

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E  
PARASITÁRIAS**

**ROBERTA MARTINS PASSOS HUMBERG**

***Leishmania* sp. EM ANIMAIS SILVESTRES DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE**

**CAMPO GRANDE  
2009**

**ROBERTA MARTINS PASSOS HUMBERG**

***Leishmania* sp. EM ANIMAIS SILVESTRES DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Profa. Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira.

**CAMPO GRANDE  
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

H919L Humberg, Roberta Martins Passos.  
*Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre  
Roberta Martins Passos Humberg. -- Campo Grande, MS, 2009.  
62 f. ; 30 cm.

Orientador: Alessandra Gutierrez de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.  
Faculdade de Medicina.

1. *Leishmania* sp.– Doenças. 2. Resevatórios silvestres. 3. *Didelphis albiventris*. I. Oliveira, Alessandra Gutierrez de. II. Título.

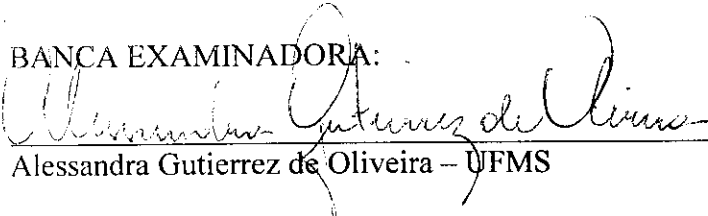
CDD (22) 639.964

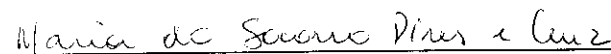


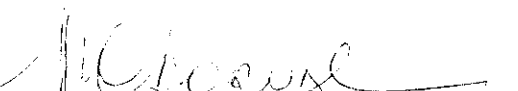
## TERMO DE APROVAÇÃO

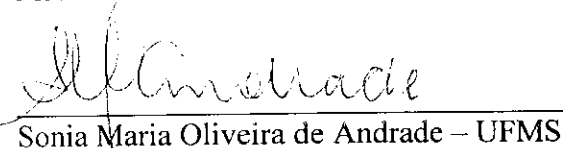
A dissertação intitulada LEISHMANIA SP. EM ANIMAIS SILVESTRES DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE, 2008-2009, apresentada à banca examinadora por ROBERTA MARTINS PASSOS HUMBERG, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve aprovação.

BANCA EXAMINADORA:

  
Alessandra Gutierrez de Oliveira – UFMS

  
Maria do Socorro Pires e Cruz – UFPI

  
Maria Elizabeth M. C. Dorval – UFMS

  
Sonia Maria Oliveira de Andrade – UFMS

Campo Grande, 14 de julho de 2009.

Dedico esta pesquisa a Elisa Teruya Oshiro,  
por seu envolvimento primoroso.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Parasitologia e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob a orientação da Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira, e contou com o apoio financeiro do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS), da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS/IMASUL).

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela nossa existência, à criação do planeta Terra e de nossa fauna silvestre tão rica e exuberante.

À minha mãe, maravilhosa Vera, que mesmo longe, seu amor me parece tão próximo, me apoiou sempre respeitando minhas escolhas e vontades. Desde o início aconselhou-me a fazer Direito, mas eu fiz “errado” e agora aqui estou finalizando, um mestrado. Contando sempre com sua compreensão e amor eternos. Obrigada Mãe, TE AMO.

Ao meu Pai Jorge (*in memoriam*) pelo amor paterno e exemplo na dedicação ao trabalho e nos estudos.

À minha irmã Silvia pela sensibilidade amor e compreensão.

Ao meu irmão Guilherme (futuro papai) que sempre me incentivou a estudar.

A toda minha família em Sampa pelo apoio e carinho mesmo distantes.

Ao querido amore, Willian, que de tudo fez para me ajudar de coração, em infinitos momentos. Deu-me de apoio moral, emocional, técnico e logístico como nas caronas e em todos os momentos de desespero, ansiedade, nervosismo e alegria pelos quais passei.

À família Veron, que de uma forma ou de outra teve compreensão nos momentos difíceis e da minha ausência, acolheu-me de forma sem igual, de coração aberto, com carinho e alegria constantes.

A minha santa orientadora Alessandra que com toda dedicação, conhecimento e paciência, sem tamanho, me orientou, ajudou e corrigiu, nos momentos tão difíceis, mas essenciais neste processo, por quais passamos e que também aguentou meus choros talvez desnecessários, mas desesperados. Obrigada mesmo, sem palavras! VALEU!

A Elisa, pesquisadora nata, amigona que em todos os momentos de dificuldade e desespero me confortou e deu apoio técnico e emocional. Por toda a dedicação e trabalho que realizou no laboratório e fora dele, pelo ensino nas técnicas de coleta do material biológico e outros incontáveis momentos de aprendizado constante.

À professora Beth que desde o início da seleção do mestrado direcionou, apoiou e incentivou a trilhar esse importante caminho.

À professora Sonia Andrade, que nos mostrou caminhos certos a trilhar e como fazê-los, que entendeu as diferenças, dificuldades e necessidades de cada aluno, em especial as minhas.

Ao Reginaldo Brazil, pelo apoio técnico e consultoria prestada na pesquisa.

A Carla e a Beatriz, nos palpites e sugestões tão essenciais e pelo incentivo carinhoso e sorriso presente.

A Alda Teixeira por todo apoio dado na realização do PCR.

A Alda Isabel de Souza, Marina Gadioli, Amanda e Gerson do laboratório clínico do Hospital Veterinário da Uniderp-Anhanguera; que nos permitiram realizar a sorologia.

A todos os professores do programa que foram exemplo de excelência, determinação, e complementaram meu conhecimento com conteúdo inigualável.

A Socorro, que nos transmitiu conhecimentos de grande relevância com tanta presteza, qualidade e bom humor.

Ao Luiz Tavares e Fernando Paiva que nos auxiliaram com enorme disposição na elaboração e envio do primeiro artigo.

À especial amiga, Ana Paula Albano, que me fez descobrir o mundo e o gosto pela pesquisa científica. Ajudou-me no pré-projeto e em todas as fases dele.

A Claudemir Alencar (*in memoriam*) meu primeiro amigo em Campo Grande, que me ensinou diversas coisas e deixou muitas saudades nos companheiros do CRAS e familiares. Que me fazia sorrir a qualquer hora, mesmo no desespero me amparava e incentivava e, que ainda segurou muitos animais para esta pesquisa.

A todos os colegas e companheiros de trabalho em especial, o Álvaro e Vinicius que me apoiaram e colaboraram com as coletas de dados e que souberam compreender momentos difíceis, da minha ausência no CRAS, para o meu aperfeiçoamento e crescimento profissional e pessoal.

Pelos que me auxiliaram, contendo os animais nas coletas, em especial Wilton, Elidio e Sr. Genivaldo Alencar.

A Carmelita, minha orientadora psicológica, que me fez ter visão, serenidade e equilíbrio nos momentos tensos e difíceis e bons por quais passei.

A Dona Zélia, Jucelei e Geucira por toda a paciência com minhas dúvidas e questionamentos no laboratório e pelos meus desabafos em momentos difíceis e pelo apoio carinhoso o tempo todo.

A Raquel e ao Norton pelo árduo e longo trabalho de leitura de lâminas, processamento de material e organização das amostras e dados obtidos no laboratório, trabalho feito com inigualável esforço e dedicação.

Às secretárias do curso, Roberta e Néia, pela cordialidade e alegria nos atendimentos prestados aos alunos.



Aos amigos e amigas que fiz e cultivei no mestrado, especialmente Janaina, Elisângela, Glaucia e Thiago por todo apoio e carinho que me deram.

Aos colegas de turma de risadas, gargalhadas em aulas e bares, nos momentos prazerosos de tensão e estudo.

Aos meus amigos Alda, Sérgio e Stéphanie pela amorosa amizade e pelo apoio incondicional.

Aos animais, que involuntariamente se prestaram ao mérito de viabilizar as coletas.

Ao IBAMA-SISBIO pela licença concedida para os trabalhos de coleta e transporte de amostras.

A tantos que não mencionei por serem muitas as pessoas que de alguma forma colaboraram no presente trabalho, Meu Muito Obrigada.

## RESUMO

As leishmanioses são protozoonoses com destaque em saúde pública e têm motivado pesquisas em humanos, animais domésticos e silvestres. O papel dos animais silvestres na cadeia epidemiológica destas enfermidades ainda não está bem esclarecido. O presente estudo investigou a ocorrência de *Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre. Foram estudados animais recepcionados e mantidos em cativeiro no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) de Campo Grande, MS, no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa, MG (CETAS-UFV) e no Zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso, MT (ZOO-UFMT). Um total de 101 animais foi submetido à colheita de sangue periférico e aspirado medular para a pesquisa de *Leishmania* sp., compreendendo nove espécies pertencentes a cinco famílias. Houve predominância de resultados positivos em *Didelphis albiventris*, *Cerdocyon thous*, *Chrysocyon brachyurus* e *Pseudalopex vetulus*. O material colhido foi processado e realizada a pesquisa direta e indireta de *Leishmania* através de esfregaço delgado corado, semeadura em meio específico, inoculação em animal sensível (hamster - *Mesocricetus auratus*), sorologia para detecção de anticorpos (Ensaio Imunoenzimático-ELISA) e reação em cadeia pela polimerase (PCR). Do total de animais examinados, 48 apresentaram resultados positivos para *Leishmania* sp. em pelo menos uma técnica realizada, independente de sexo e idade. Houve positividade tanto em animais de vida livre (46,57%) procedentes da zona urbana, quanto em animais mantidos em cativeiro (53,57%). Com relação à PCR, dos 88 animais analisados, 47,52% apresentaram o DNA do parasita. O índice de 40,74% de ocorrência de *Leishmania* em *Didelphis albiventris* suscita maiores investigações na tentativa de esclarecer o seu papel na cadeia epidemiológica dessas parasitoses no município de Campo Grande, MS. Ressalta-se o primeiro relato de *Leishmania* sp. em quatis (*Nasua nasua*) e em onças pardas (*Puma concolor*).

Palavras-chave: *Leishmania* sp., reservatórios silvestres, *Didelphis albiventris*.

## ABSTRACT

The leishmaniasis are protozooses with prominence in public health and have motivated research on human beings, domestic and wild animals. The role of wild animals in the epidemiological chain of these diseases is not well elucidated. The present study investigates the occurrence of *Leishmania* sp. on wild animals in captivity and free ranging. Wild animals sheltered and maintained in captivity at Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) in Campo Grande, MS, at the Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa, (CETAS-UFV) MG, and at the Zoo of the Universidade Federal do Mato Grosso (ZOO-UFMT), MT were studied. A total of 101 animals were submitted to tests of biological material for *Leishmania* sp., comprehending nine species belonging to five families. Most *Didelphis albiventris*, *Cerdocyon thous*, *Chrysocyon brachyurus* and *Pseudalopex vetulus* yielded positive results. Peripheral blood and bone marrow blood were collected and submitted to direct and indirect search for *Leishmania* sp. through fixed stains smears, specific culture, and inoculation into sensible animals (hamster - *Mesocricetus auratus*), serology for detection of antibodies (Immunoenzimatic Assay - ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR). From all examined animals, 48 presented positive results for *Leishmania* sp. in at least one kind of method performed, irrespective of sex and age. Positivity was seen in free ranging wild animals (46,57%) that came from urban areas, as well as in wild animals in captivity (53,57%). PCR showed that from 88% of the analyzed animals, 47,52% presented the DNA of the parasite. The index of 40,74% of *Leishmania* sp. in *Didelphis albiventris* demonstrates the need of more investigations as an attempt to clarify the role of these animals in the epidemiological chain in the municipality of Campo Grande, MS. This research is the first report of *Leishmania* sp. on coatis (*Nasua nasua*) and pumas (*Puma concolor*).

Key words: *Leishmania* sp., wild reservoirs, *Didelphis albiventris*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Contextualização das leishmanioses.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Distribuição e expansão.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Agentes etiológicos, ciclo biológico e vetores.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Caracterização clínica das leishmanioses.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 Diagnóstico nos animais.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Reservatórios silvestres e domésticos.....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Tipo de estudo.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Objeto de estudo.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Identificação e cadastramento dos animais.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Colheita e processamento do material biológico.....</b>	<b>27</b>
4.4.1 <u>Pesquisa de anticorpos (Ensaio Imunoenzimático-ELISA).....</u>	29
4.4.2 <u>Caracterização das cepas.....</u>	30
4.4.2.1 <u>Extração do DNA.....</u>	30
4.4.2.2 <u>Técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR).....</u>	31
4.4.2.3 <u>Identificação dos produtos amplificados.....</u>	31
<b>4.5 Aspectos éticos.....</b>	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de caráter antropozoonótico de importância em saúde pública com uma ampla variedade de hospedeiros que envolvem animais silvestres, domésticos e o homem.

Os animais silvestres, alguns destes, reservatórios naturais de *Leishmania* sp., representam um fator de grande relevância na cadeia epidemiológica das leishmanioses que, nos últimos anos, transformaram-se em fonte de preocupações relativas à saúde, merecendo cada vez mais atenção em busca de conhecimentos (KRUSE; KIRKEMO; HANDELAND, 2004). Diante disso, várias espécies silvestres dentre roedores, marsupiais, procionídeos, canídeos e edentados têm sido alvos de pesquisas em estudos destas protozooses no Brasil (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006; LAINSON et al., 1987; LUPPI et al., 2008; MELLO; TEIXEIRA, 1984).

As leishmanioses representam, ainda hoje, um grave problema de saúde pública com um número crescente de novos casos descritos e notificados anualmente em diferentes partes do mundo. Novas áreas e localidades vêm sendo identificadas com transmissão autóctone de *Leishmania*, trazendo reflexos na economia e sanidade de comunidades e regiões.

O município de Campo Grande, MS, apresenta áreas preservadas de reservas, nascentes de rios e matas ciliares. Porém, como se encontra em expansão e desenvolvimento, estes habitats naturais estão se fragmentando através de desmatamentos, queimadas e vias urbanas com recente pavimentação, o que favorece a ocorrência de animais silvestres na área urbana, resultando em possível elo entre estes prováveis reservatórios, o parasita e o homem.

O recebimento de animais silvestres originários da zona urbana tem sido cada vez mais significativo em centros de triagem e zoológicos, justificando, portanto, a necessidade de investigar a ocorrência de *Leishmania* sp. nesses animais com vistas a verificar e analisar a possibilidade dos mesmos atuarem como reservatórios do parasita.

Por meio deste estudo pretendeu-se investigar a presença de *Leishmania* sp. em animais silvestres recepcionados nos Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) de Campo Grande, MS; Centro de Triagem da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV), MG e no Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (ZOO-UFMT), Cuiabá, MT.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Contextualização das leishmanioses

Entre as protozoonoses humanas, as leishmanioses caracterizam-se como importante problema de saúde pública. Estão amplamente distribuídas geograficamente, principalmente em populações mais pobres, sendo registradas nas Américas tropical e subtropical, África, Índia, parte da Ásia Oriental e Central e em países europeus do Mediterrâneo (WHO, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2009), as leishmanioses estão entre as seis mais importantes doenças tropicais, ocorrendo em 88 países, com estimativa de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo. Ao ano são estimados dois milhões de casos novos, sendo que um milhão e meio por leishmaniose tegumentar (LT) e 500 mil por leishmaniose visceral (LV); destes, 90% ocorrem no Brasil e outros países como Bolívia, Perú, Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria.

Devem-se considerar os casos não notificados e os não diagnosticados. Além disso, tem-se como agravante o grande número de pessoas incapacitadas temporaria ou definitivamente, bem como as mutilações decorrentes das formas mucocutâneas e cutâneas difusas, que se traduzem por marcantes fenômenos psicossociais e estigmatizantes nos pacientes (BARRAL et al., 1991; COSTA et al., 1987; MARSDEN, 1994).

Há uma demanda crescente por novas estratégias de prevenção e educação em saúde nas leishmanioses. As diferenças geográficas regionais, a diversidade ecológica com muitas espécies de flebotomíneos como possíveis vetores, e aproximadamente 100 espécies de animais como potenciais reservatórios dificultam as medidas de controle. Existem problemas com relação ao diagnóstico e à manutenção do tratamento. A dificuldade de acesso e produção de drogas ativas, prescrição inadequada e a pouca compreensão sobre a doença, impedem a atuação correta nos casos diagnosticados e perpetuam a infecção antroponótica, estimulando a resistência às drogas (GONTIJO; MELLO, 2004; GUERIN et al., 2002; MURRAY et al., 2005).

## 2.2 Distribuição e expansão

No Continente Americano a distribuição dessas parasitoses se estende desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (WHO, 2004).

No Brasil, casos de leishmanioses são assinalados em todos os Estados, com incidência elevada, em decorrência de mudanças ambientais, resultantes das atividades humanas, que vêm modificando o perfil epidemiológico, tanto nas áreas onde a transmissão é florestal, como em focos enzoóticos naturais e em áreas periurbanas envolvendo reservatórios domésticos (BRASIL, 2006b; DEANE; GRIMALDI, 1985; SHAW, 2002).

Na década de 80 a LT foi assinalada em 19 estados e, a partir desta época, verificou-se um aumento no número de casos registrados entre 1980 e 1995, com picos de transmissão a cada 5 anos, quando em 1985 solidificou-se a implantação das ações de vigilância e controle de LT no país, ainda assim; em 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2007).

A expansão da LT na região amazônica parece estar relacionada a uma mudança de comportamento epidemiológico da doença, que anteriormente apresentava-se limitada às zonas florestais, e posteriormente começou a ocorrer em zonas rurais desmatadas e peri-urbanas, através do surgimento de áreas de garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e formação de novos núcleos urbanos em ambientes favoráveis à transmissão da doença (SILVA-NUNES et al., 2008).

Em regiões do país com maior influência antrópica, sobretudo no Sudeste e no Nordeste, *Leishmania braziliensis*, principal agente da LT, encontra-se adaptada a ecossistemas alterados e a sua transmissão vem ocorrendo em áreas há muito colonizadas (GOMES, 1992; MARZOCHI, 1992; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Já a LV, ocorre com maior número de casos no continente americano, no Brasil está presente nos 21 estados da federação e apresenta caráter endêmico (PENNA, 2008). A região Nordeste, entre 1980 e 2005, apresentava 82,50% dos casos de LV. Os demais se distribuíam nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste. A enfermidade foi se expandindo gradualmente, de 15% em 1980 a 44% em 2005, para as demais regiões (MAIA-ELKOURI et al., 2008). Este crescimento representa um importante problema de saúde pública, face à gravidade dos casos e da incidência em caráter esporádico ou endêmico-epidêmico, atingindo principalmente

a faixa etária abaixo dos 10 anos de idade, com 60% dos casos em menores de quatro anos (FERREIRA et al., 2006).

No Estado de Mato Grosso do Sul, as leishmanioses são notificadas há muito tempo, porém, a literatura sobre o assunto é bastante escassa. Registrada desde 1911, a LV apresentou casos esporádicos até a década de 80. Há suposição de que o primeiro caso humano autóctone dessa parasitose no Continente Americano, comprovado parasitologicamente, tenha sido registrado na região de Porto Esperança, município de Corumbá (DEANE, 1956; MIGONE, 1913). Na década de 40 foram registrados dois casos humanos: uma criança do município de Rio Brilhante e o outro em adulto que na época trabalhava na ferrovia Bolívia-Brasil, também em Corumbá (ARRUDA et al., 1949).

A partir de 1980, em Corumbá, inicia-se a notificação dos primeiros casos humanos de LV. Este fato, aliado à identificação de cães com aspectos sugestivos da doença, estimulou estudos na área com o intuito de esclarecer componentes epidemiológicos da parasitose na região. Nesta mesma época, a infecção canina já estava disseminada e foi diagnosticada em 8,7% de 481 cães examinados. O parasito isolado foi *Leishmania chagasi* (NUNES et al., 1988).

A parasitose permaneceu restrita a esta área até 1995 e, a partir de então, iniciou lentamente a sua expansão para municípios adjacentes. No ano de 1999 foram notificados no estado 61 casos de LV, com nove óbitos e 54% das notificações em crianças menores de 10 anos. Neste ano a parasitose abrangia 11 municípios, dentre os quais, Aquidauana e Anastácio, distantes 270 km de Corumbá (CORTADA et al., 2004).

A doença continuou em processo de expansão e urbanização, atingindo, nos anos subsequentes, 34 dos 78 municípios de Mato Grosso do Sul. Ressalta-se a ocorrência de uma epizootia canina, com diagnóstico conclusivo de casos autóctones de LV em cães, na cidade de Campo Grande em 1999 (SILVA et al., 2000), e o caráter epidêmico da doença na cidade de Três Lagoas, município vizinho ao Estado de São Paulo, no ano de 2000 (OLIVEIRA, A. L. et al., 2006). Em Mato Grosso do Sul, no período de 2001 a setembro de 2008, foram notificados e confirmados 1681 casos da doença.

Em 2002 surgiram às primeiras notificações de LV humana autóctone na capital, Campo Grande, quando foram confirmados 19 casos (CAMPO GRANDE, 2006).



No ano de 2007 foram registrados 259 casos de LV, e destes, 140 ocorreram na cidade de Campo Grande, com 10 óbitos. Em 2008, 282 casos de LV com 27 óbitos, foram confirmados, sendo 151 casos e 14 óbitos em Campo Grande. Até abril de 2009 já foram notificados 55 casos e dois óbitos da doença no Estado, com 40 casos e um óbito em Campo Grande (MATO GROSSO DO SUL, 2009).

Com relação à leishmaniose canina, em 2006, a Secretaria de Estado de Saúde contabilizou uma população canina de 456.765 indivíduos em Mato Grosso do Sul. Destes, 42.983 foram submetidos à sorologia para LV sendo que 7.382 apresentaram-se soro reagente, com índice de positividade de 17%. Na cidade de Campo Grande a população canina foi estimada em 125.000 espécimes, com 15% de animais positivos (MATO GROSSO DO SUL, 2006).

### **2.3 Agentes etiológicos, ciclo biológico e vetores**

Nas Américas, o agente etiológico da forma visceral é *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha, Chagas, 1937, e das formas dermatópicas humanas, são conhecidas cerca de 10 espécies, que no Brasil, compreendem sete: *Leishmania (L.) amazonensis* Lainson, Shaw, 1971, de ocorrência na região amazônica, Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país; *L. (Viannia) guyanensis* Floch, 1954; *L. (L.) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga, Ishikawa, 1987; *L. (V.) naiffi* Lainson, Shaw, 1989, *L. (V.) shawi* Lainson, Braga et al., 1989 e *L. (V.) lindenbergi* Silveira et al., 2002. As últimas cinco espécies são encontradas na região amazônica e *L. (V.) braziliensis* Vianna, 1911 apresenta ampla distribuição no Brasil (DORVAL et al., 2006; SHAW, 2002; SILVEIRA et al., 2002).

As duas formas evolutivas distintas observadas no ciclo de vida de *Leishmania* sp. dependem do hospedeiro; quando no invertebrado, estão presentes em seu tubo digestório sob formas flageladas móveis, as promastigotas e no hospedeiro vertebrado, sob formas amastigotas sem flagelo livre em células do sistema monocítico fagocitário (MAUEL, 1990). Assim, através da picada, fêmeas de flebotomíneos inoculam as formas flageladas promastigotas metacíclicas, que no hospedeiro vertebrado transformam-se em formas amastigotas intracelulares (MURRAY et al., 2005).

Na LV o protozoário é transmitido por dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, popularmente conhecidos por flebotomíneos (GALATI et al.,

1997). As espécies *Lutzomyia longipalpis*, comprovadamente vetora, e *Lutzomyia cruzi*, encontrada infectada naturalmente em Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998).

Em Corumbá, MS, pesquisas referentes à fauna flebotomínea identificaram a presença de oito espécies, sendo as mais frequentes *Lutzomyia cruzi*, seguida de *Lutzomyia forattinii* e *Evandromyia corumbaensis*, que foram encontradas tanto no peri quanto no intradomicílio apresentando, as duas primeiras, elevada antropofilia e alta densidade populacional, o que levou os autores a sugerirem a participação destas duas espécies na veiculação do parasito na área (GALATI et al., 1997).

No ano de 2000, Oliveira, Falcão e Brazil relataram o primeiro encontro de *Lu. longipalpis* na área urbana de Campo Grande e na ocasião destacaram a necessidade de atenção das autoridades quanto ao risco iminente de casos, tanto de LV canina quanto de LV humana.

Oliveira et al. (2003), ao estudarem a fauna flebotomínea na cidade de Campo Grande assinalaram, além da presença de *Lu. longipalpis* na área urbana da cidade, a ocorrência em simpatria com *Lu. cruzi*.

Desde o estudo realizado em 2000, em Campo Grande, houve um aumento significativo na densidade de *Lu. longipalpis*, sendo que a maioria dos espécimes, foi capturada na região central da cidade. Neste mesmo período houve um incremento no número de casos de LV em cães e humanos evidenciando a exposição humana ao vetor e a transmissão ativa da doença na cidade (OLIVEIRA, A.G. et al., 2006, 2008).

## **2.4 Caracterização clínica das leishmanioses**

As leishmanioses se expressam de forma heterogênea devido a fatores intrínsecos ao parasito, como: infectividade, patogenicidade e virulência, e aqueles relacionados ao hospedeiro, como resposta imunológica (eficácia da resposta imune inata e adquirida dependente de células T), idade e estado nutricional (MURRAY et al., 2005).

A LV, enfermidade infecciosa generalizada, crônica, caracteriza-se por febre alta, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, emagrecimento e debilidade progressiva. A LT, também conhecida por espúndia, úta, úlcera dos chicleros ou *bay sore*, úlcera de Bauru no Novo Mundo é uma enfermidade

polimórfica da pele e mucosas, caracterizada pela presença de lesões ulcerosas indolores, únicas e de duração limitada (forma cutânea simples ou com lesões múltiplas), lesões nodulares (tipo difusa) ou lesões mucosas (tipo cutâneo-mucosa) que afetam a mucosa nasofaríngea seguida ou não da infecção cutânea inicial (MURRAY et al., 2005).

As características clínicas básicas, tanto na LV quanto na LT, variam consideravelmente nas áreas endêmicas, provavelmente indicando a interação entre as propriedades do parasita no local, a biologia do vetor e os fatores do hospedeiro. As variações regionais incluem: população primariamente atingida (crianças ou adolescentes e adultos), modo de transmissão zoonótico ou antroponótico e particularidades em relação à evolução clínica (curas espontâneas ou recidivas) (MURRAY et al., 2005).

A infecção por *L. (L.) infantum chagasi* é relativamente frequente entre pessoas que vivem em áreas endêmicas, porém, as manifestações clínicas clássicas da doença ocorrem, sobretudo, em crianças desnutridas ou em adultos imunodeprimidos (BADARÓ et al., 1986; GONTIJO; MELO, 2004).

Nos cães (*Canis familiaris*) a leishmaniose visceral é sistêmica, de evolução lenta e início insidioso. As manifestações clínicas apresentam uma grande diversidade e estão relacionadas com o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo animal infectado (BRASIL, 2006a).

Classicamente a doença canina manifesta-se por lesões cutâneas, sendo as mais comuns, descamação, eczemas, principalmente em espelho nasal e auricular, pequenas úlceras localizadas mais frequentemente em orelhas, focinho, cauda e articulações, assim como opacidade nos pelos. Em fase mais avançada observa-se com alta frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecias, dermatites, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, edema de patas, hemorragia intestinal, vômitos e hiperqueratose. Na fase final ocorrem, em geral, a paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer assintomáticos por um longo período (BRASIL, 2006a).

A forma clínica da leishmaniose felina, assim como nos cães, varia de acordo com o parasita envolvido. Na forma visceral, os sinais clínicos mais frequentes são: febre, perda de peso, icterícia, vômitos, alopecia recorrente, descamação difusa, ulcerações junto a saliências ósseas, edema na borda das orelhas, linfadenopatias e úlceras de córnea (HERVAS et al., 1999; LEIVA et al., 2005). Na leishmaniose

cutânea as principais alterações são: áreas arredondadas de alopecia, nódulos, lesões ulcerovegetantes intradigitais e plantares (MELLO, 1940; PASSOS et al., 1996; SOUZA et al., 2005). Estas manifestações são consideradas inespecíficas e podem estar associadas com outras dermatites como a criptococose e a esporotricose (PEREIRA; COUTINHO, 2003).

Em animais silvestres são escassos os relatos sobre manifestações clínicas, porém, Luppi et al. (2008) as descreveram em três animais mantidos em cativeiro no zoológico de Belo Horizonte, MG. Um deles era um cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) que apresentava perda de peso progressiva, vômitos, diarreia, anemia, poliúria e polidipsia, bem como alterações nas taxas de uréia e creatinina. Esse animal apresentou um agravamento do quadro, com ascite e edema cervical, e evoluiu ao óbito em oito dias após o início de tratamento. O outro era uma raposa (*Pseudalopex vetulus*) que apresentava linfadenopatia e lesões cutâneas ulceradas em base da cauda e membros, associadas à anemia, fraqueza, prostração e perda de peso. O terceiro animal era um lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) com múltiplas lesões cutâneas crônicas em ponta de orelha.

## 2.5 Diagnóstico nos animais

O diagnóstico definitivo da leishmaniose torna-se um desafio, uma vez que a sintomatologia pode ser polimórfica e semelhante a outras doenças. A resposta imunológica celular do hospedeiro, a espécie do parasita envolvida, e a complexa relação parasita-hospedeiro são responsáveis pela produção dessas variações que dificultam o diagnóstico clínico, ainda que o quadro clínico clássico esteja bem descrito e presente em geral, na fase crônica da doença (SANTOS-GOMES; FONSECA, 2008).

Os exames laboratoriais são importantes ferramentas em animais domésticos e silvestres para confirmação diagnóstica. Várias dificuldades como a ausência de um sinal patognomônico, a inespecificidade de alterações histopatológicas e a inexistência de um diagnóstico 100% específico e sensível tornam a leishmaniose preocupação para os serviços de saúde pública, principalmente em áreas endêmicas (BRASIL, 2006a).

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser realizado através de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares. Para determinar o exame

laboratorial mais adequado é importante que se conheça a área provável de transmissão, o método a ser utilizado, as suas limitações e a sua interpretação clínica (BRASIL, 2006a).

O exame parasitológico direto, considerado “padrão ouro”, é o método confirmatório com 100% de especificidade e baseia-se na visualização da *Leishmania*. Formas amastigotas do parasita podem ser encontradas em material biológico obtido por punção esplênica, de linfonodo, de medula óssea e de biópsia ou por escarificação de pele (BRASIL, 2006a).

A cultura *in vitro* é utilizada como método indireto e permite a visualização de formas promastigotas de *Leishmania* sp. em meio específico. É ainda possível a Bioprova, que consiste no isolamento *in vivo*, por meio de inoculação de material suspeito em animal sensível, hamster (*Mesocricetus auratus*), porém não é um método prático de diagnóstico, considerando o longo período necessário para que o animal manifeste a doença e um local adequado para a manutenção dos mesmos (BRASIL, 2006a; GOMES et al., 2008).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é a técnica sorológica preconizada pelo Ministério da Saúde para a triagem de soroprevalência em inquéritos amostrais e censitários em animais, através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Para a confirmação de animais soro reagentes é utilizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) reconhecida como “padrão ouro” (ALVES; BEVILAQUA, 2004; BRASIL, 2006a).

Segundo Santos-Gomes e Fonseca (2008) a técnica de ELISA apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, acima de 90% porém, a inconveniência de detectar falsos positivos, através de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos pode ocorrer (DOURADO et al., 2007).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica molecular que vem sendo utilizada com frequência no diagnóstico e monitoramento das leishmanioses. É capaz de detectar quantidades mínimas de DNA de *Leishmania* sp. em ampla variedade de amostras clínicas do homem, do cão, de reservatórios silvestres e de vetores. Este método, considerado sensível e específico, baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos presentes no parasita (FISA et al., 2001; GOMES et al., 2007; GOMES et al., 2008; MAIA et al., 2006; SOLANO-GALLEGOS et al., 2001).

A PCR tem sido utilizada para quantificar e diferenciar as espécies envolvidas em diferentes amostras biológicas. Podem ser empregadas diferentes técnicas como a Multiplex-PCR, *Nested* PCR, PCR em tempo real ou qPCR, nas quais é possível obter valores quantificados que permitem a avaliação das variações de carga parasitária e da resposta à terapêutica, além da PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que permite a identificação do parasita envolvido. No entanto, tais técnicas não têm sido empregadas na rotina diagnóstica de laboratórios, por requerer infraestrutura onerosa e habilidade técnica especializada (ANDRADE et al., 2006; BRASIL, 2006a; FISA et al., 2001; FRANCINO et al., 2006; HARRIS et al., 1998).

## 2.6 Reservatórios domésticos e silvestres

As leishmanioses são doenças zoonóticas sendo que a maioria das espécies de *Leishmania* tem sido considerada, primariamente, parasita de animais silvestres e, menos frequentemente, de animais domésticos (LAINSON; KILLICK-KENDRICK; FLISSER, 1988; MELLO et al., 1988).

Espera-se que um animal identificado como reservatório natural de *Leishmania* represente uma fonte permanente de infecção, tenha um grande volume de biomassa, uma estreita relação com o vetor, apresente comportamento de agregação, longevidade e uma proporção considerável de seus membros presentes em áreas endêmicas que deve estar infectada sem manifestações clínicas, ao menos em parte de sua existência (ASHFORD, 1996; ASHFORD; BETTINI, 1987).

Em áreas endêmicas para as leishmanioses nas Américas, dentre as dezenas de espécies de mamíferos silvestres encontradas naturalmente infectadas por alguma espécie de *Leishmania*, predominam roedores, marsupiais, edentados, poucos primatas e carnívoros (LAINSON, 1983).

No Brasil, o primeiro caso de infecção natural por *Leishmania* em um canídeo silvestre, *Lycalopex vetulus*, foi descrito por Deane e Deane (1954) no estado do Ceará, a qual foi isolada *L. donovani*. Posteriormente, Courtenay et al. (1996) através de análise do crânio e da dentição deste animal reclassificaram-no como *Cerdocyon thous*.

Mais tarde, Deane e Deane (1955) observaram que a infecção nas raposas ocorreu de forma semelhante a de cães domésticos, sugerindo que este canídeo

atualmente denominado *Pseudalopex vetulus*, poderia ser considerado um recente hospedeiro do parasita.

Outros trabalhos de Deane (1956) revelaram também a existência de um possível ciclo silvestre da doença ao encontrar quatro raposas *Pseudalopex vetulus* infectadas por *Leishmania* no total de 33 indivíduos analisados.

Lainson et al. (1987) detectaram a presença do parasita em lobinhos (*Cerdocyon thous*) com amostras de fígado e baço, semeadas em meios de cultura e através de inoculações em hamster (*Mesocricetus auratus*). A partir destes relatos, surgiram outros em diversas ocasiões, descrevendo a infecção em canídeos silvestres, tanto em lobinhos quanto em raposas (*Pseudalopex vetulus*) (LAINSON et al., 1990). Estes animais são considerados os reservatórios primários de *L. chagasi* no Brasil confirmando a existência do ciclo de transmissão silvestre (FIGUEIREDO et al., 2008a).

No Mato Grosso do Sul, Mello et al. (1988) encontraram, em Corumbá, um lobinho *C. thous*, infectado naturalmente com *L. chagasi*, sendo que o parasita não foi encontrado diretamente nos tecidos do próprio animal, mas sim no hamster que havia sido inoculado. As formas amastigotas foram visualizadas em fígado e baço deste animal, após o período de seis meses, obtendo-se com sucesso o isolamento do parasita em cultura.

Lainson et al. (1990) em pesquisa realizada na ilha de Marajó, no estado do Pará, detectaram 42,3% de positividade para *Leishmania* em 26 lobinhos da espécie *C. thous*, aparentemente saudáveis, a partir de triturados de fígado e baço de hamsters infectados experimentalmente.

Em Minas Gerais, no parque nacional da Serra do Cipó e arredores, em um estudo analisando a soroprevalência em canídeos domésticos e silvestres de vida livre, Curi, Miranda e Talamoni (2006) relataram soropositividade para *Leishmania* em canídeos selvagens, *C. thous* e *Chrysocyon brachyurus* saudáveis e assintomáticos.

Jorge (2008) realizou um estudo no Pantanal de Mato Grosso, em carnívoros selvagens, dos quais obteve amostras positivas para *Leishmania* na reação em cadeia da polimerase (PCR) de lobinho (*C. thous*), mão pelada (*Procyon cancrivorus*), lobo guará (*C. brachyurus*) e em jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Em estudo recente, Figueiredo et al. (2008a), relataram o primeiro caso no Brasil, de infecção natural por *L. chagasi* em um cachorro vinagre assintomático

(*Speothos venaticus*). A amostra de biópsia da pele foi positiva na histopatologia e o parasita caracterizado pelo perfil enzimático. Este animal foi capturado no estado de Mato Grosso em ambiente selvagem e atualmente encontra-se em cativeiro na Fundação Jardim Zoológico do Rio de Janeiro.

O baixo potencial de infecção de canídeos silvestres pode estar relacionado à ausência de sintomas, enquanto cães domésticos com sintomatologia parecem ter maior capacidade de infectar o vetor do que os assintomáticos (COURTENAY et al., 2002).

O cão é o principal reservatório doméstico de *L. chagasi* em países da América Central e do Sul, devido ao intenso parasitismo cutâneo, o estreito relacionamento com o homem facilitando a sobreposição de habitats (SANTOS-GOMES; FONSECA, 2008). Vários estudos têm apontado elevadas taxas de infecção em canídeos domésticos (ALMEIDA et al., 2009; CARVALHO, 2009; CORTADA et al., 2004; NUNES et al., 2001; REIS et al., 2006).

Lainson et al. (1987) isolaram *L. chagasi* em dois gambás *Didelphis albiventris*, na área endêmica de Jacobina, no estado da Bahia, com baixa taxa de infecção e Sherlock et al. (1988), na mesma localidade, também isolaram *L. donovani* dessa espécie.

O isolamento de *L. chagasi* em diversos gambás *Didelphis marsupialis* e a infecção experimental realizada com *Lu. longipalpis* alimentando-se nestes animais, coloca-os na posição de reservatórios naturais do parasita (LAINSON et al., 1990; TRAVI et al., 1998a).

Em São Luis, MA e Belo Horizonte, MG, localidades endêmicas para LV que apresentam alta soroprevalência canina e canídeos silvestres infectados foram relatadas a presença de *Didelphis* sp. (LUPPI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2005; OLIVEIRA, A.C. et al., 2006). Apesar de existirem evidências indicando que a ocorrência de gambás é fator de predisposição para a infecção canina, deve-se considerar que o papel de reservatórios e o impacto desses animais na cadeia epidemiológica de *L. chagasi* nas áreas urbanas, ainda não está esclarecido (CABRERA et al., 2003).

Na Colômbia, *L. chagasi* foi detectada por Travi et al. (1994) em baço, fígado e pele de gambá *Didelphis marsupialis*, bem como foi constatada a infecção por esta espécie de parasita através da PCR em roedor da espécie *Proechmys canicolus* (TRAVI et al., 1998b).



Com relação ao envolvimento de animais silvestres como reservatórios de *Leishmania* na LT, foi inicialmente comprovado pelo encontro de roedores silvestres naturalmente infectados no Panamá. A partir da década de 50, importantes e numerosos achados de novas espécies de *Leishmania*, de vetores e de hospedeiros vertebrados silvestres e domésticos foram decisivos para a definição de um complexo quadro epidemiológico dessa parasitose. Assim, é possível reconhecer diferentes ciclos de transmissão onde podem estar presentes espécies de flebotomíneos incriminadas como vetores primários, além de outras atuando como vetores secundários (HERTIG; FAIRCHILD; JOHNSON, 1957).

A modalidade clássica de transmissão da LT é a silvestre, na qual o homem adquire a infecção ao adentrar no foco natural da parasitose, onde interage com os vetores e possíveis reservatórios (PESSOA; BARRETO, 1948; RANGEL; LAINSON, 2003; SHAW; LAINSON, 1987).

Dentre as espécies de *Leishmania* que atuam na etiologia da LT no Brasil, *L. (V.) braziliensis* é a que apresenta maior complexidade em sua epidemiologia. São várias as espécies vetoradas envolvidas e vários reservatórios silvestres, tais como, roedores silvestres e sinantrópicos, *Proechimys*, *Oryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys*, *Dasyprocta*; marsupiais *Didelphis*, *Marmosa*, *Metachirus*, *Philander*; edentados (tatus, tamanduás e preguiças); canídeos silvestres, *Cerdocyon*; e lagomorfos, *Sylvilagus brasiliensis*. Em reservatórios domésticos tem sido detectada a presença de *Leishmania* em cães e equídeos (AGUILAR et al., 1987; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; FALQUETO et al., 1986; MARZOCHI, 1992; PIRMEZ et al., 1988; TRAVI et al., 2002; YOSHIDA et al., 1990).

Sherlock et al. (1988), em Jacobina na Bahia, isolaram *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em *Didelphis albiventris*.

No Estado de Campeche, México, Canto-Lara et al. (1999) determinaram através de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais, o parasitismo, por *L. (L.) mexicana* em roedores das espécies *Ototylomys phyllotis*, *Oryzomys melanotis*, *Peromyscus yucatanicus* e *Sigmodon hispidus* e em humanos, confirmando o caráter zoonótico em foco de LT. Nesta mesma localidade, Wynsberghe et al. (2000) acompanharam por dois anos, 29 animais das espécies *P. yucatanicus* e *O. phyllotis*, infectados naturalmente, e concluíram que ambos são reservatórios primários dessa espécie de *Leishmania*.

De Lima et al. (2002), na Venezuela, detectaram a presença de *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) braziliensis* em *Rattus rattus*, por meio da PCR e hibridização com sondas específicas.

Oliveira et al. (2005), em Araçuaí, MG, estudando roedores silvestres e sinantrópicos relataram positividade pela PCR em amostras de sangue e pele para espécies do complexo *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. A presença de DNA de *Leishmania* pertencente aos três complexos foi confirmada em *Rattus rattus*. As espécies *Oryzomys subflavus* e *Thricomys apereoides* foram positivas para *L. mexicana* e *L. braziliensis*, respectivamente.

A participação de felídeos silvestres na cadeia epidemiológica das leishmanioses ainda é insipiente. Há relatos na literatura sobre a presença de infecções por *Leishmania* sp., no Sudão e na Espanha, em *Felis serval phillipsi* e *Lynx pardinus*, respectivamente (HOOGSTRAAL; DIETLEIN, 1964; SOBRINO et al., 2008).

No Brasil, até o momento não se tem relato na literatura científica de infecção por *Leishmania* sp. em felídeos silvestres, com exceção do estudo realizado por Jorge (2008), detectando *Leishmania* do subgênero *Viannia* em jaguatirica.

A primeira descrição de leishmaniose felina (*Felis catus domesticus*) data de 1927 em três animais na Venezuela (BONFANTE-GARRIDO et al., 1991). Desde então a doença tem sido esporadicamente notificada nesses animais em diversas partes do mundo, tanto na forma visceral como cutânea.

No Brasil, Mello (1940) realizou no Pará, o primeiro diagnóstico de LT em gato doméstico através da visualização de formas amastigotas em *imprint* de lesões dermatológicas em plano nasal e auricular.

Em Minas Gerais, Passos et al. (1996) identificaram, pela PCR, parasita do subgênero *Viannia*, em felinos, porém acreditavam que este animal era somente um hospedeiro acidental. No Rio de Janeiro, relatou-se a ocorrência de infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em animal que apresentava manifestações clínicas na região da face (FIGUEIREDO et al., 2008b).

Em Mato Grosso do Sul, foi relatado um caso de leishmaniose felina por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, em animal que apresentava lesões nodulares na face, próximas ao plano nasal, na ponta das orelhas e nos dígitos de todas as extremidades dos membros, através da técnica de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais específicos (SOUZA et al., 2005).

Em Portugal, DNA de *L. infantum* foi detectado no sangue de sete gatos domésticos assintomáticos, acreditando os autores que este animal pode atuar como um bom reservatório do parasita e que seu papel na epidemiologia de LV deve ser melhor esclarecido (MAIA; NUNES; CAMPINO, 2008).

Nas Américas, Savani et al. (2004) registraram o primeiro caso de LV em gato doméstico (*Felis catus domesticus*). O animal, procedente de Cotia, SP, apresentava lesão ativa nodular em plano nasal, o que possibilitou o diagnóstico parasitológico e a identificação do parasita como *L. (L.) infantum chagasi* através de sequenciamento do DNA. Este resultado surpreendeu os autores, pois na região não havia casos autóctones de LV humana, bem como canina, sugerindo que o gato poderia desempenhar um papel importante como potencial reservatório do parasita na área.

No Rio de Janeiro, Silva et al. (2008) fizeram o primeiro relato de *L. infantum chagasi* em gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) assintomáticos triados por imunofluorescência e confirmados pela PCR e hibridização.

Em Campo Grande, Noé (2008), ao estudar soro de 110 gatos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) encontrou uma positividade de 7,27%.

Os gatos domésticos podem percorrer grandes distâncias para caçar, sendo que este comportamento pode favorecer a picada do vetor, uma vez que estes insetos apresentam atividade noturna e são ecléticos quanto ao hábito alimentar (NOÉ, 2008; OLIVEIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2005; ).

Lainson e Rangel (2005) consideram que para ser um bom reservatório de *Leishmania* sp., além de desempenhar importante papel na manutenção e disseminação do parasita em condições naturais, também acreditam que seja essencial a infecção no vetor invertebrado através do repasto sanguíneo, caso contrário devem ser denominados apenas como potenciais reservatórios.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a presença de *Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Identificar a procedência das espécies de animais silvestres com a presença de *Leishmania* sp;

Verificar a idade e sexo das espécies de animais estudadas;

Analisar a positividade para *Leishmania* sp. por meio de diferentes técnicas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de estudo

Estudo analítico, seccional, com coleta de dados primários.

### 4.2 Objeto de estudo

No presente trabalho foram estudados canídeos silvestres das seguintes espécies: *Cerdocyon thous*, *Pseudalopex vetulus* e *Chrysocyon brachyurus*; marsupiais: *Didelphis albiventris* e *Lutreolina crassicaudata*; felídeos: *Puma concolor*; dasiproctídeos: *Dasyprocta azarae* e procionídeos: *Procyon cancrivorus* e *Nasua nasua*, rotineiramente recepcionados pelo Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) de Campo Grande, MS. Também foram pesquisados os canídeos silvestres *Chrysocyon brachyurus* do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade de Viçosa, MG (CETAS-UFV) e *Cerdocyon thous*, *Pseudalopex vetulus* e *Chrysocyon brachyurus* do Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (ZOO-UFMT) e também desta instituição *Procyon cancrivorus*.

### 4.3 Identificação e cadastramento dos animais

Os animais foram examinados clinicamente e as informações de identificação, procedência, estado geral e histórico do animal anotadas em fichas próprias para esta pesquisa (Apêndice A). Nos animais recepcionados no CRAS, no momento da colheita do material biológico, foi implantado *microchip* no tecido subcutâneo da região occipital e o número anotado na respectiva ficha de cada animal.

### 4.4 Colheita e processamento do material biológico

Para a colheita do aspirado medular e sangue periférico, os animais foram submetidos à anestesia com cloridrato de xilazina (200mg/mL) associado ao cloridrato de quetamina (100g/mL), por via intramuscular, com seringas de 1 a 3mL e agulhas (21G ou 26G).

Para a colheita do aspirado medular foi realizada a tricotomia e antisepsia das regiões a serem puncionadas, com água, sabão e álcool a 70%. Nos canídeos e marsupiais, o aspirado foi realizado na articulação tíbio-fíbio-rotuliana e nos felídeos, no esterno, com seringa de 20mL (com anticoagulante) e agulha 18G em ambos os casos. Após a punção medular, os animais foram mantidos sob observação durante 24 horas para a verificação da ausência de transtornos pós-colheita.

Para a colheita do sangue periférico foi puncionada a veia jugular ou radial para obtenção do soro e sangue total, utilizando-se seringas de 5 a 10mL e agulhas de 21G, dependendo do tamanho do animal. Nos marsupiais e roedores foi realizada punção cardíaca com seringas de 3mL e agulhas 20G.

Parte do aspirado medular e do sangue periférico colhidos foram utilizados para pesquisa direta de amastigotas, e o isolamento de *Leishmania* sp. em meio de cultura e identificação genérica pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Para a pesquisa direta do parasita foram confeccionados esfregaços delgados de aspirado medular e sangue periférico. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa, por um período de 20 minutos, sendo posteriormente observadas à microscopia óptica, em objetiva de 100X.

Para o isolamento do parasita, gotas de aspirado medular e sangue periférico foram semeadas em meio de cultura NNN (Neal, Novy e Nicolle) com fase líquida constituída de meio *Schnneider's* acrescida de 1.000 UI de penicilina/mL e 100µg de sulfato de gentamicina/mL. As culturas foram mantidas a 24°C em estufa incubadora B.O.D., FANEM, modelo 347, e examinadas semanalmente, a partir do 7º até o 30º dia, sendo repicadas quando positivas.

Foram inoculados 0,5mL de aspirado medular dos animais silvestres, por via intraperitoneal em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com aproximadamente 40 dias de vida e de ambos os sexos. Os hamsters foram examinados semanalmente, por um período de três a quatro meses, em busca de alterações clínicas. Quando do aparecimento de sinais ou decorrido o período supramencionado, após analgesia com cloridrato de xilazina (200mg/mL) associado com cloridrato de quetamina (100g/mL) via intramuscular, procedeu-se a eutanásia, por secção da artéria aorta abdominal seguida de necropsia.

Após a eutanásia foi procedido o *imprint* de fragmentos de baço e fígado, corados pela técnica de Giemsa, para pesquisar a presença de *Leishmania*. Para o

isolamento do mesmo, os fragmentos de baço e fígado foram triturados e semeados em meio *NNN-Schnneider's* conforme descrito.

O restante do aspirado medular foi armazenado em tubo *ependorf* e criopreservado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  para realização da técnica de PCR, processada no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em parceria com a Universidade Federal do Piauí (UFPI).

#### 4.4.1 Pesquisa de anticorpos (Ensaio Imunoenzimático-ELISA)

As amostras de soro dos canídeos foram aliqüotadas em tubetes de 1,5 mL e mantidas congeladas até o momento de realização da sorologia. Foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por meio do Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) da Biogene®, em parceria com a Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP-Anhanguera), conforme técnica descrita pelo fabricante. Placas NUNC® MAXISORP foram sensibilizadas por 4 horas sob a temperatura ambiente com 100 $\mu\text{L}$  do antígeno diluído em tampão PBS, pH 7,4. Após lavagem da placa com PBST, pH 7,4 foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  dos soros teste e controle diluídos em solução de coleta a 1:100. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram lavadas três vezes com tampão PBST, pH 7,4 e em seguida adicionou-se o conjugado com Proteína A, ligada a peroxidase, diluído a 1:10.000 em tampão PBST, pH 7,4. A incubação foi feita por 30 minutos e em seguida a placa foi lavada como descrito anteriormente. A solução de revelação (tampão citrato 10mL+TMB 100 $\mu\text{L}$ +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 $\mu\text{L}$ ) foi adicionada e a parada da reação foi efetuada após 20 minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 450nm.

Para a validação do teste foram consideradas as densidades ópticas dos controles não reagentes, sendo estes sempre inferiores a 0,100 e a dos controles reagentes, superiores a 0,300.

Os reagentes utilizados integram o KIT da Biogene®.

Para o cálculo do ponto de corte (*cut-off*) foi obtida a média dos soros não reagentes e somada ao fator  $R=0,142$ . Para a determinação da zona cinza subtraiu-se 0,03 do ponto de corte.

#### 4.4.2 Caracterização das cepas

##### 4.4.2.1 Extração do DNA

As amostras de aspirado medular e sangue periférico foram colhidas em frascos contendo EDTA, processadas e submetidas a extração do DNA, utilizando o kit Wizard DNA Purification®, de acordo com as recomendações do fabricante, conforme descrito a seguir.

Para a obtenção dos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) foram adicionados 300µL de amostra a um microtubo estéril de 1,5mL e 900µL de solução de Lise Celular (*Cell Lysis Solution*), que foram misturados por inversão seis vezes. Após este procedimento, a amostra foi incubada por dez minutos e centrifugada a 16.000 *xg* por 20 segundos, em temperatura ambiente para lise das hemácias. O sobrenadante foi descartado, permanecendo no tubo um *pellet* contendo as células brancas, que foi homogeneizado em vórtex para a ressuspensão das mesmas.

Ao *pellet* de células brancas foi adicionado 300µL da solução de lise de núcleo (*Nuclei Lysis Solution*) e homogeneizado seis vezes para lisar as células brancas. Ao lisado nuclear foi adicionado 100µL de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*), homogeneizado por vórtex, por 10 a 20 segundos, e centrifugado a 16.000 *xg* por três minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol, misturado delicadamente por inversão até as duplas fitas de DNA ficarem visíveis e foi centrifugado a 16.000 *xg* por 1 minuto à temperatura ambiente. O DNA ficou visível como um pequeno *pellet* branco.

A seguir, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 300µL de etanol 70% e centrifugou-se a 16.000 *xg* por 1 minuto à temperatura ambiente para lavar o DNA. Aspirou-se cuidadosamente o etanol, deixando o tubo invertido sobre papel absorvente por 15 minutos. Ao final, adicionou-se 100µL de solução de reidratação de DNA (*Rehydration Solution*) ao tubo e incubou-se o DNA ressuspensado *overnight* a 4°C.



#### 4.4.2.2 Técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada tendo como alvo uma região conservada de DNA de cinetoplasto de 720 pb de *Leishmania*.

Para cada 5 $\mu$ L de amostra foi adicionado 12,5 $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix (Promega) e 1 $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (LIN R4 e LIN 19), e 25 $\mu$ L de água ultrapura estéril q.s.p., livre de sais e íons. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas estão descritas a seguir (ARANSAY; SCOULICA; TSELENTIS, 2000):

LIN R4 5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG - 3'

LIN 19 5'- CAG AAC GCC CCT ACC CG - 3'

A amplificação foi realizada utilizando um ciclo de pré-aquecimento de 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos com pré-desnaturação de 95°C por 3 minutos e desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos oligonucleotídeos a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com pós-extensão a 72°C por 7 minutos, em termociclador de marca BIOER *XP Cyclor*.

#### 4.4.2.3 Identificação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em eletroforese com gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio. Para tanto 8 $\mu$ L dos produtos amplificados foram homogeneizados com 2 $\mu$ L de solução de azul de bromofenol e submetidos a corrida eletroforética a 120 volts por 40 minutos em tampão tris-borato EDTA (TBE) 1x. A visualização das bandas foi realizada sob incidência de luz ultravioleta, com filtro de 300nm.

### 4.5 Aspectos éticos

Foi obtida, junto ao Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade (SISBIO), a licença nº 13838-1 para colheita e transporte das amostras (Anexo A), assim como o Certificado, de protocolo nº. 179/2008, concedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS (Anexo B).

## 5 RESULTADOS

Um total de 101 animais silvestres foi submetido à colheita de material para a pesquisa de *Leishmania* sp., compreendendo nove espécies pertencentes a cinco famílias (Canidae, Didelphidae, Felidae, Procyonidae e Dasyproctidae) (Tabela 1).

Distribuição de animais silvestres, segundo a família, espécie e procedência, Centros de Reabilitação, Triagem e Zoológico – 2008 a 2009

Tabela 1 - Distribuição de animais silvestres, segundo família, espécie e procedência, Centros de Reabilitação, Triagem e Zoológico – 2008 a 2009

Espécie	Procedência			Nº	%
	CRAS <sup>(1)</sup>	CETAS <sup>(2)</sup>	ZOO <sup>(3)</sup>		
Família Didelphidae					
<i>Didelphis albiventris</i> (Lund, 1840)	54	-	-	54	53,46
<i>Lutreolina crassicaudata</i> (Thomas, 1910)	1	-	-	1	0,99
Família Canidae					
<i>Cerdocyon thous</i> (Linnaeus, 1766)	8	-	8	16	15,84
<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Illiger, 1815)	1	6	2	9	8,91
<i>Pseudalopex vetulus</i> (Lund, 1842)	5	-	2	7	6,93
Família Felidae					
<i>Puma concolor</i> (Linnaeus, 1771)	7	-	-	7	6,93
Família Procyonidae					
<i>Procyon cancrivorus</i> (Cuvier, 1798)	1	-	3	4	3,96
<i>Nasua nasua</i> (Linnaeus, 1766)	2	-	-	2	1,98
Família Dasyproctidae					
<i>Dasyprocta azarae</i> (Illiger, 1811)	1	-	-	1	0,99
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>101</b>	<b>100,00</b>

<sup>(1)</sup> CRAS - Centro de Reabilitação de Animais Silvestres, CRAS, MS

<sup>(2)</sup> CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres, UFV, MG

<sup>(3)</sup> ZOO - Zoológico da UFMT, MT

Em relação ao sexo, foram incluídas na amostra 61 machos e 40 fêmeas, sendo 77 adultos e 24 jovens (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição de animais silvestres segundo sexo e idade, Centros de Reabilitação, Triagem e Zoológico – 2008 a 2009

Animais	n	Sexo		Idade	
		Macho	Fêmea	Adulto	Jovem
Gambá ( <i>D. albiventris</i> )	54	32	22	42	12
Lobinho ( <i>C. thous</i> )	16	9	7	9	7
Lobo guará ( <i>C. brachyurus</i> )	9	3	6	7	2
Raposas ( <i>P. vetulus</i> )	7	5	2	6	1
Mão pelada ( <i>P. cancrivorus</i> )	4	2	2	4	-
Onça ( <i>P. concolor</i> )	7	7	-	5	2
Quati ( <i>N. nasua</i> )	2	2	-	2	-
Cutia ( <i>D. azarae</i> )	1	-	1	1	-
Cuíca ( <i>L. crassicaudata</i> )	1	1	-	1	-
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>61</b>	<b>40</b>	<b>77</b>	<b>24</b>

Não houve possibilidade de colheita de amostras biológicas para todas as análises propostas na metodologia, uma vez que o tamanho, a idade e as condições clínicas não permitiram a intervenção sem risco para o animal; ocasionando diferenças entre o total de animais examinados e o número de amostras.

O uso associado dos anestésicos cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina, nas colheitas, permitiu o manejo com segurança. É importante ressaltar que não houve óbito dos animais estudados com esses procedimentos de colheita.

Ao exame físico apenas dois animais apresentaram características clínicas compatíveis com leishmaniose. O primeiro animal, um macho adulto de onça parda (*P. concolor*) recepcionada pelo CRAS, procedente de Corumbá, MS, em cativeiro apresentava regiões de alopecia recorrente em cauda e abdômen. O segundo, uma lobinha (*C. thous*) fêmea adulta, em cativeiro, no zoológico da UFMT, apresentou onicogribose, úlcera de córnea com secreção ocular purulenta, lesões cutâneas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia confirmada na ultrassonografia. Pelo fato de ter clínica compatível com a parasitose, foram realizados mais dois procedimentos; aspirado de linfonodo e biópsia da lesão de pele, sendo que só foi possível realizar o diagnóstico parasitológico neste lobinho.

Foi possível visualizar amastigotas em lâminas confeccionadas com aspirado medular de uma fêmea adulta de *Didelphis albiventris*, recepcionada no CRAS e procedente da área urbana de Campo Grande, MS. No sangue periférico não foram observadas formas parasitárias.

Amostras de sangue total de 88 animais foram submetidas a PCR para detecção de DNA de *Leishmania* sp. Foi possível verificar a presença de DNA do parasita em 30 animais (34,09%).

Em 53 amostras de aspirado medular obteve-se 47,16% de positividade em *D. albiventris*, *C. thous*, *P. concolor*, *P. cancrivorus*, e *D. azarae*, conforme tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição de animais silvestres segundo a espécie e positividade pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Leishmania* sp. em aspirado medular e sangue periférico, Centros de Reabilitação, Triagem e Zoológico – 2008 a 2009

Espécie	Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> sp.			
	SP <sup>(1)</sup>	%	AM <sup>(2)</sup>	%
<i>D. albiventris</i>	13/46	28,26	12/19	63,15
<i>C. thous</i>	4/13	30,76	8/12	66,66
<i>C. brachyurus</i>	3/9	33,33	0/9	-
<i>P. vetulus</i>	2/6	33,33	0/3	-
<i>P. concolor</i>	3/7	42,85	2/6	33,33
<i>P. cancrivorus</i>	2/3	66,66	2/3	66,66
<i>N. nasua</i>	2/2	100,00	-	-
<i>L. crassicaudata</i>	1/1	100,00	-	-
<i>D. azarae</i>	0/1	-	1/1	100,00
<b>Total</b>	<b>30/88</b>	<b>34,09</b>	<b>25/53</b>	<b>47,16</b>

<sup>(1)</sup> SP: sangue periférico de 88 animais, <sup>(2)</sup> AM: aspirado medular de 53 animais.

Nota: estas diferenças refletem as dificuldades de manejo durante os procedimentos de coleta.

Um *C. thous* fêmea adulta, atropelada em via urbana de Campo Grande, MS e recepcionada pelo CRAS foi a óbito, sendo realizada a necropsia com retirada de fragmentos de fígado, baço e linfonodo, os quais foram submetidos à PCR, apresentando resultados positivos.

Na semeadura de aspirado medular em meio específico, foram observadas formas promastigotas na primeira semana pós-inóculo, somente em um lobinho (*C. thous*) de cativeiro do zoológico da UFMT.

A inoculação de aspirado medular de uma raposa macho adulto (*Pseudalopex vetulus*), recepcionada pelo CRAS e procedente de Três Lagoas, MS, em hamster permitiu a infecção deste animal, comprovada pela presença de amastigotas em lâminas de fígado e baço do mesmo após a necropsia. Posteriormente estes órgãos foram macerados e submetidos à extração de DNA para a realização da PCR e ambos apresentaram positividade para *Leishmania* sp.

Foi analisado um total de 33 animais entre canídeos (29) e procionídeos (quatro) quanto a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Foram soro-reagentes seis lobinhos (*C. thous*), sendo, três recepcionados pelo CRAS e procedentes de Miranda e Bela Vista, em MS e do Parque Nacional das Emas, em GO, e três de cativeiro, do zoológico da UFMT, MT. Apenas um procionídeo recepcionado pelo CRAS e proveniente da área urbana de Campo Grande, MS, foi reagente (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição de carnívoros silvestres segundo a espécie e soropositividade no ensaio imunoenzimático (ELISA), Centros de Reabilitação, Triagem e Zoológico – 2008 a 2009 (n = 33)

Espécies	CRAS <sup>(1)</sup>		CETAS <sup>(2)</sup>		ZOO <sup>(3)</sup>	
	positivo/n	%	positivo	%	positivo	%
<i>C. thous</i>	3/7	42,85	-	-	3/8	37,50
<i>P. vetulus</i>	0/4	-	-	-	0/2	-
<i>C. brachyurus</i>	-	-	0/6-	-	0/2	-
<i>P. cancrivorus</i>	1/1	100,00	-	-	0/3	-

<sup>(1)</sup> CRAS - Centro de Reabilitação de Animais Silvestres, MS.

<sup>(2)</sup> CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres, UFV, MG.

<sup>(3)</sup> ZOO - Zoológico da UFMT, MT.

Na Figura 1, estão apresentados os resultados do diagnóstico pelo ELISA e pela PCR para *Leishmania* sp. em canídeos e procionídeos segundo a procedência, idade estimada e sexo.

<b>Espécie</b>	<b>Identificação</b>	<b>Procedência</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>ELISA</b>	<b>PCR</b>
<i>C. thous</i> (Lobinho)	RS 15/08	C. Grande, MS	J	M	-	-
	RS 31/08	C. Grande, MS	A	M	NR	NR
	RS 32/08	Pq. Emas, GO	A	F	+	NR
	RS 41/08	Bela Vista, MS	J	F	+	+
	RS 42/08	Miranda, MS	J	M	+	+
	RS 49/08	C. Grande, MS	A	F	-	-
	RS 56/08	C. Grande, MS	A	F	-	NR
	RS 79/08	Dourados, MS	J	F	-	-
	RS 95/08	Cuiabá, MT	A	M	+	+
	RS 96/08	Cuiabá, MT	J	F	-	-
	RS 97/08	Cuiabá, MT	J	F	-	+
	RS 105/08	Cuiabá, MT	J	M	-	+
	RS 106/09	Cuiabá, MT	A	F	-	+
	RS 107/09	Cuiabá, MT	A	F	+	+
	RS 108/09	Cuiabá, MT	A	M	+	+
RS 109/09	Cuiabá, MT	A	M	-	+	
<i>C. brachyurus</i> (Lobo guará)	RS 70/08	Batayporã, MS	A	F	NR	+
	RS 84/09	Diamante, MG	A	F	-	-
	RS 85/09	Viçosa, MG	A	M	-	-
	RS 86/09	Tabuleiro, MG	A	F	-	+
	RS 87/09	Viçosa, MG	A	M	-	+
	RS 88/09	Viçosa, MG	J	F	-	-
	RS 89/09	Viçosa, MG	J	M	-	-
	RS 100/09	Cuiabá, MT	A	F	-	-
	RS 101/09	Cuiabá, MT	A	F	-	-
<i>P. vetulus</i> (Raposa)	RS 03/08	C. Grande, MS	J	M	-	+
	RS 04/08	C. Grande, MS	A	M	-	+
	RS 05/08	C. Grande, MS	A	M	NR	-
	RS 07/08	C. Grande, MS	A	F	-	-
	RS 21/08	Três Lagoas, MS	A	M	-	+
	RS 98/09	Cuiabá, MT	A	M	-	-
	RS 99/09	Cuiabá, MT	A	F	-	-
<i>P. cancrivorus</i> (Mão pelada)	RS 55/08	C. Grande, MS	A	M	+	NR
	RS 102/09	Cuiabá, MT	A	F	-	+
	RS 103/09	Cuiabá, MT	A	F	-	+
	RS 104/09	Cuiabá, MT	A	M	-	+

Figura 1 - *Leishmania* sp. em carnívoros silvestres segundo a procedência, idade, sexo e positividade no ELISA e na PCR (n=36)

Legenda: NR: Não Realizado; RS: Reservatório Silvestre; PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; A: adulto; J: jovem.

A Figura 2 mostra o resultado da PCR de dois lobinhos (*C. thous*), dos seguintes animais.

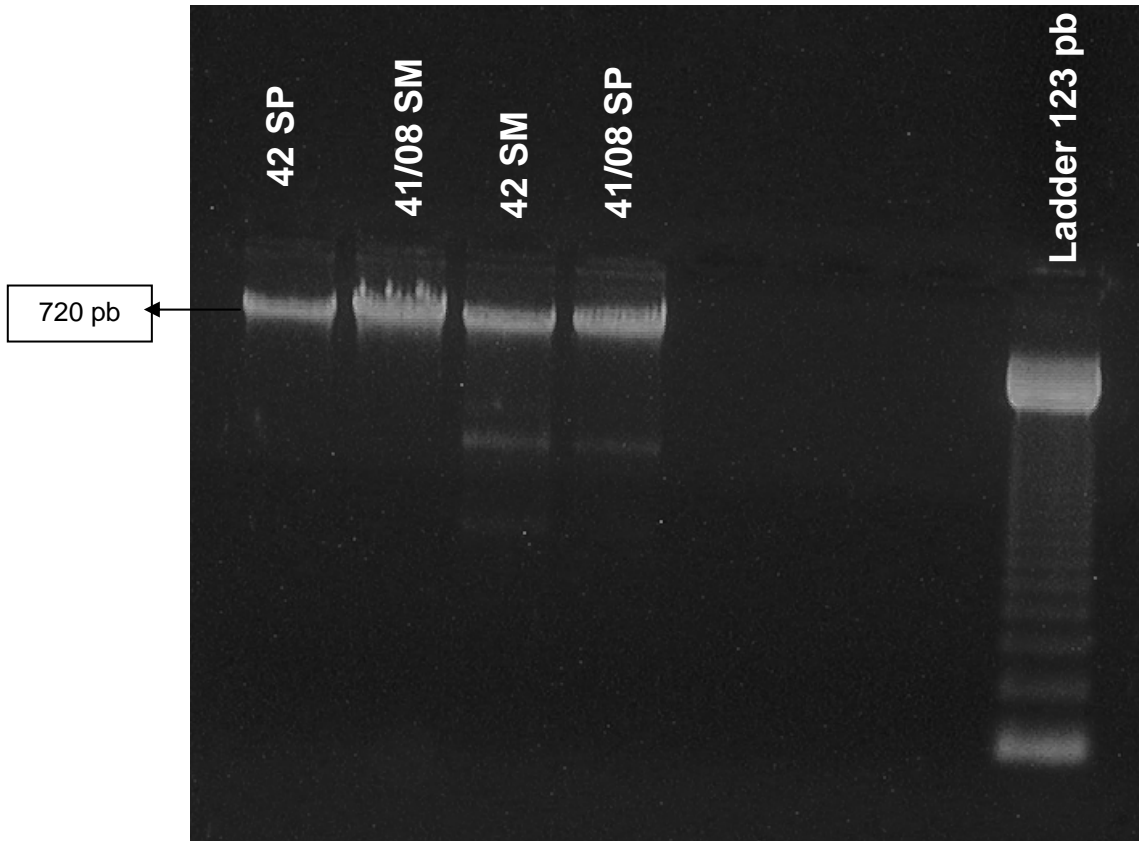


Figura 2 - Resultado da PCR em amostras de aspirado medular e sangue periférico de dois *C. thous* utilizando marcador de 123 pb e *primers* Lin R4 e 19

Legenda: 42 SP: nº animal, Sangue Periférico, 42 SM: nº animal, Aspirado Medular  
41/08 SP: nº animal, Sangue Periférico, 41/08 SM: nº animal, Aspirado Medular

Na tabela 5 encontra-se o total de 54 gambás amostrados, com 22 positivos de acordo com a procedência, sexo e idade.

Tabela 5 - Distribuição de animais da espécie *Didelphis albiventris* segundo a região de procedência, sexo, idade e positividade para *Leishmania* sp., Centro de Reabilitação de Animais Silvestres - 2008 a 2009

Regiões	positivos/n	sexo		idade	
		macho	fêmea	adulto	jovem
Prosa	4/13	8	5	11	2
Segredo	1/4	4	-	4	-
Centro	3/6	4	2	4	2
Bandeira	8/18	9	9	14	4
Anhanduizinho	2/6	4	2	4	2
Imbirussu	2/3	1	2	2	1
Lagoa	2/3	1	2	2	1
Não informado	0/1	1	-	1	-
<b>Total</b>	<b>22/54</b>	<b>32</b>	<b>22</b>	<b>42</b>	<b>12</b>

Do total de 101 animais examinados, 48 apresentaram resultado positivo para *Leishmania* sp. em pelo menos uma técnica realizada, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição de animais silvestres, segundo espécie e presença de *Leishmania* sp. em Centros de Reabilitação, Triagem e Zoológico – 2008 a 2009

Espécies	positivos/n	%
<i>Didelphis albiventris</i>	22/54	40,74
<i>Cerdocyon thous</i>	9/16	62,50
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	3/9	33,33
<i>Pseudalopex vetulus</i>	3/7	42,85
<i>Puma concolor</i>	3/7	42,85
<i>Procyon cancrivorus</i>	3/4	75,00
<i>Nasua nasua</i>	2/2	100,00
<i>Dasyprocta azarae</i>	1/1	100,00
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	1/1	100,00
<b>Total</b>	<b>48/101</b>	<b>47,52</b>



## 6 DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro em Mato Grosso do Sul, uma vez que envolveu animais silvestres de vida livre e de cativeiro compreendendo diversas espécies procedentes de diferentes localidades.

A identificação de animais silvestres como reservatórios e sua relevância na cadeia epidemiológica das leishmanioses, é primordial e motivo de debates. No passado, a pesquisa de reservatórios vertebrados era tendenciosa, pois se esperava identificar alterações clínicas evidentes. Compreendeu-se, posteriormente, que processos ou lesões visíveis poderiam não estar presentes devido à adaptação destes animais ao parasitismo ao longo da sua evolução, havendo necessidade de maiores estudos (ASHFORD, 1996; ASHFORD; BETTINI, 1987).

No presente estudo, *C. thous* conhecidos como lobinho, cachorro do mato ou raposa, submetidos à pesquisa de *Leishmania* sp., apresentaram resultados positivos na PCR e na sorologia, sendo que todos eram procedentes de áreas endêmicas no Centro-Oeste. Este achado reveste-se de importância porque a raposa é fonte de infecção tão eficiente para os flebotomíneos quanto canídeos domésticos (LAINSON et al., 1990).

Em Corumbá, MS, foco de leishmaniose visceral canina, Mello et al. (1988) encontraram um espécime de *Cerdocyon thous* infectado naturalmente com *L. (L.) chagasi*. Luppi et al. (2008) relataram a soropositividade, através de ELISA e RIFI, em um animal com mais de nove anos de idade, no zoológico de Belo Horizonte. É importante considerar que animais silvestres mantidos em cativeiro em áreas endêmicas para LV, como no CRAS e no zoológico da UFMT, podem estar mais suscetíveis à infecção, uma vez que os cuidados dispensados, em geral, aumentam a vida média e conseqüentemente a exposição ao parasita.

Vale destacar que animais silvestres, fora de seu habitat natural, são submetidos a condições de confinamento o que interfere em seu comportamento e na sua dieta. Estas alterações contribuem para situações de estresse podendo influenciar no aparecimento ou agravamento de manifestações clínicas. No presente estudo foi observado sinais compatíveis com LV em um lobinho (RS107/09) adulto, mantido em cativeiro por mais de dois anos, com diagnóstico parasitológico confirmado.

Deane e Deane (1955), em estudo realizado no estado do Ceará afirmaram que *C. thous* seria uma fonte importante de infecção de LV humana pela presença de alto parasitismo, bem como pelo comportamento sinantrópico dos mesmos. Na Amazônia foi detectada uma alta frequência de *L. chagasi* nesses animais, sendo estes considerados a fonte de infecção silvestre mais importante na região, inclusive sendo apontados como responsáveis pela manutenção do parasita em localidades onde a população é esparsa ou ausente (LAINSON, 1983; LAINSON et al., 1990).

Já no estudo realizado por Courtenay et al. (2002) na Ilha de Marajó, apesar de ter sido detectada uma alta prevalência, tanto em sorologia quanto PCR, em lobinhos *C. thous*, os autores não acreditaram que estes animais seriam importantes na cadeia epidemiológica de LV, principalmente devido à baixa infectividade no xenodiagnóstico realizado com *Lutzomyia longipalpis*. Diante disto, verificou-se que há controvérsias em relação ao papel do *C. thous* como fonte de infecção na natureza. Dessa forma, considera-se que mais estudos são necessários para elucidar tal questão.

Entre os canídeos estudados no presente trabalho, estão as raposas, *Pseudalopex vetulus*; sendo que, os animais que apresentaram-se positivos eram procedentes de MS, inclusive de Três Lagoas, cidade considerada área de intensa transmissão de LV no estado (OLIVEIRA, A. L. et al., 2006).

Deane (1956) no Ceará, ao estudar 33 espécimes de *P. vetulus* encontrou quatro destes infectados por *Leishmania donovani*, julgando que esta espécie poderia exercer um papel essencial na transmissão do calazar nos focos epidêmicos.

Luppi et al. (2008) encontraram duas raposas positivas à sorologia e à PCR, de seis pesquisadas, mantidas no zoológico de Belo Horizonte, sendo que uma destas apresentava sintomas cutâneos compatíveis com LV.

Com relação aos lobos guarás (*C. brachyurus*), no presente estudo, nenhum animal apresentou resultado positivo na sorologia, apenas positividade ao PCR, diferindo dos achados de Curi, Miranda e Talamoni (2006) que, em estudo realizado em dois assentamentos próximos ao Parque Nacional Serra do Cipó, MG encontraram 28,6% de animais soropositivos, dentre sete estudados. Luppi et al. (2008), ao estudarem sete animais em cativeiro no zoológico de Belo Horizonte, relataram a positividade em apenas um animal, sendo que este foi reagente na imunofluorescência indireta e na PCR. Inclusive esta espécie consta da lista

vermelha dos animais ameaçados de extinção na condição de vulnerável, tornando ainda mais relevante o estudo das doenças infecciosas e parasitárias em lobos guarás (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008).

Foram avaliados procionídeos, mão pelada ou guaxinins (*P. cancrivorus*), com resultados positivos para *Leishmania* sp., todos procedentes da zona urbana de Campo Grande, MS. Na literatura há somente o estudo realizado por Jorge (2008) no Pantanal Matogrossense, no qual encontrou o parasita em um exemplar de *P. cancrivorus*. Em São Luis, MA, Dias, Lorosa e Rebêlo (2003) ao estudarem o hábito alimentar de *Lu. longipalpis*, relataram a presença de guaxinins próximos as residências. Estes animais vivem em tocas e têm como hábitat áreas de mata próximas a rios, brejos, pântanos e mangues, porém, devido à degradação ambiental apresentam comportamento altamente sinantrópico, fato esse que o torna motivo relevante de estudos para elucidar o seu papel na cadeia epidemiológica das leishmanioses (SANTOS et al., 2007).

No presente estudo, os carnívoros foram submetidos a sorologia, porém, vale ressaltar que a utilização destes testes, que são de uso rotineiro em animais domésticos como métodos diagnósticos, em animais silvestres, apresentam limitações. A maioria dos testes ainda não foi adequadamente padronizada para estes animais, uma vez que a cepa de *Leishmania* pode ser diferente e a resposta humoral do hospedeiro silvático ainda não está bem definida. Outra consideração é com relação à possibilidade de reações cruzadas com outros tripanonossomatídeos e também com organismos filogeneticamente distantes (GARDNER; HIETALA; BOYCE, 1996; MELO, 2004).

A técnica PCR é uma ferramenta valiosa em estudos epidemiológicos, permitindo a detecção de DNA de *Leishmania* sp. em diferentes tipos de amostras de humanos, reservatórios e vetores, sem a necessidade de exaustivos isolamentos do parasita. Esta técnica tem sido utilizada para detectar a infecção em animais silvestres de áreas endêmicas, permitindo a identificação de possíveis reservatórios (ALEXANDER et al., 1998; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; DE LIMA et al., 2002; KERR; MCHUGH; MERKELZ, 1999; TELLERIA et al., 1999).

No presente trabalho, a PCR mostrou-se uma técnica eficaz na investigação do parasita nos animais estudados. Ainda que o método de biologia molecular para detecção direta de *Leishmania* sp. seja considerado diagnóstico de alto custo e necessite de mão de obra qualificada, permite trabalhar com pequena quantidade de

material biológico, independentemente do tipo de amostra (sangue, fragmentos de órgãos e pele, entre outros). Esta qualidade vem ao encontro das dificuldades e limitações encontradas na logística de manejo e colheita de material nos animais silvestres.

O encontro de dois quatis (*N. nasua*) de Campo Grande parasitados com *Leishmania* sp. evidencia a possibilidade destes animais serem considerados potenciais veiculadores do parasita, um fator de risco que merece maiores estudos, principalmente considerando que não há relatos na literatura. Aliado a isto, existe o fato de serem animais diurnos, viverem em áreas florestais, em grupos, e percorrerem em torno de 1,5 a 2 km diariamente à procura de alimento, além de terem comportamento sinantrópico (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008).

Por outro lado, gatos domésticos têm o hábito de entrar nas matas para caçar ou brincar, sejam estas nativas ou secundárias degradadas, próximas a áreas residenciais e é neste ambiente propício que se tem maior chance de infecção, pelo aumento da exposição ao vetor (FIGUEIREDO et al., 2008b; SOUZA et al., 2005). Isto vem sendo demonstrado em estudos com felídeos domésticos em Campo Grande, MS e no Rio de Janeiro, RJ que têm revelado infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. infantum chagasi*, respectivamente (SILVA et al. 2008; SOUZA et al. 2005).

Com relação aos felídeos silvestres, no Brasil, Jorge (2008) relatou o encontro de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, identificada por PCR em um espécime de *Leopardus pardalis*, conhecido como jaguatirica. No Sudão, Hoogstraal e Dietlein, (1964) registraram *Leishmania* sp. em *Felis serval phillipsi* e na Espanha, há um relato de Sobrino et al. (2008) sobre a presença de DNA de *L. infantum* em lince-ibérico, *Lynx pardinus*.

No presente estudo, dos animais pesquisados quanto à presença de *Leishmania* sp., três onças pardas (*Puma concolor*), apresentaram-se positivas ao PCR, sendo que uma delas com sintomas recorrentes em pele do abdome e da cauda. É importante relatar que este animal era procedente de Corumbá, área endêmica de LV canina e humana e, está mantido em cativeiro desde 2001 no CRAS. Isto suscita um questionamento quanto ao período e local de infecção, pois as duas localidades são consideradas áreas de risco para LV.

Considerando que o município de Campo Grande apresenta 15% de cães soropositivos para leishmaniose visceral (MATO GROSSO DO SUL, 2006), o

encontro de *Leishmania* sp. em gambás *Didelphis albiventris*, capturados em todas as regiões da cidade, requer mais estudos para esclarecer o papel destes animais na cadeia epidemiológica da parasitose.

O encontro de um expressivo número de gambás infectados na fase adulta, considerando que este estágio é atingido por volta de nove a 10 meses e que a vida média gira em torno de 4 a 5 anos (CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 1999), sugere a possibilidade de que estes animais estejam se infectando por permanecerem em contato por mais tempo com a população. Deve-se levar em consideração que estes animais, à medida que vão atingindo a maturidade, aumentam o seu raio de dispersão (CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 2006).

A cidade apresenta muitas áreas verdes e remanescentes de matas, o que contribui para a presença de gambás próximos às residências. Além disso, a degradação destes ecótopos pela ação antrópica faz com que estes animais saiam dos seus habitats naturais em busca de alimento e abrigo. Outra característica que sustenta este comportamento sinantrópico é o hábito da população em ruralizar os seus quintais, com a criação de animais, tais como galinhas, e cultivo de árvores frutíferas. Estas condições também propiciam a proliferação e manutenção dos vetores no mesmo local. É sabido que *Lutzomyia longipalpis* está presente em toda a cidade (OLIVEIRA et al., 2003, OLIVEIRA, A.G. et al., 2006) e que este inseto se alimenta com êxito em *D. albiventris* (SHERLOCK et al., 1984).

Sherlock et al. (1988), em estudo realizado em Jacobina na Bahia, relataram o encontro de 2,3% de *D. albiventris* infectados naturalmente por *Leishmania donovani*. Este mamífero foi também encontrado naturalmente infectado por outras espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis* (1,1%), *L. braziliensis* (1,1%) e pelo *Trypanosoma cruzi* (3,5%) levando à hipótese de que esse marsupial é um dos elos das cadeias de transmissão doméstica e silvestre.

Na Zona da Mata, em Pernambuco, Brandão-Filho et al. (2003) capturaram *D. albiventris* em vários ecótopos e relataram a presença de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 13,5% dos animais pesquisados. Os demais trabalhos descritos na literatura referem-se ao *Didelphis marsupialis* infectado com *L. (L.) chagasi* (CABRERA et al., 2003; CARREIRA et al., 2009; CORREDOR et al., 1989; SHERLOCK et al., 1984).

Dentre os didelfídeos, também foi detectado *Leishmania* sp. em uma cuíca da cauda grossa (*L. crassicaudata*) e não há relatos científicos relacionando este

animal às leishmanioses. Somente há um estudo de Barreto e Siqueira (1962), em Ribeirão Preto, SP, descrevendo o encontro de um exemplar naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*. Estes animais apresentam comportamentos semelhantes aos dos gambás, necessitando de mais pesquisas para a elucidação de seu papel na cadeia epidemiológica das leishmanioses.

Com relação aos roedores, detectou-se o parasita através de PCR em uma cutia (*D. azarae*) procedente do Parque Estadual do Prosa, na zona urbana de Campo Grande, MS. Não há trabalhos recentes discorrendo sobre a presença de *Leishmania* sp. nesta espécie; há somente relatos sobre o encontro de formas semelhantes a tripanossomos e leishmanias, por Soto-Urribarri, De Soto e Barretto (1966) e Sherlock et al. (1988), respectivamente.

Na literatura científica, os relatos de *Leishmania* em outros roedores estão mais relacionados à LT em ambientes silvestres, porém, diversas espécies estão sendo incriminadas como reservatórios de várias espécies de *Leishmania* em áreas endêmicas (CANTO-LARA et al., 1999; CARDOSO; CABRAL, 1998; DE LIMA et al., 2002; MELLO; TEIXEIRA, 1984; OLIVEIRA et al., 2005; TRAVI et al., 2002; WYNSBERGHE et al., 2000).

Com relação à infecção por *Leishmania chagasi*, Ashford (2000) e Oliveira et al. (2005) acreditam que os mesmos podem estar envolvidos na manutenção do ciclo zoonótico. No entanto, um trabalho sobre o hábito alimentar de flebotomíneos, realizado no município de Campo Grande, MS, não identificou a preferência dos vetores por roedores domésticos (OLIVEIRA et al., 2008b).

O encontro de animais silvestres assintomáticos infectados por *Leishmania* sp. no presente estudo, e a relevância da LV e LT na saúde pública, sugerem que a realização de exames parasitológicos em animais a serem transportados para regiões distintas de sua origem, seja necessária como prática de manejo. A importância deste trabalho converge para maior atenção e cautela quando há troca ou permuta de espécies entre os zoológicos e criadouros no Brasil e entre países; esta problemática já havia sido apontada por Figueiredo et al. (2008a). É pertinente e necessária a reflexão quanto à prática usual de soltura indiscriminada de animais realizada por centros de triagem de animais silvestres, tendo em vista que pode colaborar com a disseminação de doenças.

É importante ressaltar que as leishmanioses são doenças que têm como origem um ciclo enzoótico silvestre, porém, com o aumento de paisagens

humanizadas que levaram à modificação da epidemiologia destas morbidades, houve uma alteração no comportamento de animais silvestres, resultando na aproximação dos mesmos a áreas antropizadas e com isso um aumento no número de animais apreendidos ou recepcionados pelos centros de reabilitação, triagem e zoológicos.

Atualmente, a obtenção de licença do IBAMA para o transporte destes animais, via aérea ou rodoviária, exige o atestado de sanidade e a guia de transporte animal (BRASIL, 2006). Estes procedimentos não incluem a comprovação da realização de exames para zoonoses ou doenças infecto-parasitárias, facilitando assim, a possibilidade de introdução de parasitoses em ambientes onde não circulam os respectivos agentes.

Em contrapartida, já está em vigor a Instrução Normativa 179/2008 que regulamenta o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias em animais silvestres que serão soltos ou destinados a outras instituições. Estudos concernentes ao tema são relevantes para reforçar a necessidade de cumprimento da legislação vigente, com o intuito de fornecer subsídios para o controle e prevenção das leishmanioses em saúde pública.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no estudo “*Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre” pode-se concluir que:

- foi observada a presença de *Leishmania* sp. em canídeos (*Cerdocyon thous*, *Pseudalopex vetulus* e *Chrysocyon brachyurus*), procionídeos (*Procyon cancrivorus* e *Nasua nasua*), felídeos (*Puma concolor*), marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Lutreolina crassicaudata*) e roedor (*Dasyprocta azarae*), representando 47,52% dos animais examinados;

- houve positividade tanto em animais de vida livre (46,57%) procedentes da zona urbana, quanto em animais mantidos em cativeiro (53,57%), independentemente de sexo e idade;

- a ocorrência de *Leishmania* em 40,74% na espécie *Didelphis albiventris* suscita maiores investigações para esclarecer o seu papel na cadeia epidemiológica das leishmanioses no município de Campo Grande, MS;

- o encontro de *Leishmania* sp. em procionídeo, mão pelada (*P. cancrivorus*) aponta a necessidade de mais estudos nesta espécie;

- este é o primeiro relato da presença de *Leishmania* sp. em quatis (*N. nasua*);

- este é o primeiro registro de *Leishmania* sp. em felídeos da espécie *Puma concolor*.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Faz-se necessária a padronização de técnicas sorológicas para o diagnóstico das leishmanioses em animais silvestres, uma vez que as técnicas existentes não foram desenvolvidas para este grupo de animais.

Em Centros de triagem e reabilitação, bem como em zoológicos, é muito importante a utilização de *microchips* para identificação e monitoramento dos animais, principalmente considerando-se que animais podem ser mantidos em cativeiro ou devolvidos à natureza. É necessário que os animais, recepcionados nestes locais, sejam investigados quanto à presença de doenças infecto-parasitárias devido às solturas, permutas e translocações, evitando assim a possibilidade de introdução de agentes em áreas não endêmicas. Torna-se relevante a adequação dos serviços que trabalham com a recepção e manutenção de animais silvestres, aos protocolos de avaliação sanitária de rotina, conforme estabelecido em lei.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; GRIMALDI-FILHO, G.; MOMEM, H. Alta frequência de leishmaniose tegumentar canina em um foco endêmico do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, supl.1, p. 56, 1987.
- ALEXANDER, B.; LOZANO, C.; BARKER, D. C.; McCANN, S. H. E.; ADLER, G. H. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Tropica**, v. 69, p. 41-50, 1998.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 156-159, mar./abr. 2009.
- ALVES, W. A.; BEVILÁCQUA, 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. **Cadernos 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.
- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA with in naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **American Society for Microbiology**, v. 66, n. 5, p.1933-1938, May 2000.
- ARRUDA, W.; COSTA, F. C.; NAHAS, S.; ROSENFELD, G. Leishmaniose visceral americana: Constatação de dois casos. **Brasil Médico**, v. 8/9, n.63, p. 64-65, 1949.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 14, p. 523-532, 1996.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 269-1281, 2000.
- ASHFORD, R. W.; BETTINI, S. Ecology and epidemiology in old world. In: W. PETERS R. KILLICK-KENDRICK (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**, London: London Academic Press, 1987. v. 1, p. 365-424.
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G., BARRAL, A. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003-1011, Dec.1986.

BARRAL, A.; SAMPAIO, D. P.; GRIMALDI-Jr. G.; MOMEM, H.; PRATEE, D. M. M.; JESUS, A. R. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical diseases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-546, May 1991.

BARRETO, M. P.; SIQUEIRA, A. S. Infecção natural da *Luttreolina crassicaudata* pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 4, n. 6, p. 358-365, nov./dez. 1962.

BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVORADO, J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Baruisimeto, Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 53, 1991.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E.; CARVALHO, F. G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J. J. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, May/June 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Superintendência de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmanioses no Brasil: período de 1985 a 2005**. Brasília, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de leishmaniose tegumentar americana**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa nº 18 de julho de 2006. **Ministério da Agricultura e Defesa Sanitária**. Disponível em: <<http://www.extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 06 maio 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº 179 de 25 de junho de 2008. **Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 20 junho 2009.

CABRERA, M. A. A.; DE PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOLLI, C. A.; AGUIAR, G. M.; XAVIER, S. C. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 79-83, Mar./Apr. 2003.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Tamanho corporal em populações naturais de *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, n. 59, n. 3, p. 461-469, 1999.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. (Org). **Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução**. 2 ed. Campo Grande: Ed. UFMS, 2006.

CAMPO GRANDE.(Município). Prefeitura Municipal. Secretaria de Saúde de Campo Grande. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de Leishmaniose Visceral**. Campo Grande, 2006.

CAMPO GRANDE.(Município). Instituto Municipal de Planejamento Urbano - PLANURB. **Mapa das regiões de Campo Grande**. ago., 2008.

CANTO-LARA, S. B.; WYNSBERGHE, N. R. V.; VARGAS-GONZÁLEZ, A.; OJEDA-FARF, N. F. F.; ANDRADE-NARVEZ, F. J. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* spp. isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 3, p. 305-309, May/June 1999.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* e leishmaniose canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 93, n. 527, p. 121-141, 1998.

CARREIRA, J. C. S. A.; DA SILVA, A. V. M.; PEREIRA, D. D. P.; BRAZIL, R. P. Tissular parasitism of *Didelphis marsupialis* naturally infected with *Leishmania infantum chagasi* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2009. No prelo.

CARVALHO, J. K. M. R; **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e de diagnóstico**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, março, 2009.

CORREDOR, A.; GALLEGU, J. F.; TESH, R. B.; PELÁEZ, D.; DIAS, A.; MONTILLA, M.; PALAU, M.T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, n. 2, p. 195, 1989.

CORTADA, V. M.; DORVAL, M. E.; SOUZA LIMA, M. A.; OSHIRO, E. T.; MENESES, C. R.; ABREU-SILVA A. L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C. S.; CARDOSO F. O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Resumé Communications**, v. 28, n. 5, p. 365-374, 2004.

COURTENAY, O.; SANTANA E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A. B.; VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 5, p. 498-502, 1996.

COURTENAY, O.; QUINELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, O. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, n. 5, p. 407-414, 2002.

COSTA, J. M. L.; VALE, K. C.; CECILIO, I. N.; OSAKI, N. K.; NETTO, E. M.; TADA, M. S; FRANÇA, F; BARRETO, M. C.; MARSDEN, P. D. Aspectos psicossociais e estigmatizantes da leishmaniose cutâneo-mucosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 20, n. 2, p. 77-81, abr./jun. 1987.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A.; Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 101, n. 1, p. 99–101, Feb. 2006.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar nos arredores de Sobral, Ceará. **O Hospital**, n. 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará, **O Hospital**, n. 48, p. 61-67, 1955.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará., Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, v. 162, 1956.

DEANE, L. M.; GRIMALDI, Jr., G. Leishmaniasis in Brazil. In: CHANG, K. P; BRAY, R. S. (Org.) **Leishmaniasis**. Amsterdam: Elsevier, 1985, cap. 14, p. 247-281.

DE LIMA, H.; DE GUGLIELMO, Z; RODRÍGUEZ, A.; CONVIT, J.; RODRIGUEZ, N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 169-174, Mar. 2002.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae) **Cadernos Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, set./out. 2003.

DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLILLO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 43-46, jan./fev. 2006.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, L. M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214, set./dez. 2007.

FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; GRIMALDI, Jr., G.; SESSA, P. A.; CARIAS, V. R. D. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 155-63, abr./jun. 1986.

FERREIRA, G. M. O. G.; MOURA, N. F. O.; ELKHOURI, A. N. M.; ALVES, W. A.; SOUZA, M.; COSTA, W. A.; BOMFIN, R.; SILVA, J. A. M. Aspectos sobre o diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral a partir do banco do SINAN- Brasil,

2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, supl. I, p. 417, 2006.

FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; FEDULO, L. P. ; MENEZES, R. C.; BALTHAZAR, D. A.; SCHUBACH, T. M. P.; MADEIRA, M. F. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 2, p. 200-201, 2008a.

FIGUEIREDO, F. B.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; NASCIMENTO, L. D.; MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, T. M. P. Leishmaniose tegumentar americana em felino doméstico no município do Rio de Janeiro, Brasil:-relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano XIII, n. 74, p. 58-60, maio/jun. 2008b.

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

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

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L.; REGO, JR, F. A.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudo de flebotômíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p. 378-90, ago. 1997.

GARDNER, I. A.; HIETALA, S; BOYCE, W. M. Validity of using serological tests for diagnosis of diseases in wild animals. **Revue Scientifique et Technique**, v. 15, n. 1, p. 323-35, 1996.

GOMES, A. C. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 2, p. 55-60, mar./abr. 1992.

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

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; YASSUMA, M. K.; BRYCESSON, A. P. M. Visceral leishmaniasis:

current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n.8, p. 494-501, Aug. 2002.

GUIMARÃES, K. S.; BATISTA, Z. S.; DIAS, E. L.; GUERRA, R. M. N. C.; COSTA, A. D. C. C.; OLIVEIRA, A. S.; CALABRESE, K. S.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C. S. F.; ZAVERUCHA DO VALE, T.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.; ABREU-SILVA, A.L. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 3/4, p. 305-309, Aug. 2005.

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

HERTIG, M.; FAIRCHILD, G. B.; JOHNSON, C. M. Leishmaniasis transmission-reservoir project. **Annual Report of Gorgas Memorial Laboratories**, p. 9-11, 1957.

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

HOOGSTRAAL, H.; DIETLEIN, D. R. Leishmaniasis in the Sudan Republic: recent results. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, p. 137-143, 1964.

JORGE, R. S. P. **Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN Sesc Pantanal e de animais domésticos da região**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

KERR, S. F.; MCHUGH, C. P.; MERKELZ, R. Short report: a focus of *Leishmania mexicana* near Tucson, Arizona. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 378-379, Sept. 1999.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A. M.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infectious. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2067-2072, Dec. 2004.

LAINSON, R. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O. SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis: - distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz, Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 135-137, Jan./Mar. 1990.

LAINSON, R.; KILLICK-KENDRICK, R.; FLISSER, A. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. v. 321, n. 1207, p. 389-404, Oct. 1988.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, Dec. 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LEIVA, M.; LLORET, A.; PEÑA, T.; ROURA, X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 1, p. 71-75, Jan./Feb. 2005.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 55, n. 1/2, p. 146-151, Aug. 2008.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília DF, MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008 (v.1).

MAIA, C.; CRISTOVÃO, J.M.; RAMADA, J. ROLÃO,N.; CAMPINO, L. Diagnóstico de leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada sangue periférico em papéis de filtro- resultados preliminares. **Veterinary Medicine**, v. 8, p. 29-33, 2006.

MAIA, C.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. **Vector-Borne and Zoonotic Disease**, Lisboa, v. 8, n. 4, p. 555-559, 2008.

MAIA-ELKOURI, A. N. S.; SALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, Dec. 2008.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia-Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, n. 2, p. 93-101, Apr./June 1994.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, nov./dez. 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, supl. 2, p. S359-S375, July 1994.

MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmaniose visceral - SINAN: leishmanioses**, Campo Grande, 2006.

MATO GROSSO DO SUL. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Serviço de Vigilância Epidemiológica. **Relatório de notificações de leishmaniose visceral - SINAN: leishmanioses**, Campo Grande, 2009.



MAUEL, J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 47, n. 2, p. 187-193, Feb. 1990.

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

MELLO, D. A.; REGO Jr.; F. A.; OSHIRO, E. T.; NUNES, V. L. B. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha; Chagas, 1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 259, abr./jun. 1988.

MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi* (Laison, 1982). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 337-341, ago. 1984.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, supl. 1, p. 41-45, 2004.

MIGONE, L. E. Un caso de kala-azar a Asuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 94/96, p. 1561-1577, Oct./Nov. 2005.

NOÉ, P. **Infecção por *Leishmania* sp. em gatos (*Felis domesticus*) na cidade de Campo Grande, MS, Brasil**. 2008, 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2008.

NUNES, V. L. B.; YAMAMOTO, Y. Y.; REGO JR., F. A.; DORVAL, M. E. C.; GALATI, E. A. B.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1/2, p. 17-21, 1988.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. B.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'ÁURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 3, p.301-302, maio/jun. 2001.

OLIVEIRA, A. G.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 3 p. 654-655, 2000.

OLIVEIRA, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.; SILVA, A. P. C.; REIS, L.F.; BARBOSA, D. S.; GUERRA, R. M. S. N. C. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no bairro Jardim São Raimundo em São Luís, MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, supl. 1, p. 140-143, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE FILHO, J. D.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Estudo de flebotômíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5/4, p. 933-944, jul./ago. 2003.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A.; DE OLIVEIRA, O.; DE OLIVEIRA, G. R.; ESPINDOLA, C. E.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; MASSARÁ, A. M.; CONSALEZ, C. A.; DORVAL, M. E. C.; FERNADES, C. E.; DE OLIVEIRA, G. R.; BRAZIL, R. P.; GALATI, E. A. Observations on the feedings habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz; Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 238-241, 2008.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 5, p. 446-450, set./out. 2006.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3/4, p. 219-227, May 2005.

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

PENNA, G. **Doenças negligenciadas**, 2008. Disponível em <[http://www.senado.gov.br/web/comissoes/cas/ap/AP\\_20080604\\_Doencasnegligenciadas.pdf](http://www.senado.gov.br/web/comissoes/cas/ap/AP_20080604_Doencasnegligenciadas.pdf)>. Acesso em: 21 maio 2009.

PEREIRA, A. P. C.; COUTINHO, S. D. A. Criptococose em cães e gatos: – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, ano VIII, n. 45, p. 24-32, jul., 2003.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. **Leishmaniose tegumentar americana**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1948.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S. G.; MARZOCHI, M. C. A.; NUNES, M. P.; GRIMALDI Jr., G. Canine american cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 1, p. 52-58, Jan. 1988.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; RODOLFO, C.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, O. G. R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 68-75, 2006.

SANTOS, C. M.; PIZZUTTO, C. S.; JANNINI, A. E. ; SANTOS, S. M.; CARVALHO, F. C. Resposta comportamental do gaxinim (*Procyon cancrivorus*) às técnicas de enriquecimento ambiental no zoológico de Uberaba. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007. **Anais...** Caxambu, 2007.

SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I. P. (Coord). **Leishmaniose canina** 1 ed. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; ALVES DE FREITAS, R.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, Ago. 1998.

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 City, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229-233, Mar. 2004.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. W. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: London Academic Press, 1987.

SHAW, J. J. New world leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: FARREL, J. (Ed.). **World Class Parasites: Leishmania**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002. v. 4, p. 11-31.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKI, M.; GRIMALDI, Jr., G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 511, Oct./Dec. 1984.

SHERLOCK, A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKI, M.; GRIMALDI, Jr., G. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia: IV- Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 21, n. 1, p. 23-27, 1988.

SILVA, E. S.; CARVALHO, F. G.; SILVA, E. A.; F, RIOZI, E.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do

município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, outubro, 2000, São Luís. **Anais...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical p. 3-8. Rio de Janeiro, 2000.

SILVA, A. V. M.; CÂNDIDO, C. D. S; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 92-94, Jan. 2008.

SILVA-NUNES, MÔNICA; CAVASINI, C., E.; DA SILVA, N. S.; GALATI, E. A. B. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 2, São Paulo, June, 2008.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A.; De SOUZA, A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43-50, Mar. 2002.

SOBRINO, R.; FERROGLIO, E.; OLEAGA, A.; ROMANO, A.; MILAN, J.; REVILLA, M.; ARNAL, M. C.; TRISCIUOGGIO, A.; GORTÁZAR, C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 3/4, p. 198-203, Aug. 2008.

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.

SOTO-URRIBARRI, R.; DE SOTO, S. T.; BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XV: Infecção natural da cutia, *Dasyprocta azarae azarae*, 1823 por trypanosomo semelhante ao *T. cruzi*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 26, n. 2, p. 133-144, 1966.

SOUZA, A. I.; BARROS, E. M. S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M. N.; MARIN, G.R.B.; NUNES, V. L. B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1/2, p. 41-45, 2005.

TELLERIA, J.; BOSSENO, M. F.; TARIFA, T.; BUITRAGO, R.; MARTINEZ, E.; TORREZ, M.; LE PONT, F.; BRENIÈRE, S. F. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kdna polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 5-6, Jan./Feb. 1999.

TRAVI, B. L.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J.; SEGURA, I.; ZEA, A.; GONÇALVES, A.; VELEZ, I. D. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 557-565, 1994.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; GUARIN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 73-75, Jan. 1998a.

TRAVI, B. L.; OSORIO Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 275-278, 1998b.

TRAVI, B. L.; ARTEAGA, L. T.; LEÓN, A. P.; ADLER, G. H. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 887-892, Sept. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): **The world health report 2004**. Geneva: WHO, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): N/ **Leishmaniasis: the global trend**. Geneva, jan. 2009 Disponível em <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/integratedmedialeishmaniasis/en/index.html](http://www.who.int/neglected_diseases/integratedmedialeishmaniasis/en/index.html)> Acesso em: 20 maio 2009.

WYNSBERGHE, N. R. V.; CANTO-LARA, S. B.; DAMIAN-CENTENO, A. G.; ITZÁ-ORTIZ, M. F.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. I. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 5, p. 595-600, Sept./Oct. 2000.

YOSHIDA, E. L. A.; CORREA, F. M. A.; MARQUES, S. A.; STOLF, H. O.; DILLON, N. L.; MOMEN, H.; GRIMALDI Jr., G. Human canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis (L. braziliensis braziliensis)* in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 133-134, Jan./Mar. 1990.

**APÊNDICE A**

**FICHA DE COLETA**

“*Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e vida livre”

<u>Identificação do animal:</u>	Data de coleta: _____
Reservatório Silvestre, Nº: _____	
Registro Geral (CRAS), Nº: _____	
Nº Microchip: _____	
Nome popular: _____	
Nome científico: _____	
Sexo: Macho ( ) Fêmea ( )	
Idade: Jovem ( ) Adulto ( )	
Peso _____ (gramas)	
<u>Procedência:</u>	
Rua/ Av. _____ Nº _____	
Bairro _____	
Cidade - Estado _____	
<u>Exame Clínico:</u>	
Condições gerais: BOA ( ), REGULAR ( ), RUIM ( ) _____	
Presença de sinais de Leishmaniose: NÃO ( ) SIM ( ) QUAIS? _____	
<u>Anestésico:</u>	
Dose: _____ Via de administração: _____	
Observações: _____	
<u>Material coletado:</u>	
Sangue Periférico: SIM ( ) NÃO ( )	
Aspirado Medular: SIM ( ) NÃO ( )	
Soro: SIM ( ) NÃO ( )	
Outros: NÃO ( ) SIM ( ) QUAIS: _____	
<u>Procedimentos realizados:</u>	
Esfregaço Delgado: Sangue Periférico: SIM ( ) NÃO ( )	
Aspirado Medular: SIM ( ) NÃO ( )	
Cultivo em meio específico: SIM ( ) NÃO ( )	
Inoculação em animal sensível: SIM ( ) NÃO ( )	
Soro/sorologia (ELISA): _____	
PCR: _____	
Outros: _____ Quais: _____	
Observações: _____	

## ANEXO A

Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13838-1	Data da Emissão: 28/01/2008 12:23	Data de Validade: 27/01/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2256159	Nome: ROBERTA MARTINS PASSOS HUMBERG	CPF: 119.041.768-52
Título do Projeto: Investigação de Leishmania sp. em possíveis reservatórios silvestres recpinnados no CRAS . CAMPO GRANDE . MS EM 2008-2009		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL		CNPJ: 15.461.510/0001-33

## Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br/cities">www.ibama.gov.br/cities</a> . Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ELSON BORGES DOS SANTOS	APOIO TECNICO E TAXONOMIA DE ANIMAIS	541.798.821-91	3738751 SSP-MS	Brasileira
2	María Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval	Pesquisadora	181.652.271-20	10076504 SSP-MS	Brasileira
3	Roginaldo Peçanha Brazil	CONSULTOR	324.256.277-15	12148384 SSPMG-MG	Brasileira
4	Vinicius Andrade Lopes	APOIO TECNICO LOGISTICO, ANÁLISE DE DADOS E TAXONOMIA	034.615.346-84	M6957405 SSP-MG	Brasileira
5	Silvia Letúya Oshiro	PESQUISADORA	438.504.491-53	4019251 SSP-MS	Brasileira
6	Alessandra Gutierrez de Oliveira	COORDENADORA	637.473.831-49	4198251 MAER-RJ	Brasileira
7	María do Socorro Pires e Cruz	CONSULTORA TECNICA	429.223.213-04	10631466 SSP-PJ	Brasileira

## Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO GRANDE	MS	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	Fora de UC

## Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Canidae, Rodentia, Dasyppodidae, Didelphidae

## Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Fragmento de pele, Animal morto ou partes (carcaça/osso/pele, Sangue)
---	----------------------------------	---

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do [ibama/Sisbio](http://ibama/Sisbio) na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 51118968



Página 1/3

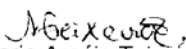
## ANEXO B



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 179/2008 da Pesquisadora Alessandra Gutierrez de Oliveira referente ao projeto de pesquisa **“Investigação sobre Leishmaniose sp em possíveis reservatórios silvestres recepcionados no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2008-2009”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 25 de março de 2008.

Campo Grande (MS), 25 de março de 2008.

  
Dr<sup>a</sup> Maria Araújo Teixeira  
Presidente da CEUA