiriu grande importância como reservatório da leishmaniose visceral, no ambiente doméstico devido a sua convivência estreita com o homem, elevada ocorrência de infecções inaparentes e intenso parasitismo cutâneo, representando uma fonte de infecção preferencial para o vetor, sendo importante na transmissão da doença para o homem. Na forma cutânea a importância do cão como reservatório ainda não está completamente elucidada, sendo considerado atualmente

hospedeiro acidental, mantendo o vetor no ambiente e conseqüentemente o ciclo de transmissão.

Neste contexto o estudo da importância desses animais na cadeia epidemiológica das leishmanioses em áreas de ocorrência dessas zoonoses torna-se de importância para promover medidas de prevenção e controle adequadas em cada região. Mato Grosso é considerado região endêmica para leishmaniose tegumentar e visceral, observando-se ao longo dos anos um incremento no número de casos, bem como expansão para áreas consideradas não endêmicas.

O aumento no número de casos de leishmanioses no Brasil e em Mato Grosso, bem como a importância do cão na epidemiologia das mesmas, foram pontos que proporcionaram o desenvolvimento desta pesquisa. Esta dissertação teve por objetivo estudar a leishmaniose canina através da pesquisa de anticorpos e DNA de *Leishmania* sp em cães domiciliados em áreas endêmicas de Cuiabá, Mato Grosso, bem como diferenciar as espécies de *Leishmanias* presentes na infecção canina do município. Os resultados serão apresentados na forma de 2 artigos científicos, seguindo as normas de publicação da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (capítulo 2) e Veterinary Parasitology (capítulo 3)

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Histórico

Os textos do período inca do século XV e XVI e durante a colonização espanhola mencionam o risco de trabalhadores da agricultura retornarem dos Andes com úlcera na pele atribuindo-se a denominação *õValley sicknessõ* ou *õAndean sicknessõ*. Depois da desfiguração do nariz e da boca foi conhecida como lepra branca. Alexander Russel em 1756 descreveu minuciosamente as alterações clínicas de paciente proveniente da Turquia que apresentava a forma cutânea da doença (WHO, 2008). No entanto, as primeiras descrições feitas do parasito *Leishmania* datam de fins do século XIX. Em 1898, Borovsky a identificou em um paciente com a forma cutânea da doença (Rey, 2001a).

A leishmaniose visceral foi descrita na Grécia em 1835 sendo denominada *õponosõ* ou *õhapoplinakonõ*. Foi na Índia em 1869 que recebeu o nome *õkala-jwarõ* que quer dizer febre negra ou *õkala-azarõ* que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (Marzochi et al., 1981). Em 1900, William Leishman identificou um protozoário no baço de um soldado indiano que viera a óbito em decorrência de uma febre local conhecida como febre *õDum-Dumõ* ou *õKala-azarõ*. Suas anotações não foram publicadas até 1903 quando Charles Donovan encontrou o mesmo parasito em outro paciente. No mesmo ano, Major Ross nomeou este parasito de *Leishmania donovani* criando o gênero *Leishmania* (Badaró e Duarte, 1996; Prata e Silva, 2005).

O primeiro relato do parasito no continente americano data de 1931, onde Migone descreve um caso no Paraguai de paciente proveniente do Estado de Mato Grosso, Brasil. Neste país, o primeiro relato de leishmaniose visceral ocorreu em 1934 por Penna que

encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela (Badaró e Duarte, 1996; Rey, 2001a).

Em 1936, Evandro Chagas descreveu o primeiro caso *in vivo* de leishmaniose visceral no Brasil e em 1937, Cunha e Chagas estabeleceram o seu agente etiológico, denominando-o de *Leishmania donovani chagasi* (Badaró e Duarte, 1996).

A participação dos cães como reservatórios da leishmaniose foi descrita por Charles Nicolle em 1908 através de estudos experimentais e a comprovação da participação de insetos na transmissão da doença foi feita por Cerqueira em 1920 e por Aragão em 1922 (Rey, 2001a).

1.2.2. Agente Etiológico e Classificação

As leishmanias são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Atualmente são conhecidas 30 espécies de *Leishmania*, sendo que aproximadamente 20 são patogênicas para o homem (Ashford, 2000).

O reconhecimento das espécies de *Leishmania* é baseado em características morfológicas, pela sua localização nos tecidos do hospedeiro, pela patogenicidade e tipo de lesões que produz, e também por critérios clínicos, epidemiológicos e isoenzimáticos. Classificação de Lainson e Shaw (1987) divide o gênero *Leishmania* nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

Dentre as espécies dermatrópicas encontram-se no subgênero *Leishmania* as espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi* e *L. venezuelensis*, causando alterações cutâneas, podendo *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) pifanoi* causarem a forma cutânea difusa. Os membros do subgênero *Viannia* causadoras de lesões cutâneas são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L.*

lainsoni, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. shawi*, *L. lindenbergi*, *L. colombiensis*. *Leishmania braziliensis* pode acometer as mucosas, sendo que as espécies *L. guyanensis* e *L. panamensis* raramente o causam (Da Cruz e Pirmez, 2005).

As espécies causadoras de leishmaniose visceral pertencem ao subgênero *Leishmania*, complexo *Leishmania donovani*. Neste complexo incluem-se as espécies *Leishmania donovani*, causadora do calazar na Índia, Paquistão, Bangladesh e em países da África Oriental; *Leishmania infantum* responsável pelo calazar no Mediterrâneo, África Central e Ocidental, Oriente Médio e China. Nas Américas, a leishmaniose visceral é causada por *Leishmania chagasi* (Prata e Silva, 2005; Rey, 2001a; Rey, 2001b).

Alguns autores através de pesquisas imunológicas e genéticas têm demonstrado não haver diferenças significativas entre *L. infantum* e *L. chagasi* aliando a isso a introdução do calazar nas Américas por cães ou pacientes vindos da Bacia do Mediterrâneo e adaptação a um ecossistema onde o cão, o homem e flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* mantém o ciclo parasitário (Mauricio et al., 2000; Rey, 2001b). Entretanto Shaw (1994) evidencia diferenças entre as espécies quanto à antigenicidade e estrutura molecular.

1.2.3. Ciclo Biológico e Formas de Transmissão das Leishmanioses

As leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem dentro do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos suscetíveis (Badaró e Duarte, 1996). A reprodução ocorre por divisão binária, apresentando-se na forma flagelada e extracelularmente no trato intestinal do vetor sendo denominada promastigota e em uma fase intracelular e sem flagelo livre chamada amastigota, nos hospedeiros vertebrados (Ashford, 2000; Prata e Silva, 2005).

No seu ciclo biológico encontram-se vetores, dípteros da família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (Dantas-Torres et al., 2007) e conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui e tatuquira, caracterizados pelo pequeno porte, 1 a 3 mm de comprimento, corpo e patas cobertas de cerdas, por manter em repouso as asas em posição vertical, possuindo atividade crepuscular e noturna (MS, 2006). Epidemiologicamente as fêmeas apresentam maior importância por serem hematófagas. Com a urbanização esses vetores têm sido encontrados em ambiente peridomiciliar e domiciliares (Feitosa, 2002; Prata e Silva, 2005; MS, 2006).

A infecção dos flebotomíneos ocorre pela ingestão, durante o repasto sanguíneo, das formas amastigostas de *Leishmania* presentes na derme do hospedeiro infectado, as quais passarão a evoluir no trato digestivo do inseto para formas promastigotas. Ao exercer o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado, o flebotomíneo inocula as formas promastigotas infectantes presentes em seu trato digestivo anterior, diferenciando-se em amastigotas que se disseminam pelos tecidos dos vertebrados na forma visceral ou mantêm-se na pele nas dermatópicas (Prata e Silva, 2005; Missawa et al., 2008).

Apesar de a transmissão vetorial por flebotomíneos ser a mais importante na epidemiologia da leishmaniose, tem-se relatado outras vias de infecção. Carrapatos e pulgas têm sido estudados, experimentalmente, como possíveis transmissores da leishmaniose visceral. Tais autores, utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase conseguiram detectar DNA de *Leishmania* sp em carrapatos após parasitarem cães infectados com o agente, sugerindo possível ação vetorial dos mesmos (Coutinho et al., 2005; Coutinho e Linardi, 2007). Shaw (2007) relata a transmissão de leishmaniose visceral através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos.

1.2.4. Principais Reservatórios das Leishmanioses

Devido à complexidade das leishmanioses, o conhecimento de seus reservatórios é de extrema importância para determinar o ciclo natural do parasito e da epidemiologia da doença. Com algumas exceções as leishmanioses são zoonoses e o homem se infecta acidentalmente (WHO, 2008).

Os reservatórios primários das *Leishmania* são mamíferos selvagens, como os roedores e canídeos silvestres (Dantas-Torres, 2007; Sobrino et al., 2008). Com o incremento do processo de domiciliação do ciclo zoonótico de transmissão das leishmanioses, animais sinantrópicos e domésticos tem assumido importância relevante na infecção (Dantas-Torres, 2007). De acordo com Cabrera et al. (2003) a importância dos animais sinantrópicos associa-se a sua alimentação onívora dos mesmos aliados ao fato de viverem em ambiente florestal e habitações humanas tornando-os elo importante entre transmissão silvestre, peridomiciliar e domiciliar do parasito. Além destes, eqüídeos, felinos e roedores tem sido identificados como reservatórios (Savani et al., 2004; Dantas-Torres et al., 2006; Camargo et al., 2007; Nasereddin et al., 2008).

Com o processo de urbanização das leishmanioses, o cão adquiriu grande importância como reservatório da *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agente da leishmaniose visceral, no ambiente doméstico devido a sua convivência estreita com o homem. A elevada ocorrência de infecções inaparentes e oligossintomáticos nestes animais, associado ao intenso parasitismo cutâneo, representando uma fonte de infecção preferencial para o vetor, sendo importante na transmissão da doença para o homem. Em áreas endêmicas a prevalência de leishmaniose em cães é alta, acometendo em torno de 20 a 40% da população (Feitosa et al., 2000; Palatnik-de-Souza et al., 2001; Silva et al., 2001; Alvar et al., 2004).

Estudos relatam não haver predisposição sexual, racial ou etária na doença canina (Noli, 1999; Feitosa et al., 2000; Gontijo e Melo, 2004), sendo a maior incidência da doença em cães associada a moradias próximas de matas e ao compartilhamento do peridomicílio com galinhas, porcos e gambás (Boraschi e Nunes, 2007). Solano-Gallego et al. (2000) descrevem resistência da raça *Ibizian hound* à infecção por *Leishmania* por apresentar uma resposta imune celular significativa ao parasito. Autores descrevem maior acometimento dos cães de pêlo curto associado a baixa barreira mecânica fornecida ao vetor (Boraschi e Nunes, 2007).

Na forma cutânea a importância do cão como reservatório ainda não está completamente elucidada, é considerado atualmente hospedeiro acidental, servindo como mantenedor do vetor no ambiente e conseqüentemente do ciclo de transmissão (Madeira et al., 2003; Dantas-Torres, 2007).

Mestre e Fontes (2007) divulgaram dados de inquéritos caninos realizados em áreas urbanas e periurbanas de 49 municípios de Mato Grosso, no período de 1998 a 2005, revelando uma prevalência de 9% para o estado, e 8,4% desse total para a capital Cuiabá.

1.2.5. Aspectos Epidemiológicos das Leishmanioses

A Organização Mundial da Saúde estima que existam 12 milhões de casos de leishmaniose em todo mundo, com uma mortalidade anual de 60 mil pessoas, sendo o tamanho da população em risco de 350 milhões. O número de novos casos por ano de leishmaniose cutânea em todo o mundo é de 1,5 milhões de pessoas e da forma visceral de 500.000 novos casos anualmente, destes mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão e Brasil (WHO, 2008).

Atualmente as leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica, sendo registrada em áreas consideradas, previamente como não endêmicas (WHO, 2002). Em seu contexto epidemiológico as leishmanioses vêm passando por processo de transformação, anteriormente doenças de ambiente silvestre e rural, acometendo pessoas que adentravam em florestas e conviviam em proximidade com animais sinantrópicos (WHO, 2008), passam por um processo de urbanização, provocando alterações em sua epidemiologia (Monteiro et al., 2005), tornando-se endêmica em ambientes urbanos, altamente zoonótico e considerado sério problema de saúde pública (Camargo et al., 2007). Segundo Feitosa (2002) esta urbanização vem ocorrendo por uma adaptação do vetor ao ambiente urbano, devido às alterações sofridas em seu habitat natural. O êxodo rural proporciona o aumento da população urbana, que por questões sócio-econômicas apresentam condições higiênico-sanitárias precárias (WHO, 2002). Para Marzochi et al. (1985) essas condições, a pobreza e promiscuidade de animais, prevalente no meio rural e periferia das grandes cidades, propiciam a reprodução do vetor e consequentemente a introdução do agente etiológico em áreas consideradas não endêmicas.

No Brasil, os primeiros relatos de leishmaniose surgiram em regiões de baixa renda do semi-árido nordestino, Estados do Ceará, Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba, nessas regiões a ocorrência está relacionada à presença de animais infectados e a abundância de flebotomíneos (Lima et al., 2004).

As leishmanioses, tanto canina quanto humana, encontram-se em expansão no Brasil. Atualmente tem sido considerada uma doença re-emergente, caracterizando-se por processo de transição epidemiológica. Essas zoonoses vêm apresentando incidência crescente nas áreas onde ocorria tradicionalmente e expansão geográfica para estados localizados mais ao sul do Brasil e em locais que se urbanizaram rapidamente nas regiões do nordeste e sudeste, aumentando a prevalência em número de casos e expansão geográfica. Sendo a forma

tegumentar registrada em todo território brasileiro e a visceral em quatro regiões, excetuando a sul (Camargo et al., 2007).

A região centro-oeste é considerada a terceira maior em casos da forma tegumentar, com o estado de Mato Grosso registrando a maioria dos casos da região e o segundo maior número de casos do país (MS, 2006a). Em 2007 foram diagnosticados 2519 casos da doença, obtendo-se uma diminuição em relação a 2006 onde se registrou 4916 (SES, 2008). De acordo com Carvalho et al. (2006) a espécie incriminada como causadora de leishmaniose tegumentar em Mato Grosso é *Leishmania (Viannia) braziliensis*, diagnosticada em 94,1% dos casos humanos, não discordando do cenário nacional que descrevem a referida espécie como principal causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil (Madeira et al., 2003; Garcia et al. 2007).

No estado de Mato Grosso o diagnóstico de leishmaniose visceral canina e humana é recente. Os primeiros registros da doença humana autóctone ocorreram nas décadas de setenta, no município de Guiratinga, sudeste do estado, sendo diagnosticados oito casos, o que levou a sugerir infecção restrita ao ambiente silvestre de transmissão (Baruffa e Cury, 1973), e no início da década de noventa em municípios da região centro-sul, foram registrados mais quatro casos autóctones no estado (Hueb et al., 1996).

A demonstração da expansão da doença por todo o estado e principalmente para a Capital e municípios próximos ocorreu com o diagnóstico da doença em 1998, em paciente domiciliado em Várzea Grande, cidade vizinha à Cuiabá (Camiá et al., 1999). Trabalho realizado por Mestre e Fontes (2007) descreve a expansão e aumento da doença no estado, com 34 municípios notificados com doença e 138 novos casos humanos no período de 1998 a 2005, sendo a maior incidência no município de Várzea Grande com 50 casos notificados no período. Em 2007 foram registrados 32 casos de leishmaniose visceral humana em Mato Grosso (SES, 2008).

1.2.6. Características Clínicas das Leishmanioses

Clinicamente a leishmaniose tegumentar pode se apresentar nas formas cutânea (LC), mucosa (LM) e cutânea-difusa (LCD) (Da-Cruz e Pirmez, 2005). A leishmaniose cutânea apresenta uma grande variedade de apresentações clínicas ocorrendo casos assintomáticos que são reconhecidos em inquéritos epidemiológicos, casos com forma subclínica que evoluem para cura espontânea e outros com lesão ulcerativa, indolor restritas no local da inoculação, frequentemente em áreas expostas da pele, apresentando formato arredondado ou ovalado, base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem-delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações com aparecimento após período de latência de 30 dias, denominada leishmaniose cutânea localizada (Ashford, 2000; Gontijo e Carvalho, 2003; MS, 2007).

Alguns pacientes podem desenvolver a leishmaniose cutânea disseminada, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares que acometem vários segmentos corporais, tendo como espécies causadoras *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (MS, 2007).

Cerca de 3 a 5% dos pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea desenvolvem lesão mucosa (leishmaniose mucocutânea), após resolução da lesão inicial, acometendo principalmente as vias aéreas superiores acarretando lesões deformantes, secundárias a acometimento cutâneo, tendo como agente desta forma *L. (V.) braziliensis* (Rey, 2001a; Gontijo e Carvalho, 2003; MS, 2007).

A leishmaniose tegumentar canina apresenta similaridade clínica a do homem, com lesões ulceradas, principalmente encontradas no pavilhão auricular, focinho, face, membro posterior, bolsa escrotal, podendo acometer mucosas, comumente a nasal e oral (Madeira et al., 2003).

A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, sendo de evolução crônica, sistêmica e fatal se não tratada (Palatnik-de-Sousa et al., 2001). Clinicamente as manifestações apresentadas pelo cão e homem doentes são similares, apresentando sinais inespecíficos como febre irregular, anemia, perda de peso progressiva e caquexia (Feitosa et al., 2000).

A manifestação clínica humana está frequentemente associada com desnutrição. Indivíduos sem comprometimento imunológico cursam assintomáticos ou oligossintomáticos e autolimitantes. O período de incubação é variável de semanas a meses. Na doença humana as principais manifestações clínicas observadas são febre prolongada e intermitente, com períodos de remissão de semanas, podendo apresentar picos diários, emagrecimento, hepato e esplenomegalia, manifestações imunomediadas como uveíte e nefrite podem ocorrer. Na leishmaniose visceral indiana verifica-se aumento da pigmentação cutânea, característica denominada calazar, febre negra (Prata e Silva, 2005; MS, 2006).

Um dos problemas associados tanto a leishmaniose tegumentar quanto a visceral é a co-infecção com HIV. Nesses quadros observa-se uma diminuição na resposta imune celular, tornando o paciente suscetível a diversos agentes infecciosos oportunistas o que agrava o quadro clínico (Prata e Silva, 2005; MS, 2006).

Na doença canina, de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo cão infectado, pode-se classificá-lo em assintomático, que não apresentam sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomático, onde se observa a presença de linfadenopatia, leve perda de peso e alterações dermatológicas; e sintomático, onde alguns ou todos sinais comuns da doença são evidentes, como alterações dermatológicas, incluindo alopecia, dermatite furfurácea, úlceras e outras, bem como onicogribose, linfadenopatia, emagrecimento acentuado, ceratoconjuntivite (Lima et al., 2004; MS, 2006).

As alterações dermatológicas são os sinais clínicos mais comuns na leishmaniose visceral canina (Feitosa et al., 2000; Gállego, 2004), com cerca de 68% dos cães acometidos apresentando tais alterações (Cavalcanti et al., 2005). Segundo Gállego (2004) os sinais dermatológicos podem se iniciar como lesão única, comumente no ponto de inoculação do parasito, ou como lesão múltipla com a disseminação do parasito originando lesões não-pruriginosas, descamação epidérmica e alopecia difusa.

A visceralização da infecção pode iniciar em poucos meses ou levar vários anos para ocorrer (Gállego, 2004). Segundo Feitosa et al. (2000) e Silva et al. (2001) com o acometimento visceral o cão tende a tornar-se emaciado, ocorrendo perda de apetite, perda de peso e comumente caquexia. Nas fases mais crônicas da doença ocorre hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, diarreia e hemorragia intestinal, atrofia muscular, e insuficiência renal crônica comumente ocasionando óbito (Ferrer, 1999). Doenças oculares, como conjuntivite, blefarite, uveíte, são observadas em cerca de 24,4 a 80,49% dos cães doentes (Brito et al., 2006).

Devido às inúmeras manifestações ocorridas na leishmaniose visceral canina, deve-se diferenciá-la comumente de demodicose, escabiose, dermatofitose, atopia, pênfigo foliáceo, adenite sebácea, lupus eritematoso sistêmico, foliculite bacteriana superficial, erliquiose, hepatozoonose, tuberculose, doença de Lyme, linfoma, toxoplasmose (Wilkinson e Harvey, 1996 e Harvey e Mckeever, 2004). Ferrer (1999) relata a ocorrência de infecções concomitante e complicações por demodicose, piodermite e/ou pneumonia devido à supressão imunológica promovida pelo parasito.

1.2.7. Métodos Diagnósticos

O diagnóstico das leishmanioses pode ser realizado através de métodos clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, imunológicos e moleculares. Em áreas endêmicas o diagnóstico clínico e epidemiológico dessas zoonoses é dificultado pela similaridade clínica com outras doenças, tanto no acometimento humano quanto canino (MS, 2006; MS, 2007), tornando a utilização de exames laboratoriais de suma importância para confirmação diagnóstica.

1.2.7.1. Exames Parasitológicos

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza da doença podendo ser realizado através de exames diretos, com a demonstração direta do parasito em citologia e cortes histológicos, onde se identifica as formas amastigostas do agente em diferentes amostras clínicas como aspirado de medula óssea, linfonodo, baço, fígado nos casos de leishmaniose visceral e por *imprint* de fragmentos teciduais, na leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral (MS, 2007; Gomes et al., 2008). As formas amastigotas são reconhecidas pelo seu formato esférico a ovóide, com cerca de 2 a 6 μm de diâmetro, contendo núcleo arredondado e cinetoplasto ligeiramente arredondado (Ashford, 2000; Ikeda-Garcia e Feitosa, 2006).

Como métodos indiretos podem-se utilizar o isolamento em cultura *in vitro* de fragmentos ou aspirado de tecidos em meio bifásico Novy-MacóNealóNicole (NNN) devendo ser incubadas a uma temperatura de 24-26°C obtendo-se crescimento de formas promastigotas após cinco dias. A inoculação em animais de laboratório, mais comumente hamsters, tem sido utilizado em estudos experimentais (Ikeda-Garcia e Feitosa, 2006; Gomes et al., 2008).

1.2.7.2 Métodos imunológicos

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) baseia-se na visualização de resposta de hipersensibilidade celular tardia, sendo comumente utilizada no diagnóstico e inquéritos epidemiológicos de leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas (MS, 2007). A leishmaniose tegumentar se caracteriza pelo aparecimento de uma resposta celular durante a doença e após a cura, seja de forma espontânea ou após tratamento, tornando o teste positivo em torno de quatro meses da infecção. Entretanto tal teste não diferencia doença atual e pregressa, nem distingue doença de infecção, e é habitualmente negativo nas formas cutâneas difusas e nos pacientes imunodeprimidos. Estima-se uma positividade de 84% e 100% nas formas cutâneas e mucocutânea, respectivamente, e resultados negativos na forma cutânea difusa (Gontijo e Carvalho, 2003).

Na leishmaniose visceral os métodos sorológicos, como a Imunofluorescência Indireta (IFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são os métodos preconizados pelo Ministério da Saúde (MS, 2006) para realização de inquéritos epidemiológicos caninos, através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e no diagnóstico da doença no homem (Costa e Vieira, 2001; Alves e Bevilacqua, 2004). Alves e Bevilacqua (2004) mencionam que os métodos diagnósticos utilizados em inquéritos epidemiológicos devem possuir alta sensibilidade e especificidade, pois através da primeira obtém-se menor taxa de animais negativos evitando a permanência de animais positivos e pela segunda evita-se que cães não infectados sejam sacrificados.

Para Alves e Bevilacqua (2004) a IFI é o teste adequado para os inquéritos sorológicos caninos por ser de fácil execução, rápido e barato, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade, 90 a 100% e 80%, respectivamente. No entanto, Oliveira et al. (2005) testando a IFI, o ELISA e o Western-Blotting evidenciaram uma maior sensibilidade e especificidade

dos dois últimos em relação ao primeiro, confirmando a adoção do ELISA na rotina diagnóstica da leishmaniose visceral canina.

Os testes sorológicos rotineiros utilizam parasitos totais ou lisados que muitas vezes proporcionam uma diminuição na especificidade. Métodos utilizando antígenos dominantes que induzem a formação de anticorpos específicos melhoram os testes sorológicos, como o rK23 clonado de *Leishmania chagasi* (Alves e Bevilacqua, 2004).

Os resultados falsos positivos, muitas vezes diagnosticados nos testes sorológicos, devem-se à reação cruzada obtida com outros tripanossomatídeos como a doença de Chagas e leishmaniose tegumentar americana, o que ocorre com mais frequência em títulos iguais ou inferior a 40 (Savani et al., 2003; Alves e Bevilacqua, 2004). De acordo com Savani et al. (2003) em áreas não endêmicas para leishmaniose visceral e quando o exame sorológico deixar dúvidas, deve-se, aliar os dados clínicos, epidemiológicos e parasitológicos para confirmar a doença.

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar (MS, 2007) a imunofluorescência indireta não deve ser utilizado como critério isolado para diagnóstico de leishmaniose tegumentar devendo ser associado à IDRM ou técnicas parasitológicas, devido a reação cruzada com outras doenças como leishmaniose visceral, doença de Chagas, pênfigo foliáceo, esporotricose, paracoccidiodomicose e em pacientes sadios, questionando a sua utilização no diagnóstico da mesma.

Trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando a técnica de citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose (Rocha et al., 2002; Carvalho Neta et al., 2006; Maia e Campino, 2008). Tal técnica permite contar, analisar e classificar partículas suspensas em fluido, analisando as características físico-químicas das células, apresentando resposta rápida, precisa e facilmente reproduzível. De acordo com Carvalho Neta et al. (2006) os estudos sorológicos baseados na citometria de fluxo constituem um campo de grandes possibilidades de

crescimento devido à sensibilidade de detecção aumentada em relação a outros métodos, podendo evidenciar os casos de leishmaniose tegumentar e visceral em atividade clínica, o que não tem sido possível através das reações sorológicas convencionais (Rocha et al., 2002).

1.2.7.3. Métodos Moleculares

Os métodos moleculares são utilizados na identificação de diferentes espécies de *Leishmania*, através de análises das moléculas de DNA do cinetoplasto (kDNA) ou do DNA nuclear (nDNA), usando diferentes técnicas que variam desde análises como RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) ao RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) de diferentes genes, como espaçadores internos transcritos (ITS) ou não transcritos (NTS) do gene de rRNA, mini-exon, originando oligonucleotídeos (*primers*) que serão desenhados para a utilização nos testes de reação em cadeia pela polimerase (Shaw et al. 2005).

Segundo Costa (1999) e Shaw et al. (2005) a vantagem na análise de DNA resulta de sua aplicação prática, examinando diretamente tecidos lesados ou os isolados de *Leishmania*; sua sensibilidade para detecção de patógenos; a velocidade com a qual pode identificar um organismo; o processamento de um grande número de espécimes com um ensaio automatizado; distinguir entre organismos que são morfológicamente similares; e permitir evidenciar organismos, mesmo os que não são viáveis ou cultiváveis.

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam como característica uma organela celular denominada cinetoplasto, composta, basicamente, por moléculas de DNA (kDNA) que representa a informação genética mitocondrial desses parasitos. Segundo Shaw et al. (2005), a vantagem no uso do kDNA é que esta molécula ocorre como repetições múltiplas nos minicírculos, sendo que os *primers* utilizados para amplificar essas seqüências identificam

membros do gênero *Leishmania*, incluindo os do complexo *donovani* e diferenciam os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) é a que mais vem sendo utilizada em trabalhos visando o diagnóstico e monitoramento da leishmaniose (Solano-Gallego et al., 2001; Francino et al., 2006; Gomes et al., 2007). Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de seqüências de nucleotídeos específicas presentes no parasito, sendo um método sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp. em ampla variedade de amostras clínicas do homem, cães, reservatórios silvestres e vetores (Gomes et al., 2008).

Nos últimos anos a técnica da PCR tem sido utilizada por ser sensível e específica para detectar DNA de *Leishmania*, quantificá-los em diferentes amostras biológicas, e diferenciar as espécies envolvidas, sendo empregadas para isso diferentes técnicas como a Multiplex-PCR (Harris et al., 1998), *Nested* PCR (Fisa et al., 2001), PCR em tempo real (Francino et al., 2006) e PCR-RFLP (Andrade et al., 2006).

No entanto tal método não tem sido empregado na rotina diagnóstica dos laboratórios oficiais das leishmanioses por requerer laboratórios bem equipados e habilidade técnica (MS, 2006).

1.2.8. Tratamento

As drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral humana são os antimoniais pentavalentes: Stibogluconato de sódio e o antimoniato N-metil glucamina, sendo apenas este último disponível no Brasil. O antimoniato N-metil glucamina é distribuído pelo Ministério da Saúde para este fim. A dose recomendada no tratamento é de

20 a 40mg//kg/dia na LV e de 10 a 20 mg/kg/dia na leishmaniose tegumentar, por via parenteral, endovenosa ou intramuscular. Os efeitos colaterais mais observados são artralgia, mialgia, náuseas e vômitos, elevação das enzimas hepáticas, renais e alterações eletrocardiográficas, sendo contra-indicadas para gestantes, cardiopatas, nefropatas e hepatopatas. Drogas alternativas podem ser utilizadas como a anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina B lipossomal e anfotericina B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato), os imunomoduladores (interferon gama) (Prata e Silva, 2005; MS, 2006; MS, 2007).

O Ministério da Saúde não recomenda o tratamento de cães com leishmaniose tegumentar e visceral, pois tais tentativas não diminuem a importância do mesmo como reservatório do parasito, apresentando baixa eficácia, induzindo a remissão temporária dos sinais clínicos, no entanto, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (MS, 2006).

Segundo parecer N° 0299/2004 da Advocacia Geral da União é proibido o uso de antimoniato N-metil glucamina para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina, quando o mesmo for de distribuição do Ministério da Saúde. O uso do medicamento para outros fins pode configurar crime contra a Administração Pública, sujeito a penalidades, portanto constituindo em prática ilícita por parte do profissional que desvia o medicamento ou que indica o tratamento canino. Esta droga poderá ser liberada para pesquisas, em estudos propostos pela Secretaria de Vigilância em Saúde (MS, 2006). Entretanto, a Portaria Interministerial No- 1.426, de 11 de Julho de 2008, proíbe o tratamento canino com qualquer droga com registro no Ministério da Saúde ou não registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

1.2.9. Prevenção e Controle

O controle das leishmanioses tem como objetivo interromper a cadeia de transmissão nos diferentes níveis. O Ministério da Saúde tem preconizado o diagnóstico precoce e o tratamento do paciente humano, a redução do contato homem-vetor pelo uso de telas, mosquiteiros, repelentes tópicos e borrifação ambiental, e a identificação e eliminação do reservatório doméstico em áreas de leishmaniose visceral (MS, 2006; Boraschi e Nunes, 2007).

De acordo com Gontijo e Melo (2004) as medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde não tem sido totalmente efetivas, uma vez que doenças transmitidas por vetores biológicos associados a reservatórios domésticos e a aspectos ambientais serem reconhecidamente de difícil controle aliado ao recente processo de urbanização da doença promovendo inadequado conhecimento epidemiológico da doença nesses focos.

Uma das medidas de controle preconizada pelo Ministério da Saúde para prevenção e controle da leishmaniose visceral e praticada por muitos anos é a eutanásia dos cães sororreagentes para leishmaniose (Ikeda et al., 2003). Essa medida foi enfatizada como a principal estratégia para o controle da doença (Prata e Silva, 2005). Trabalho realizado por Costa et al. (2007) demonstrou uma maior diminuição na incidência da infecção quando se realizou a eliminação canina em comparação com a borrifação de anexos, associada ou não com a eliminação canina.

Na leishmaniose tegumentar não são recomendadas ações objetivando o controle dos animais domésticos com a doença, tendo em vista o caráter de hospedeiro acidental desses animais, sendo recomendado eutanásia dos cães infectados doentes quando ocorrer agravamento clínico do mesmo (MS, 2007). No entanto o encontro de co-infecção natural entre *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em cão residente em área endêmica (Madeira et al.,

2006) reforça a importância de métodos diagnósticos que diferenciem as espécies envolvidas na infecção canina e humana.

No ano de 2001 consultores do Ministério da Saúde se reuniram e preconizaram, o controle vetorial como prioridade no controle da leishmaniose visceral. Em 2003 o programa de controle da doença propôs um sistema de vigilância entomológica visando o levantamento e controle do vetor (MS, 2006).

Outras formas de prevenção vêm sendo utilizadas como a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina nos cães residentes em áreas endêmicas. A utilização da vacina canina para o controle da leishmaniose visceral humana não é aceita pelo Ministério da Saúde, como profilaxia da doença, sendo sua liberação realizada apenas pelo Ministério da Agricultura (MS, 2005).

1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

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

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**. v. 2. São Paulo: Atheneu, 1996, p.1234-1259.

BARUFFA, G.; CURY, P. Contribuição ao estudo do calazar em Mato Grosso. **Revista de Patologia Tropical**, v. 2, p. 345-361, 1973.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, n.71, p. 44-48, 2007.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; LAUS, J. L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina ó revisão. **Clínica Veterinária**, n. 64, p. 68-74, 2006.

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

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, n.71, p. 86-92, 2007.

CAMIÁ, R. P.; RINALDI, J.; FONTES, C. J. F.; HUEB, M. Foco de Leishmaniose Visceral em Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*. 32. (suplemento II) ó Anais da XV Reunião Anual de pesquisa aplicada em doença de chagas e III Reunião de pesquisa aplicada em Leishmanioses, p. 127-128, 1999.

CARVALHO NETA, A. V.; ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 480-488, 2006.

CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M. A. G.; DA SILVA, L. B. G.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, n. 58, p. 36-42, 2005.

COSTA, L. M. C. Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas da biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores de coleção do Museu Nacional - UFRJ. Fundação Oswaldo Cruz / Escola Nacional de Saúde Pública, 70 p. Dissertação, Mestrado, 1999.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.4, 2007.

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

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

DANTAS-TORRES, F.; SIMÕES-MATTOS, L.; BRITO, F. L. C.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, n. 61, p. 32-40, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) brazileinsis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, 2007.

DA-CRUZ, A. M. e PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v.1, p. 698-712.

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

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. Boletim informativo ó INTERVET PET, 2002, 15 p.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p. 6-10, 1999.

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

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

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Review Scientific and Technical Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GARCIA, A. L.; PARRADO, R.; DONCKER, S.; BERMUDEZ, H.; DUJARDIN, J.C. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 368-371, 2007.

GOMES, A. H.S.; FERREIRA, I. M.R.; LIMA, M. L.S.R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 234-241, 2007.

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

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

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.

HARRIS, E., KROPP, G., BELLI, A., RODRIGUEZ, B., AGABIAN, N. Single-Step Multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* Complexes. **The Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1989-1995, 1998.

HARVEY, R. G.; MCKEEVER, P. J. Doenças caracterizadas por crostas e escamas ó Leishmaniose. In: HARVEY, R. G.; MCKEEVER, P. J. **Manual colorido de dermatologia do cão e do gato. Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Revinter, 2004, p. 144-146.

HUEB, M.; ASSIS, S. B.; GUIMARÃES, E. E. D. ROSA, D. L.; FONTES, C. J. F. Ocorrência de transmissão autóctone de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 3, p. 281-282, 1996.

IKEDA, F. A.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, M. M.; GONÇALVES, M. E.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba ó SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária**, n. 47, p. 42-48, 2003.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. vol. 1. London: Academic Press, p. 1-120, 1987.

LIMA, W. G., MICHALICK, M. S. M., MELO, M. N., TAFURI, W. L., TAFURI, W. F. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, p.43-53, 2004.

MADEIRA, M.F., UCHÔA, C.M.A., LEAL, C.A., SILVA, R.M.M., DUARTE, R., MAGALHÃES, C.M., SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p. 551-555, 2003.

MADEIRA, M. F., SCHUBACH, A., SCHUBACH, T. M. P., PACHECO, R. S., OLIVEIRA, F. S., PEREIRA, S. A., FIGUEIREDO, F. B., BAPTISTA, C., MARZOCHI, M. C. A. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 442-445, 2006.

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

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

MARZOCHI, M. C. A.; SABROZA, P. C.; TOLEDO, L. M.; MARZOCHI, K. B. F.; TRAMONTANO, N. C.; FILHO, F. B. R. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro ó Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 5-17, 1985.

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

MESTRE, G. L. C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998 -2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 42-48, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em saúde. [on line]. Vacina anti-leishmaniose visceral canina - Leishmune[®]. Nota Técnica. Brasília: [Capturado 01 maio 2007]; Brasília; 2005. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_nota_tecnica.pdf

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em saúde. [on line]. Indicadores e Indicadores Seleccionados 2006. Brasília: [Capturado 28 abril 2006]; Brasília; 2006a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/indicadores_2006.pdf

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2007, 184 p.

MISSAWA, N. A; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.4, p.365-368, 2008.

MONTEIRO, É. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

NASEREDDIN, A.; SALANT, H; ABDEEN, Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: Serological investigation. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 364-369, 2008.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, L. S.; JULIÃO, F. S.; SOUZA, V. M. M.; FREITAS, D. S.; SOUZA, B. M. P. S.; PAULE, B. J. A.; AGUIAR, P. H. P.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 41-47, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M. MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p.510-517, 2001.

PRATA, A.; SILVA, L. A. Calazar. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**, v. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 713-732.

REY, L. Leishmania e Leishmaníases: Os Parasitos. In:_____. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.214-226, 2001a.

REY, L. O Complexo *Leishmania donovani* e a Leishmaníase Visceral. In:_____. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.253-266, 2001b.

ROCHA, R. D. R.; GONTIJO, C. M. F.; ELÓI-SANTOS, S. M.; CARVALHO, A. T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARQUES, M. J.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O. A. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n.6, p.551-562, 2002.

SAVANI, E. S. M. M.; SCHIMONSKY, B. V.; CAMARGO, M. C. G. O., D'ÁURIA, S. R. N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.2, p.260-262, 2003.

SAVANI, E. S. M. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; SANTOS, M. G.; D'ÁURIA, S. R. N.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum*

chagasi in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, p. 229-233, 2004.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE (SES, 2008). Número de casos humanos de LV e LT no estado de Mato Grosso (1998-2007). In: **Curso Básico de Vigilância Ambiental (CBVA) ó Vigilância e Controle da Leishmaniose no Estado de Mato Grosso (Cuiabá, Brasil)**, 2008.

SHAW, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future and their implications. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 471-478, 1994.

SHAW, J; GRIMALDI, G.; CUPOLILLO, E. Identificação de *Leishmania*. In: COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, v. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 733-737.

SHAW, J. The leishmaniasies ó survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

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

SOBRINO, R., FERROGLIO, E., OLEAGA, A., ROMANO, A., MILLAN, J., REVILLA, M., ARNAL, M.C., TRISCIUOGLIO, A., GORTÁZAR, C. Characterization of widespread

canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 198-203, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R. G. Doenças cutâneas virais, por protozoários e por riquétsias ó Leishmaniose canina. In: _____. Atlas colorido de dermatologia dos pequenos animais ó Guia para o diagnóstico. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996, p. 112-113.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, v. 77, n. 44, p. 364-372, 2002. Disponível no site: <http://www.who.int/wer>. Acesso em 21 de novembro de 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível no site: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html. Acesso em 21 de novembro de 2008.

CAPÍTULO 2

Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de

Mato Grosso

Seroepidemiology survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiaba, State of Mato

Grosso

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida¹, Renata Pereira Faria¹, Maria Fernanda Aranega Pimentel¹, Magyda Arabia Araji Dahroug¹, Nívea Clarice Monteiro Rocha Turbino¹ e Valéria Régia Franco Sousa¹

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses em expansão no Brasil, tendo o cão importância na transmissão e dispersão da doença, principalmente em áreas de leishmaniose visceral. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a soroprevalência de leishmaniose em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá. Para a pesquisa foram selecionados quatro bairros de Cuiabá, sendo um em cada regional administrativa. A amostragem canina foi definida estatisticamente, considerando-se a prevalência de 8,4%. Dos 468 cães analisados, 16 foram reagentes na imunofluorescência indireta, obtendo-se uma prevalência geral de 3,4%. Não foi observada predisposição racial, sexual e etária para a ocorrência da leishmaniose canina. Os principais fatores de risco identificados na ocorrência da infecção canina na Cidade de Cuiabá, foram a localização dos cães no peridomicílio, bem como a proximidade das residências de matas, evidenciando mudanças na ocorrência da doença no ambiente urbano.

Palavras chave: Epidemiologia, Cão, *Leishmania* sp., Cuiabá

¹ Endereço para correspondência: Dra. Valéria Régia Franco Sousa, Departamento de Clínica Médica Veterinária, UFMT, Av. Fernando Corrêa da Costa S/N, HOVET, Campus UFMT, 78060-900, Cuiabá, MT, e-mail: regia@ufmt.br ; Tel.: (55) 65 3615-8664, Fax: (55) 65 3615-8664

Apoio financeiro: CNPq/DECIT ó MS, FAPEMAT e CAPES

ABSTRACT

The leishmaniasis are zoonoses in expansion in Brazil, taking the dog importance in the transmission and spread of the disease, especially in areas of visceral leishmaniasis. The purpose of this study was to evaluate the seroprevalence of leishmaniasis in domiciled dogs in the urban area of Cuiaba. To search were selected four districts of Cuiaba, one in each administrative regional. The canine sampling was defined statistical, considering the prevalence of 8.4%. Of the 468 dogs examined, 16 were reagents in indirect immunofluorescence, resulting in an overall prevalence of 3.4%. There was no racial, sexual and age predisposition for the occurrence of canine leishmaniasis. The main risk factors identified in canine occurrence of the infection in the City of Cuiaba were the location of peridomestic dogs, and the proximity of homes to forests, showing changes in the occurrence of the disease in the urban environment.

Key words: Epidemiology, Dog, *Leishmania* sp., Cuiaba

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). É endêmica em 88 países, infectando cerca de 12 milhões de pessoas em todo mundo, e 350 milhões estão sob risco de adquirir a doença, com incidência anual de um a 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 novos casos da forma visceral, muitas vezes fatal. Nas Américas, o Brasil é o país com mais registros de casos tanto da forma cutânea como visceral²⁸.

O cão está frequentemente envolvido no ciclo urbano da leishmaniose. Baseado em estudo de soroprevalência na Espanha, França, Itália e Portugal tem-se estimado que cerca de 2,5 milhões de cães nesses países estejam infectados com leishmaniose visceral. Nas Américas estima-se também que milhões de cães tenham a infecção, principalmente no Brasil⁴. Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente saudáveis a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença com intenso parasitismo cutâneo.

Assim, o cão representa uma fonte de infecção para o vetor, precedendo a maioria dos casos no homem⁵ e promovendo a dispersão da doença para áreas não-endêmicas^{3 15}.

Os estudos de prevalência da doença canina em diversas cidades do Brasil têm detectado índices de 9,7% em Montes Claros, Minas Gerais⁹ e 40,3% em Paulista, Pernambuco⁶. Em Cuiabá, estudos de prevalência determinaram valores altos (64%) no período de 1997 a 1998¹⁶, enquanto estudos mais recentes demonstraram índice de 8,4%¹⁴. A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), além de sua função de controle do reservatório canino em extensas áreas, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária¹¹.

Baseando-se neste fato, este trabalho teve como finalidade avaliar a soroprevalência de leishmaniose em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá, Mato Grosso, correlacionando os principais fatores de risco.

MATERIAL e MÉTODOS

Área de estudo: O estudo transversal foi realizado em Cuiabá, Mato Grosso, no período de setembro de 2007 a março de 2008, situada no bioma cerrado e cercada pelo pantanal e floresta amazônica, incluindo os seguintes bairros: Jardim Universitário (15° 36' 40.17 S e 56° 02' 35.03 O); Morada do Ouro (15° 34' 32.93 S e 56° 03' 20.38 O); CoopHEMA (15° 38' 05.36 S e 56° 03' 57.89 O), e o bairro Cidade Alta (15° 36' 28.14 S e 56° 07' 21.34 O), totalizando 19.104 habitantes²¹.

Descrição dos animais: No inquérito sorológico analisaram-se 468 cães. Estes, de ambos os sexos e idade igual ou superior a seis meses, foram examinados clinicamente e agrupados como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos¹³ e as informações anotadas em fichas individuais. Durante a visita, aplicou-se um questionário aos proprietários a fim de se obter dados sobre: origem do cão, tempo de residência na casa, acesso do cão à rua e zona rural, ambiente de permanência do animal na casa (peri ou intra-domiciliar), convívio com outros cães, e a presença

de caracteres ambientais visando estabelecer os possíveis fatores de risco da doença nas distintas regiões de Cuiabá.

Coleta de amostras e análise sorológica: As amostras sanguíneas coletadas por venopunção jugular foram armazenadas em recipiente térmico com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Leishmanioses do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, sendo centrifugadas por 10 minutos a 800g. Posteriormente, os soros obtidos foram acondicionados em microtubos identificados e congelados a -20°C até a realização da prova sorológica. A imunofluorescência indireta foi executada através de kit comercial (BioManguinhos[®]/FIOCRUZ) seguindo recomendação do fabricante. Na reação, considerou-se reagente titulação igual ou superior a 1:40, tomando como referência os soros controle positivo e negativo incluídos em cada lâmina.

Análise estatística: A amostragem canina e a análise estatística foram definidas pelo programa Epi info 3.3.2 (CDC, EUA), considerando a proporção de cães em relação ao homem de 7:1²³, prevalência de 8,4%¹⁴, intervalo de confiança de 95% e erro aceitável de 2%, através do teste de qui-quadrado para comparar a soroprevalência ao gênero, faixa etária, quadro clínico e localização geográfica dos cães examinados, sendo considerado estatisticamente significativo valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

No inquérito sorológico foram pesquisados 468 cães, encontrando 16 cães reagentes para leishmaniose. A prevalência estimada nos quatros bairros estudados foi de 3,4%, variando em decorrência do bairro analisado (Tabela 1). Dentre as 468 amostras não houve predominância sexual, etária, nem racial ($p > 0,05$), encontrando-se anticorpos em cães mestiços (10) e de raça pura (6), como rottweiler, fox paulistinha, boxer, pit bull, poodle e cocker spaniel.

Nove cães não apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença, enquanto quatro foram oligossintomáticos e três sintomáticos, ocorrendo diferença significativa entre o primeiro e os outros dois grupos, não sendo observada tal diferença entre os oligossintomáticos e os

assintomáticos. Os sinais clínicos observados nos cães sorreagentes foram os dermatológicos, principalmente alopecia, úlcera de ponta de orelha e descamação, seguidos de linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose e distúrbios oftálmicos como conjuntivite. Em relação ao título de anticorpos, cinco apresentavam fluorescência na diluição de 1:40, dois na de 1:80, três 1:160, cinco 1:320 e um na diluição de 1:640. No grupo dos cães soronegativos para leishmaniose 340 encontravam-se assintomáticos, 102 oligossintomáticos e 10 sintomáticos.

Analisando os dados informados pelos proprietários dos cães pesquisados não se obteve diferença estatística significativa $p < 0,05$ quanto ao acesso dos cães à rua ou a ambiente rural, nem quanto ao local de origem destes animais, o tempo de residência dos mesmos na casa e a convivência com outros cães.

Os principais fatores de risco identificados para infecção canina foram a permanência em ambiente peridomiciliar, com 100% (16) dos cães sorreagentes e a proximidade das residências da mata, entretanto tal significância foi observada também nas residências com ausência de todos os fatores ambientais analisados (Tabela 2). Enquanto, a proximidade a terreno baldio, rio, represa ou córrego analisados isoladamente não foram determinantes para a ocorrência de leishmaniose canina.

DISCUSSÃO

No Brasil a leishmaniose visceral tem passado por uma mudança na sua epidemiologia, com inúmeros casos da doença no ambiente urbano, tendo o cão papel fundamental nessa expansão, principalmente em áreas endêmicas⁹. A soroprevalência da doença apresenta-se bastante variável, dependente da região^{9 18}. Cuiabá apresentou prevalência superior à encontrada^{14 16}. De acordo com a literatura, a distribuição da frequência da doença sugere uma variação sazonal que pode estar relacionada com os picos de abundância e redução populacional do vetor²², justificando a ocorrência de dados divergentes sobre a prevalência canina em Cuiabá e no Brasil.

A taxa de prevalência média de áreas de risco e a taxa de prevalência geral de um determinado município podem variar em decorrência do teste diagnóstico, da forma de localização dos cães soropositivos e da definição da população adotada¹¹. Para este estudo, as áreas foram

selecionadas com base em dados de ocorrência prévia da doença canina obtidos da casuística do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, dados este que ajudam no monitoramento e controle da leishmaniose visceral canina, devendo ser buscados pelos órgãos de saúde¹¹.

A alta carga parasitária presente na pele dos cães tem levado ao desenvolvimento de diversas pesquisas com este reservatório, já que muitos desses animais não desenvolvem alterações clínicas ou o fazem tardiamente^{6 24 25}. A presença de 50 a 70% de cães assintomáticos em áreas endêmicas, potencialmente infectantes para o vetor¹², denota a importância dos inquéritos sorológicos caninos para que se antecipem as ações profiláticas, já que os casos caninos precedem a doença no homem¹⁹. Nesta investigação, a porcentagem obtida de cães assintomáticos foi de 56,2%, não divergindo do cenário encontrado no país.

Pelos dados epidemiológicos dos cães pesquisados, não foi observada predisposição sexual, concordando com outros estudos realizados^{9 18}. Entretanto, autores¹¹ observaram diferença significativa entre sexos para a infecção por *Leishmania* sp, sendo os machos os mais freqüentemente parasitados, todavia, estudo desenvolvido em 2003², ao analisar a variável gênero em associação com a moradia rural ou urbana, obteve uma maior infecção das fêmeas que viviam em ambiente rural.

Estudos demonstram uma predisposição dos cães adultos em adquirirem a doença, associada provavelmente ao longo período de incubação³. No entanto, não foi observada diferença estatística entre os cães, referente à faixa etária^{11 18}, demonstrando não predisposição etária à infecção, apesar de maior número de cães sororreagentes terem sido encontrados com mais de seis anos de idade, discordante de resultados onde se observaram uma positividade sorológica estatisticamente significativa nos cães jovens^{6 25}. Nenhuma raça foi determinada como predisposta a infecção por *Leishmania* sp. Trabalhos descrevem as raças Boxer e Cocker spaniel como susceptíveis a adquirirem a doença⁹, bem como resistência da raça Ibizan hound²⁶. De acordo com os dados obtidos se observa que as variáveis, raça, sexo e idade não são considerados fatores de risco da leishmaniose canina na Cidade de Cuiabá, MT. Estes aspectos variam de acordo com o

município estudado, tendo em vista as características ecoepidemiológicas da doença em diferentes regiões.

Trabalhos apontam a escolha dos testes sorológicos como de extrema importância para um bom inquérito epidemiológico^{6 8}. A imunofluorescência indireta é a técnica sorológica preconizada pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência, juntamente com o ensaio imunoenzimático (ELISA), por apresentarem alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e fácil execução¹⁷. Falhas na detecção da infecção por estes testes podem ocorrer nos animais que se apresentam no período de incubação da doença ou soroconversão⁸.

A titulação apresentada nos animais assintomáticos pode variar, como observado neste estudo, onde nove cães sem alterações clínicas no momento da pesquisa apresentaram titulação de 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320, sendo a primeira mais freqüente, com três animais. No entanto, os cães oligossintomáticos e sintomáticos apresentaram a mesma variação, sendo apenas um sintomático com título maior ou igual a 1:640. Entretanto alguns autores¹ descrevem os dois últimos grupos com maior potencial de infecção para os flebotomíneos, por apresentarem um parasitismo disseminado em vários órgãos e também uma maior concentração de amastigotas na pele²⁵.

As manifestações clínicas observadas nos cães sororreagentes, como alterações dermatológicas, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose e oftalmopatias são similares às observadas em outros estudos^{7 22 24}. As alterações cutâneas são os sinais clínicos mais comumente observados na leishmaniose visceral canina^{7 10}. Tal característica foi observada neste estudo onde todos os cães com manifestações clínicas da doença apresentavam alguma alteração cutânea, como alopecia, descamação e úlcera de ponta de orelha.

A observação dos cães reagentes em ambiente peridomiciliar condiz com a literatura², sendo tal fato associado ao maior contato destes com o vetor. Entretanto, pesquisadores^{18 20} observaram uma maior exposição dos cães, com livre acesso a rua à infecção do que aqueles com permanência exclusiva no ambiente domiciliar. Tal fato não foi observado no presente estudo, nem por Julião e cols.¹¹ indicando que o acesso à rua não influencia na ocorrência da infecção em cães de Cuiabá.

Estudos elucidam a proximidade da moradia dos cães da mata e vegetação abundante como fatores de risco para a infecção por *Leishmania* sp^{22 25 27}, evento evidenciado nesta pesquisa (Tabela 2). Este fato pode estar associado a um ambiente de modificação ambiental recente, com matéria orgânica em quantidade favorável ao desenvolvimento vetorial e conseqüente manutenção da doença^{7 22}.

A observação de seis cães reagentes em casas com ausência de mata, terreno baldio ou rio, dado este significativo (Tabela 2), bem como 93,7% e 75% dos cães se originarem de Cuiabá e residirem há mais de um ano na região pesquisada, respectivamente, apesar de não serem estatisticamente significativos, reforça o processo de urbanização da leishmaniose visceral^{15 17} nos últimos anos e as mudanças nos aspectos com compõem a cadeia de transmissão, bem como a ocorrência de casos caninos autóctones na capital de Mato Grosso.

Por ter um importante papel na epidemiologia da leishmaniose visceral urbana, os inquéritos caninos são de extrema importância, entretanto o estudo das espécies de *Leishmania* circulantes, outros possíveis hospedeiros e os vetores são imprescindíveis para um bom entendimento da doença e controle.

REFERÊNCIAS

1. Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology* 127: 227-232, 2005.
2. Amóra SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG, Calabrese KS, Monteiro AJ, Rocha MFG. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciência Rural* 36:1854-1859, 2006.
3. Arias JR, Monteiro P, Zicker F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. *Emerging Infectious Diseases* 2:145-146, 1996.
4. Baneth G. Leishmaniasis. *In*: Greene CE. (eds). *Infectious Diseases of the dog and cat*. 3 th edition. Saunders Elsevier: Saint Louis, 685-698, 2006.

5. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48:151-156, 2006.
6. Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology* 140:54-60, 2006.
7. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária* 28:36-44, 2000.
8. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CMF. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology* 146:235-241, 2007.
9. França-Silva JC, Costa T, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 111:161-173, 2003.
10. Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniasis. *Review Scientific and Technical Office International des Epizooties* 23:661-676, 2004.
11. Julião FS, Souza BMPS, Freitas DS, Oliveira LS, Laranjeira DF, Dias-Lima AG, Souza VMM, Barrouin-Melo SM, Moreira Jr ED, Paule BJA, Franke CR. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27:319-324, 2007.
12. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* Isolated from Healthy Skin of Symptomatic and Asymptomatic Dogs Seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal Infectious Diseases* 8:440-444, 2004.
13. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:566-567, 1998.

14. Mestre GLC, Fontes CJF. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40:42-48, 2007.
15. Monteiro ÉM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:147-152, 2005.
16. Moura ST, Fernandes CGN, Pandolpho VC, Silva RR. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 36:101-102, 1999.
17. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde. Brasília, DF; 2003.
18. Naveda LAB, Moreira EC, Machado JG, Moraes JRC, Marcelino AP. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58:988-993, 2006.
19. Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cadernos de Saúde Pública* 17:1231-123, 2001.
20. Oliveira SS, Araújo TM. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cadernos de Saúde Pública* 19:1681-1690, 2003.
21. Prefeitura Municipal de Cuiabá. Perfil Socioeconômico de Cuiabá, volume II. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Urbano: Cuiabá, 2004.
22. Rondon FCM, Bevilaqua CML, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, Diniz AT. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 155:24-31, 2008.

23. Savani ESMM, Schimonsky BV, Camargo MCGO, D'áuria SRN. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. *Revista de Saúde Pública* 37:260-262, 2003.
24. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:285-291, 2001.
25. Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Caderno de Saúde Pública* 21:324-328, 2005.
26. Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 90:37-45, 2000.
27. Vanzeli AC, Kanamura HY. Estudo dos fatores socioambientais associados à ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ubatuba, SP, Brasil. *Revista Panamericana de Infectologia* 9:20-25, 2005.
28. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível na Web-site: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, acessado em 25/06/2008.

Tabela 1. Soroprevalência para leishmaniose em cães domiciliados em Cuiabá, Mato Grosso.

Bairros	Total de cães	Cães positivos (n ^o)	Prevalência de LVC (%)
Jardim Universitário	192	3	1,5
Morada do Ouro	88	5	5,7
Cidade Alta	111	8	7,7
Coophema	74	0	0,0
Total	468	16	3,4

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

Tabela 2. Relação do ambiente à soroprevalência para leishmaniose dos cães domiciliados em Cuiabá, Mato Grosso.

Variáveis Ambientais	Cães (n ^o)	Positivos (%)	²	p
Ausência de fatores ambientais				
sim	77	6(7,8)	3,87	0,049*
não	391	10(2,6)		
Presença de Mata				
sim	225	2(0,9)	6,99	0,008*
não	243	14(5,8)		
Terreno Baldio				
sim	134	6(4,5)	0,27	0,60
não	334	10(3,0)		
Rio/Córrego/ Represa				
sim	14	2(14,3)	2,33	0,12
não	454	14(3,1)		

* significativo em nível de 5% de probabilidade estatística

CAPÍTULO 3

Characterization of canine leishmaniasis by PCR-RFLP in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil.

Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida¹, Daphine Ariadne Jesus de Paula¹, Valéria Dutra¹, Edson Moleta Colodel¹, Luciano Nakazato¹, Valéria Régia Franco Sousa¹

¹Postgraduate Course in Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine of University Federal of Mato Grosso, Brazil

Author for Correspondence: Valéria Régia Franco Sousa; e-mail: regia@ufmt.br Fone: 65 3615 8664; Fax: 65 3615 8664

Address for correspondence: Valéria Régia Franco Sousa of Veterinary Hospital of UFMT of Avenida Fernando Corrêa da Costa, S/N; CEP: 78060900, Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. E-mail: regia@ufmt.br

Abstract

Leishmaniasis are considered neglected zoonosis in the world, showing up in Brazil an increasing geographical expansion. In the epidemiology of these zoonosis, the dog is considered the main reservoir of the visceral form in the urban areas, and important in maintaining the cycle of transmission of the tegumentary form in endemic areas. This article aimed to investigate the disease and identify the species of *Leishmania* by the technique of PCR-RFLP, involved with the canine infection in the Cuiaba City, Mato Grosso, Brazil. In this study samples were collected from 181 dogs, resulting in positivity of 7,2% in the IIF and 24,9%, in the PCR-RFLP, with statistically significant difference ($p < 0.05$). The bone marrow aspirate showed statistically superior performance of the lymph node to detect infection by

26 *Leishmania* sp in dogs examined. *Leishmania (L.) chagasi* was identified by PCR-RFLP in
27 dogs in different region in Cuiaba city and it thus help in prevention measures and control of
28 disease in the region.

29 Key-Words: PCR-RFLP, dog, *Leishmania* sp., Cuiaba

30

31 1. Introduction

32

33 Leishmaniasis diseases are of great importance in public health, causing skin
34 infections and even the systemic involvement, which is fatal if untreated. The leishmaniasis
35 are transmitted through the genus *Lutzomyia* dipters, in Americas (Ashford, 2000). It is a
36 zoonosis of worldwide distribution, prevalent in countries with tropical and subtropical
37 climate, with about 12 million people affected and 350 million people at risk (WHO, 2008).

38 The visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* is the most
39 serious form of the disease and registered about 500,000 new cases year in the world 90% of
40 registered cases occurred in Bangladesh, India, Nepal, Sudan and Brazil. In Brazil, the
41 visceral leishmaniasis, in recent years, has undergone changes occurring in its epidemiology.
42 Initially the disease was typically rural and now becomes a urban zoonosis (Ashford, 2000),
43 with reports of human cases in four brazilians regions. This process is a result of
44 deforestation, migration to the major population centers, where the precarious sanitary-
45 hygienic conditions, proximity to forest, can provide a higher density vector contact with
46 domestic reservoirs (Silva et al., 2005).

47 The tegumentary leishmaniasis is in this same context, *Leishmania (Viannia)*
48 *braziliensis* has being the agent most frequently reported. This zoonosis presents wide
49 distribution and is diagnosed in all Brazilian territory (Madeira et al., 2003), currently
50 occurring at the domestic ambient.

51 Several species of mammals are infected with *Leishmania* sp (Dantas-Torres, 2007;
52 Sobrinho et al., 2008). With the urbanization of leishmaniasis, the dogs have been considered
53 the main reservoirs in the chain of transmission of *L. (L.) chagasi*, due to intense parasitism of
54 the skin, represents a major source of infection for the vector (Molina et al., 1994), in addition
55 to close contact between man and asymptomatic animals in endemic areas come to represent
56 60% the population (Palatnik-de-Souza et al., 2001; Alvar et al., 2004, Gomes et al., 2007). In
57 the tegumentary form the importance of the dog as a reservoir is not yet fully elucidated, is
58 considered accidental host, serving as a maintainer of the vector in the environment the cycle
59 of transmission (Madeira et al., 2003; Dantas-Torres, 2007).

60 Several laboratory methods have been employed to confirm the infection canine,
61 including analyses parasitological, serological and molecular (Ikeda-Garcia and Feitosa,
62 2006; Baneth and Arocha, 2008). The serological techniques of indirect immunofluorescence
63 (IIF) and enzyme immunoassay (ELISA) are recommended by the Ministry of Health in
64 epidemiological investigations in Brazil (MS, 2006). In recent years, the PCR technique has
65 been used as sensitive and specific for detecting DNA of *Leishmania* in different biological
66 samples (Ikonomopoulos et al., 2003; Reithinger and Dujardin, 2007, Gomes et al., 2008)

67 With the increasing spread of leishmaniasis in Brazil, knowledge of the circulating
68 species of *Leishmania* in each region has importance in terms of diagnosis, epidemiological
69 characteristics and study ways of controlling the disease. Mato Grosso's state is considered
70 endemic for both visceral leishmaniasis and tegumentary leishmaniasis, showing an increase
71 in reporting of these diseases, with 32 human cases of the visceral leishmaniasis and 2590 of
72 the tegumentary leishmaniasis reported in 2007 (SES-MT, 2008) and the principal agent is the
73 tegumentary *Leishmaniasis (Viannia) braziliensis* (Carvalho et al., 2006). Furthermore, the
74 different roles by dog in the epidemiology of leishmaniasis, occurring as often mixed

75 infection in endemic areas, as demonstrated by Madeira et al. (2006b), this may impair the
76 methods of control themselves, and is very important to their characterization in these areas.

77 The objective of this article was to use the PCR technique in the diagnosis of canine
78 leishmaniasis in areas of occurrence of the disease in the city of Cuiaba and through the use of
79 restriction enzymes (PCR-RFLP) to characterize the species of *Leishmania* involved in canine
80 infection.

81

82 2. Material and methods

83

84 2.1 Animals and samples

85 Samples of blood, bone marrow and lymph nodes were obtained from 181 dogs of
86 both sexes, aged more than six months and different breeds. Clinically, these animals were
87 classified into asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic (Mancianti et al., 1988),
88 from four districts of the city of Cuiaba, because they had previous cases of sick dogs
89 diagnosed in the Veterinary Hospital of the Federal University of Mato Grosso (HOVET-
90 UFMT).

91 The blood samples were collected by jugular venipuncture heat stored in container
92 with ice and sent to the Laboratory of Leishmaniasis of the Veterinary Hospital of UFMT, and
93 centrifuged for 10 minutes at 800g. Subsequently, the sera were stored in microtubes
94 identified and frozen -20°C until the completion of serological evidence. The samples of
95 bone marrow were obtained by puncture in the xiphoid process of the sternum, with needle
96 40x12mm and syringe of 20ml after previous antisepsis and local anesthesia with 2%
97 lidocaine. The popliteal lymph node was aspirated with a needle 30x8mm and syringe of
98 20ml using the citoaspirator of Valeri. Then the samples were added in 0.5 ml of sterile

99 solution of 0.9% NaCl (Gomes et al., 2007), sent to the Laboratory of Molecular Biology of
100 HOVET-UFMT and maintained at - 20 ° C until the time of DNA extraction.

101

102 2.2 Serological analysis

103 The indirect immunofluorescence was performed using commercial kit
104 (BioManguinhos ® / FIOCRUZ) following the manufacturer's recommendation. It was
105 considered positive a reagent titer equal or greater than 1:40 when compared to positive and
106 negative control sera included in each slide.

107

108 2.3 DNA extraction and Polymerase chain reaction

109 To extract DNA extract samples were processed according to Gomes et al. (2007).
110 Briefly, the samples were dissolved in the lyses buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0,
111 25mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% SDS and 100 g / ml proteinase K, and the mixture was
112 incubated at 56° C until the complete lyses of the cells. The bone marrow and lymph nodes
113 aspirates were incubated for about 12-18 hours. DNA was extracted by phenol-chloroform
114 method and precipitation by isopropanol. After washing with 70% ethanol for 10 minutes at
115 10,000 x g, the DNA precipitate was dissolved in ultra pure water.

116 The polymerase chain reaction was realized using the primers 150 (sense) 5'-GGG (G /
117 T) AGGGGCGTTCT (C / G) CGAA-3 'and 152 (antisense) 5' (C / G) (C / G) (C / G) (A / T)
118 CTAT (A / T) TTACACCAACCCC-3' (Degrave et al., 1994), which amplifies a fragment of
119 DNA from 120pb a region of conserved minicirculo kDNA of all species of *Leishmania*. For
120 the amplification was used a reaction containing 200 M of dNTP, 1 M of each primer, buffer
121 solution (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8.3), 2mM MgCl₂, 1.5 U of Taq DNA polymerase
122 and of 5 l DNA sample in a final volume of 20 l. The conditions of temperature and time for
123 amplification were: 94°C for 4 minutes, followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 56°C

124 for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and a final extension of 72°C for 10 minutes. The
125 amplification product was fractionated by electrophoresis in 2.0% agarose gel stained with
126 ethidium bromide and analyzed in transilluminator (300nm).

127

128 2.4 Molecular characterization this species based in the PCR-RFLP mkDNA

129 PCR-RFLP mkDNA was done according to Andrade et al. (2006), with some
130 modifications. Five µl of PCR product were digested by 1U HaeIII, which digests the 120
131 base pairs (bp) of samples of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in fragments of 120, 80, 60
132 and 40bp, *Leishmania (Viannia) braziliensis* in fragments of 80 and 40bp and not digest the
133 samples of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, enzyme and incubated for 3 hours at 37°C.
134 Restriction fragments were separated in 10% polyacrylamide gel and stained with ethidium
135 bromide. The fragments were compared with the standard strains of *Leishmania (Leishmania)*
136 *chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) and *Leishmania (Viannia) braziliensis*
137 (MHOM/BR/75/M2903) from the Oswaldo Cruz Institute / FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

138

139 2.5 Statistical analysis

140 Statistical analysis was performed using Epi Info version 3.3.2 (CDC, Atlanta),
141 through the test of χ^2 , adopted value of significance of 5% and Kappa index (k), for analysis
142 of concordance between tests. Sensitivity (S) and specificity (SP) for PCR were calculated
143 using the IIF as a gold standard.

144

145 3. Results

146 Of the 181 sera tested, 13 (7,2%) showed anti-*Leishmania* by indirect
147 immunofluorescence technique (IIF). Forty-five dogs (24,9%) were positive by PCR
148 technique.

149 The technique of PCR showed a sensitivity of 53.8% and specificity of 77% compared
150 with the IIFs, with a low correlation between the two tests (k 0,14) and statistically significant
151 difference $p < 0,05$ (Table 1). The sensitivity and specificity of the bone marrow and lymph
152 node used in PCR showed considerable variation in the IIFs, as shown in Table 1.

153 Evaluating samples of bone marrow and lymph node to detect DNA of *Leishmania* sp.
154 in the same animal, a better performance was obtained from bone marrow (37) compared to
155 lymph nodes (15), providing a statistically significant difference ($p = 0,0039$).

156 In six dogs with detection of antibodies in the indirect immunofluorescence technique,
157 there was no amplification of DNA of *Leishmania* sp. The titles of antibodies produced by
158 these animals were 1:40, four dogs, 1:80 and 1:160. In these animals, three (6,7%) were
159 symptomatic, 11 (24,4%) oligosymptomatic and 31 (68,9%) asymptomatic. For the technique
160 of IIFs such numbers were three, three and seven, respectively, and these data are not
161 statistically significant ($p < 0,05$).

162 For the technique of PCR-RFLP using HaeIII characterized to species in these samples
163 stock as *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

164

165 4. Discussion

166 As an important disease of compulsory notification and public health concern the
167 study of *Leishmania* sp and its reservoirs has been important for this purpose. The tests used
168 in Brazil to estimate the prevalence of the disease in dogs are: the serological tests such as
169 enzyme immunoassay (ELISA) and indirect immunofluorescence (IIF) (MS, 2006). However
170 these methods have been challenged due to the removal of seropositive dogs without a
171 decrease the occurrence of the disease (Silva et al., 2005).

172 There are studies that used the PCR for the diagnosis of leishmaniasis in dogs and
173 humans (Osman et al., 1997; Fisa et al., 2001; Headington et al., 2002). In this study, PCR

174 detected 45 (24,9%) of dogs positive for leishmaniasis, which when compared to the detection
175 of IFI increased from 7,2 to 24,9% the prevalence of the disease in the municipality. The
176 superiority of PCR to detect the infection canine was also observed by other authors (Solano-
177 Gallego et al., 2001).

178 According to Ikonomopoulos et al. (2003) the high sensitivity and specificity found in
179 molecular methods are dependent on DNA sequences used as primers for PCR techniques. In
180 this study used a pair of primers that amplify a sequence of 120 bp DNA of *Leishmania* sp,
181 and that according to Lachaud et al. (2002) was the best of five used to detect infection.

182 According to the literature the PCR is a diagnostic tool that displays a superior
183 sensitivity and specificity to the others tests (Solano-Gallego et al., 2001; Ikonomopoulos et
184 al., 2003). In this study, was observed sensitivity and specificity lower than those observed by
185 Andrade et al. (2006), however, Headington et al. (2002) observed a significant difference
186 between these two tests, agreeing with this study.

187 Six seropositive dogs were negative by PCR. Analyzing these animals titration there
188 was evidence at the lower limit. According Ikonomopoulos et al. (2003) to detect antibodies
189 to the non-detection of DNA of *Leishmania* may be associated with a possible stay of
190 antibodies after elimination of the parasite, or the cross-reaction with other parasites such as
191 *Trypanosoma* in serological technique, as described by Vexenat et al. (1996). However
192 according to Francino et al. (2006) the conventional PCR can result in false negative when the
193 amount of parasites in a given sample is small. Despite the failure to quantify the parasite in
194 this study, the occurrence of asymptomatic animals where the organs presented in small
195 volume may have decreased the sensitivity of PCR, a fact also observed by Ikonomopoulos et
196 al. (2003), that mentions the success of the blood samples of bone marrow are obtained
197 resulting from increased volume in the first offering greater detection of parasite DNA.

198 In the epidemiology of leishmaniasis the asymptomatic dogs keep the parasite in
199 endemic areas and often because the low sensitivity of epidemiological tests in detecting
200 them. Clinically, 31 (68,9%) of dogs with the amplification of DNA of *Leishmania* sp proved
201 to be asymptomatic at the time of collecting biological samples and nine by serological
202 technique (69,2%), as not statistically significant, the disagreeing found by Francino et al.
203 (2006) describes that increased capacity of PCR to detect asymptomatic dogs compared with
204 serologic tests.

205 Different biological samples may be used in PCR for diagnosis of leishmaniasis (Fisa
206 et al., 2001; Manna et al., 2004). In this study it was used aspirated bone marrow and lymph
207 node. According to a study by Manna et al. (2004), samples of lymph node showed high
208 sensitivity in diagnosing infection, however in this study the sensitivity of this material was
209 lower than that observed by that author and on bone marrow, with a statistically significant
210 difference between them ($p < 0.05$).

211 According to Ikonomopoulos et al. (2003) is better to obtain samples for the diagnosis
212 of leishmaniasis by PCR in animals symptomatic due to higher volume of organs affected and
213 consequently quantity of sample in sufficient volume to use. However, this may be an
214 inconvenience in epidemiological investigations where the proportion of asymptomatic dogs
215 is greater than of symptomatic (Palatnik-de-Souza et al., 2001; Alvar et al., 2004).

216 Several studies have used the technique of PCR-RFLP in the diagnosis and
217 characterization of both at the canine leishmaniasis, as in humans (Cortes et al., 2006). In
218 sympatry areas, the knowledge of the species involved in the infection is being conducted by
219 the use of isozymes (Madeira et al., 2006a,b), however Andrade et al. (2006) used the
220 technique of PCR-RFLP for this purpose.

221 In this study using the restriction enzyme HaeIII, which according Volpini et al.
222 (2004) and Azeredo-Coutinho et al. (2007) is able to identify the species of *Leishmania*, it

223 identified the species of leishmania infection in dogs involved in the city of Cuiaba, as the
224 species *Leishmania (Leishmania) chagasi*, agent of visceral leishmaniasis in Brazil. Despite
225 being a *Leishmania* with cutaneous tropism, the *Leishmania (Viannia) braziliensis* is often
226 isolated from skin lesions (Madeira et al., 2006a,b), Andrade et al. (2006) identified this agent
227 in samples of skin, bone marrow, liver and spleen of dogs in Belo Horizonte, Minas Gerais,
228 using the technique employed in this study, showing an increased sensitivity of molecular
229 methods to detect infection by *Leishmania* sp that parasitological methods.

230

231 5. Conclusion

232 With this study, it was possible to characterize that in the capital Cuiaba the specie
233 which occur is *L. (L.) chagasi*, important in the development of measures for control of
234 leishmaniasis in this endemic area, with moderate transmission, and the evidence on the use
235 of extracted from bone marrow as a biological sample in the molecular diagnosis of this
236 disease.

237

238 6. Acknowledgments

239 Dr Elisa Cupolillo for providing the *Leishmania* strains used as PCR reference. This
240 work was financed by CNPq ó DECIT, FAPEMAT, CAPES.

241

242 7. References

243 Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. 2004. Canine leishmaniasis. Adv.
244 Parasitol. 57, 1-88.

245 Andrade, H.M., Reis, A.B., Santos, S.L., Volpini, A.C., Marques, M.J., Romanha, A.J. 2006.
246 Use of PCRóRFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. Vet.
247 Parasitol.140, 231ó238.

- 248 Ashford, R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J.*
249 *Parasitol.* 30, 269-1281.
- 250 Azeredo-Coutinho, R.B.G., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, L.P.,
251 Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valette-Rosalino, C.M., Mendonça, S.C.F. 2007. First
252 report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio
253 de Janeiro State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 735-737.
- 254 Baneth, G, Aroch, I. 2008. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.*
255 175, 14-15.
- 256 Carvalho, M.L.R., Andrade, A.S.R., Fontes, C.J.F., Hueb, M.; Silva, S.O., Melo, M.N. 2006.
257 *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with
258 tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop.* 98, 277-285.
- 259 Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J. M., Pratlong, F., Dedet, J. P., Campino, L.
260 2006. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum*
261 diversity in Portugal. *Parasitol. Int.* 55, 277-283.
- 262 Dantas-Torres, F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis
263 on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet.*
264 *Parasitol.* 149, 139-146.
- 265 Degraeve, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.G., 1994. Use of molecular
266 probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. *Mem. Inst.*
267 *Oswaldo Cruz* 89, 463-469.
- 268 Fisa, R., Riera, C., Gállego, M. Manubens, J., Portús, M. 2001. Nested PCR for diagnosis of
269 canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet.*
270 *Parasitol.* 99, 105-111.

- 271 Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J.,
272 Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for
273 diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214-221.
- 274 Gomes, A.H.S., Ferreira, I.M.R., Lima, M.L.S.R., Cunha, E.A., Garcia, A.S., Araújo, M.F.L.,
275 Pereira-Chioccola, V.L. 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control
276 of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 144, 234-241.
- 277 Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C., Alves, L.C. 2008. Diagnosis of
278 canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45-52.
- 279 Headington, C.E., Bárbara, C.H., Lambson, B.E., Hart, D.T., Barker, D.C. 2002. Diagnosis of
280 leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans. R.*
281 *Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 195-197.
- 282 Ikeda-Garcia, F.A., Feitosa, M.M. 2006. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral
283 canina. *Clin. Vet.* 62, 32-38.
- 284 Ikononopoulos, J., Kokotas, S., Gazouli, M., Zavras, A., Stoitsiou, M., Gorgoulis, V.G. 2003.
285 Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs Comparative application of traditional
286 diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.* 113, 99-
287 113.
- 288 Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P.
289 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine
290 visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210-215.
- 291 Madeira, M.F., Uchôa, C.M.A., Leal, C.A., Silva, R.M.M., Duarte, R., Magalhães, C.M.,
292 Serra, C.M.B. 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados.
293 *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 551-555.
- 294 Madeira, M.F., Schubach, A.O., Schubach, T.M.P., Pereira, S.A., Figueiredo, F.B., Baptista,
295 C., Leal, C.A., Melo, C.X., Confort, E.M., Marzochi, M.C.A. 2006a. *Post mortem*

- 296 parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro,
297 Brazil. Vet. Parasitol. 138, 366-370.
- 298 Madeira, M.F., Schubach, A., Schubach, T.M.P., Pacheco, R.S., Oliveira, F.S., Pereira, S.A.,
299 Figueiredo, F.B., Baptista, C., Marzochi, M.C.A. 2006b. Mixed infection with
300 *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally
301 infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 442-445.
- 302 Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S. 1988. Studies on canine leishmaniasis
303 control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis
304 following antimonial treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 566-567.
- 305 Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G.,
306 Staiano, N., Gravino, A.E. 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based
307 diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet. Parasitol. 125, 251-262.
- 308 MS (Ministério da Saúde) 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
309 Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle da Leishmaniose Visceral. Série A.
310 Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF. 120pp.
- 311 Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J.,
312 Alvar, J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to
313 colonize *Phlebotomus perniciosus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 491-493.
- 314 Osman, O.F., Oskam, L., Zijlstra, E.E., Kroon, N.C.M., Schoone, G.J., Khalil, E.A.G., El-
315 Hassan, A.M., Kager, P.A. 1997. Evaluation of PCR for Diagnosis of Visceral
316 Leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. 35, 2454-2457.
- 317 Palatnik-De-Sousa, C.B., Santos, W.R., França-Silva, J.C., Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik,
318 M., Mayrink, W., Genaro, O. 2001. Impact of canine control on the epidemiology of
319 canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 510-517.

- 320 Reithinger, R., Dujardin, J.C. 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current Status and
321 future applications. *J. Clin. Microbiol.* 45, 21-25.
- 322 SES-MT (Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Mato Grosso) 2008. Número de casos
323 humanos de LV e LT no estado de Mato Grosso (1998-2007). In: Curso Básico de
324 Vigilância Ambiental (CBVA) ó Vigilância e Controle da Leishmaniose no Estado de
325 Mato Grosso (Cuiabá, Brasil).
- 326 Silva, A.V.M., Paula, A.A., Cabrera, M.A.A., Carreira, J.C.A. 2005. Leishmaniose em cães
327 domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública.* 21, 324-328.
- 328 Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. 2001. Prevalence of
329 *Leishmania infantum* in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using
330 PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560-563.
- 331 Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C.,
332 Trisciuglio, A., Gortázar, C. 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis
333 among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198-203.
- 334 Vexenat, A.C., Santana, J.M., Teixeira, A.R. 1996. Cross-reactivity of antibodies in human
335 infectious by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and
336 *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 38, 177-185.
- 337 Volpini, A.C., Passos, V.M., Oliveira, G.C., Romanha, A.J. 2004. PCR-RFLP to identify
338 *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American
339 Cutaneous Leishmaniasis. *Acta Trop.* 90, 31-37.
- 340 World Health Organization (WHO), 2008. Available on site:
341 http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html. Accessed on
342 November 21, 2008.
- 343
- 344

345 Table 1. Performance of polymerase chain reaction (PCR) on the sample used considering
 346 indirect immunofluorescence (IIF) as gold standard to diagnose canine leishmaniasis.

347

	IIF		S (%)	SP (%)	<i>k</i>	p
	Positive	Negative				
PCR						
Positive	7	38	53,84	77	0,14	0,029*
Negative	6	130				
Bone marrow						
Positive	6	31	53,84	82	0,16	0,04*
Negative	7	137				
Lymph node						
Positive	4	11	30,76	93	0,21	
Negative	9	157				

348 S, sensivity, SP, specificity, *k*, Kappa index, * Significant at 5% level of statistical probability

349 by test ²

350

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)