



Universidade Federal da Bahia

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia

Programa de Pós Graduação em Ciência Animal nos Trópicos

**PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
(ELISA) UTILIZANDO ANTI-IGG DE CÃO OU
PROTEÍNA A CONJUGADOS À PEROXIDASE PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM
CANÍDEOS SILVESTRES**

Paulo Roberto Bahiano Ferreira

**Salvador-Bahia
2012**

PAULO ROBERTO BAHIANO FERREIRA

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) UTILIZANDO ANTI-IGG DE CÃO OU PROTEÍNA A CONJUGADOS À PEROXIDASE PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CANÍDEOS SILVESTRES

Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos, na área de Doenças Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Stella Maria Barrouin Melo.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias Portela.

**Salvador – Bahia
2012**

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) UTILIZANDO ANTI-IGG DE CÃO OU PROTEÍNA A CONJUGADOS À PEROXIDASE PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CANÍDEOS SILVESTRES

PAULO ROBERTO BAHIANO FERREIRA

Dissertação defendida e aprovada para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, 28 de fevereiro de 2012.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Stella Maria Barrouin Melo
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia Orientadora

Prof. Dr. Carlos Roberto Franke
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Márcia Cristina Aquino Teixeira
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia

Aprovado em: _____ / _____ / _____

**A minha mãe e meus familiares,
aqueles que não escolhemos, mas
tive a sorte de tê-los ao lado.**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Marinalva Bahiano, por incentivar incondicionalmente os estudos sempre me apoiando nos momentos mais difíceis da vida e fazendo crer que os sonhos podem se tornar realidade.

À minha família e todos meus amigos (as), os agentes etiológicos da minha existência e significativa parte da razão de minha felicidade.

À minha orientadora Stella Maria Barrouin Melo, pela confiança e por despertar o desejo pela ciência no momento em que me convidou para fazer parte do Grupo de Infectologia Veterinária do LIVE-UFBA ainda na graduação.

Ao meu co-orientador Ricardo Dias Portela, o qual contribuiu com o enriquecimento científico desse trabalho de forma significativa através das idéias, além da disponibilização da infraestrutura e da equipe técnica do Laboratório de Imunologia (LABIMUNO) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) – UFBA.

A equipe do Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE) da UFBA, especialmente Prof. Dr^a Daniela Larangeira, M.e Lídia Oliveira, Clauceane de Jesus, Rogério Cunha, Ianei Carneiro, Consuelo Barreto e Indira Trueb, os quais contribuíram significativamente com a evolução do trabalho.

A equipe técnica do LABIMUNO-ICS, especialmente ao Professor M.e Bruno Bastos, o qual sou muito grato pelas contribuições técnicas que foram primordiais para os resultados alcançados no presente trabalho.

Ao corpo técnico e administrativo da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (FZB - BH), do Parque Fioravanti Galvani (PFG) e do Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS) Chico Mendes, pela confiança com o nosso grupo, pela disponibilidade dos animais e pelo apoio prestado com a coleta e envio das amostras biológicas necessárias.

Ao Grupo de Pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Roberto Franke, um espaço de educação e discussão científica que possibilitou o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional ampliando minha visão de mundo.

A todos docentes e discentes da graduação e do Programa de Pós-Graduação da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, que, de uma certa forma, contribuíram com o meu desenvolvimento acadêmico e gentilmente compartilharam o conhecimento possibilitando novos aprendizados.

Aos profissionais e estudantes envolvidos com as Instituições Conservacionistas, Organizações não Governamentais (Ongs), Universidades, Grupos de Estudos, especialmente o BIOMAS, e todos aqueles profissionais autônomos que, de alguma forma, contribuem positivamente com a minimização dos impactos ambientais negativos gerados pelo desenvolvimento da sociedade humana nos moldes atuais.

Ao Prof. M.e Paulo César Costa Maia, por me receber de braços abertos no Ambulatório de Animais Silvestres e Exóticos (AASE), UFBA, me oportunizando a orientação de estagiários e o tirocínio docente na disciplina MEV A02 - Animais Silvestres e Exóticos.

Aos estagiários e profissionais envolvidos no AASE-UFBA, que hoje tenho como amigos e são parte de um ambiente acadêmico de ensino e aprendizado, me estimulando a estudar a clínica de animais silvestres e exóticos a cada novo desafio diário.

A FAPESB e CNPq pelo apoio financeiro ao LIVE-UFBA, conseqüentemente possibilitando a realização desta pesquisa.

“Um cérebro frágil transforma Filosofia em loucura, Ciência em superstição e Arte em pedantismo.”

(Trecho do filme Larry Crowne – O amor está de volta. Roteiro: Nia Varlados.)

ÍNDICE

	página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SILGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
<i>SUMMARY</i>	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais sobre a conservação de canídeos silvestres.....	3
2.2. Alguns elementos epidemiológicos sobre a leishmaniose visceral e o ambiente silvestre no Brasil.....	6
2.3. Canídeos silvestres como parte do ciclo da LV no Brasil.....	8
2.4. A fisiopatologia da infecção por <i>Leishmania</i> e a resposta imune em canídeos.....	11
2.5. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral em canídeos.....	14
2.6. O diagnóstico laboratorial da LV.....	16
2.6.1. <i>Técnicas sorológicas</i>	16
2.6.2. <i>Exame parasitológico</i>	19
2.6.3. <i>Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase</i>	22
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
5. PERSPECTIVA.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	página
FIGURA 1 - Exemplar de raposinha (<i>L. vetulus</i>) cativo.....	4
FIGURA 2 - Exemplar de cachorro-do-mato (<i>C. thous</i>) cativo.....	4
FIGURA 3 - Exemplar de lobo-guará (<i>C. brachyurus</i>) cativo.....	4
FIGURA 4 - Exemplar de cachorro-vinagre (<i>S. venaticus</i>) cativo.....	4
QUADRO 1 - Espécies de canídeos silvestres classificadas de acordo com as listas nacionais e internacionais de espécies ameaçadas de extinção.....	6
FIGURA 5 - Potencial ciclo de transmissão do parasito <i>Leishmania</i> sp. em humanos, animais silvestres e domésticos através da picada de flebótomos infectados.....	7
FIGURA 6 - Ilustração das interações complexas entre as saúdes humana, animal e do ecossistema gerando impactos negativos sobre a biodiversidade global.....	9
FIGURA 7 - Técnica de punção esplênica descrita para cão doméstico.....	20
FIGURA 8 - Técnica de punção esplênica extrapolada de cão doméstico para cachorro-do-mato (<i>C. thous</i>).....	20
FIGURA 9 - Amostra de aspirado esplênico obtida de um cachorro-do-mato (<i>C. thous</i>).....	21

ARTIGO 1

Páginas (p.)

GRÁFICO 1 - Distribuição dos resultados individuais dos soros de canídeos silvestres submetidos a ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, usando o conjugado anti-IgG de cão com peroxidase. Cada círculo representa o resultado de um animal testado, e as barras a média de cada grupo, positivo ou negativo. A linha tracejada indica o cut-off calculado, usando o método de Frey et al (1998)..... p.40

GRÁFICO 2. Distribuição dos resultados individuais dos soros de canídeos silvestres submetidos a ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, usando o conjugado Proteína A com peroxidase (1:16.000). Cada círculo representa o resultado de um animal testado, e as barras a média de cada grupo, positivo ou negativo. A linha tracejada indica o cut-off calculado, usando o método de Frey et al (1998).....p.41

GRÁFICO 3. Distribuição dos resultados individuais dos soros de canídeos silvestres submetidos a ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, usando o conjugado Proteína A com peroxidase (1:16.000). Cada círculo representa o resultado de um animal testado, e as barras a média de cada grupo, positivo ou negativo. A linha tracejada indica o cut-off calculado, usando o método de Frey et al (1998)..... p.41

FIGURA 1 - Revelação do WB realizado nas amostras de soros de 12 canídeos silvestres cativos..... p.44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 01 - Resultados da avaliação clínica e sorológica para o diagnóstico de LV em 12 canídeos silvestres cativos na FZB-BH ou PZGV-BA.....p.39

TABELA 02 - Coeficiente de correlação Ró de Spearman entre os ELISAs realizados com diferentes conjugados..... p.40

TABELA 3. Parâmetros de densidade optica encontrados nos diferentes ELISAs para deteccao de anticorpos especificos anti-Leishmania em canideos silvestres. Foram utilizados soros de animais previamente positivos no PCR e IFI para confecao de pool positivo, e soros de animais de regio nao endemica, e resultados sorologicos previos negativos, para confeccao de pool negativo.....p.42

TABELA 04 - Relação das bandas detectadas nos lobos-guará (*C. brachyurus*) positivos no WB.....p.43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.

UFBA – Universidade Federal da Bahia

LABIUMUNO – Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular

LIVE – Laboratório de Infectologia Veterinária

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

PZGV – Parque Zoobotânico Getúlio Vargas

BA – Bahia

MG – Minas Gerais

Ongs – Organizações não governamentais

AASE – Ambulatório de Animais Silvestres e Exóticos

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

OMS – Organização Mundial da Saúde

AIDS – Vírus da imunodeficiência humana

MA – Maranhão

PI – Piauí

CE – Ceará

RJ – Rio de Janeiro

RN – Rio Grande do Norte

MS – Mato Grosso do Sul

RS – Rio Grande do Sul

IFI – Imunoflorescência indireta

ELISA - Ezyme-linked immunosorbent assay ou teste imunoenzimático

PCR - Reação em cadeia da polimerase

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza

CITTES - Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora

FZB-BH – Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte

CETAS - Centros de Triagem de Animais Silvestres

IV – Intravenosa

RFLP - Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição

SC – Subcutâneo

ID – Intradermal

IFN- γ – Interferon-gama

TNF – Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

Nk – Natural killer

TGF- β – Fator de crescimento transformador

Ig – Imunoglobulina

TWB – Técnica de Western Blot

FERREIRA, PRB. Padronização do Ensaio Imunoenzimático (Elisa) utilizando anti-igg de cão ou proteína a conjugados à peroxidase para o diagnóstico da leishmaniose visceral em canídeos silvestres. Salvador, Bahia, 2012. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2012.

RESUMO

No presente estudo, é descrita a padronização da técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA) para o sorodiagnóstico da infecção causada por *Leishmania* em canídeos silvestres brasileiros. Na América do Sul, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *L. chagasi*, sendo alguns canídeos considerados reservatórios naturais do parasito. A resposta imunológica à *Leishmania* é pouco estudada nos canídeos silvestres, que parecem apresentar resistência natural ao parasito. Foram estudadas amostras de soro/plasma obtidas de 12 canídeos cativos: sete lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), três raposinhas (*Lycalopex vetulus*) e dois cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*). Dentre os canídeos estudados, um *C. brachyurus* e uma *L. vetulus* cativos em área endêmica para a LV, apresentavam em seu histórico clínico positividade na IFI e na técnica de PCR em aspirados de medula óssea para *Leishmania* sp. Foram então realizados diferentes ensaios imunoenzimáticos com o conjugado anti-IgG de cão e proteína A, que detectaram quatro (04/12) e três (03/12) *C. brachyurus* soropositivos para *Leishmania* sp. no ELISA com os respectivos conjugados. Os testes foram capazes de distinguir claramente as amostras positivas das negativas, uma vez que a média das densidades ópticas (DOs) das amostras negativas foram 4,8 vezes mais baixa do que a média das DOs dos positivos no ensaio com o conjugado anti-IgG de cão e 15,5 vezes nos testes com a proteína A. No Western Blot foi detectado um total de 22 bandas, com destaque para as de peso molecular 19, 22, 24, 45 e 66 kDa, presentes nas amostras de três *C. brachyurus* com soropositividade no ELISA indireto. Entretanto, as bandas 212, 32 e 23 kDa foram constatadas somente nos dois *C. brachyurus* com maiores valores de DOs. Os testes ELISA com a proteína A e o conjugado anti-IgG de cão apresentaram uma concordância excelente ($Kappa = 1$ p. 0,001) e moderada com o Western Blot respectivamente. O ensaio com a proteína A mostrou ser adequado a testes sorológicos de triagem, mas o ideal ainda seria o desenvolvimento de conjugados com anticorpos espécie-específico para padronização de ELISA indireto para as diferentes espécies silvestres.

Palavras-chave: Canídeos silvestres; Leishmaniose visceral, Proteína A, Sorologia; Diagnóstico; *Leishmania* sp

FERREIRA, PRB. **Standardization of Immunoassay (Elisa) using anti-dog IgG or protein A peroxidase-conjugated for the diagnosis of visceral leishmaniasis in wild canids.** Salvador, Bahia, 2012. 63p. Dissertation (Master of Science in Animal Science in the Tropics) - School of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University of Bahia, 2003.

SUMMARY

In the present study, the standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of infection by *Leishmania* in brazilian species of wild canids is described. In South America, visceral leishmaniasis (VL) is caused by *L. chagasi*, being some wild canids considered natural reservoirs of the parasite. The immunological response to *Leishmania* is not studied enough in the wild canids, which seem to show natural resistance to the parasite. Samples of serum/plasma from 12 captive wild canids were studied: seven maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*), three hoary foxes (*Lycalopex vetulus*) and two crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). Among the canines studied, a *C. brachyurus* and *L. vetulus* captives in an area endemic for VL, presented in their clinical history a positivity in Indirect Immunofluorescence Reaction, RIFI, and Polymerase Chain Reaction, PCR, in bone marrow aspirates for *Leishmania* sp. Were then performed with different immunoassays conjugated anti-dog IgG and protein A, which detected four (04/12) and three (03/12) *C. brachyurus* seropositive for *Leishmania* sp. by ELISA with their conjugates respectively. The tests were able to clearly distinguish the negative and positive samples, as the mean optical density (OD) of the negative samples was 4.8 times lower than those of the average of the positive in test with anti-IgG conjugate dogs and 15.5 times in the tests with protein A. Western blot was detected in a total of 22 bands, especially those of molecular weight 19, 22, 24, 45 and 66 kDa present in the samples of three *C. brachyurus* with seropositivity in ELISA. However, bands 212, 32 and 23 kDa were observed in only two *C. brachyurus* with higher values of OD.. The ELISA with protein A and conjugated anti-dog IgG showed excellent agreement (Kappa = 1 p. 0.001) and moderate (Kappa = 0,8 p. 0,0015) with the Western Blot respectively.. Even though the test with protein A has shown adequate to screening tests, the ideal would be the development of conjugates with species-specific antibodies for the standardization of indirect ELISA for different wild species.

Keywords: Wild canids; Visceral leishmaniasis; Serology; Diagnosis; *Leishmania* sp.; Protein A.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma metazoose que acomete principalmente os humanos e os canídeos, causada por um protozoário, *Leishmania infantum chagasi* (Alonso et al., 2010), transmitido para o hospedeiro ou reservatórios através da picada de flebotomíneos infectados. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima uma prevalência global de leishmanioses (cutânea e visceral) em torno de 12 milhões de casos distribuídos em 88 países, sendo registrados 500 mil casos novos anuais de LV humana no mundo (OMS, 2002). A leishmaniose cutânea humana tem uma taxa de incidência de aproximadamente 1,5 milhões de casos por ano (OMS, 2002; Alvar, 2006). Contudo, esses dados podem estar subestimados, já que apenas 32 países, dentre os 88 com ocorrência da doença, possuem um sistema de notificação compulsória (OMS, 2012).

O cão (*Canis lupus familiaris*) é considerado um importante reservatório no ambiente doméstico, sendo apontado como o principal responsável pelo caráter endêmico-epidêmico da doença por alguns autores (Marzochi et al., 1985; Silva et al., 2001; Courtenay et al., 2002b; Brasil, 2005).

No ambiente silvestre, o marsupial sariguê, *Didelphis albiventris* (Lund, 1840) (Brasil, 2005) e o cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1806) (Courtenay et al., 1996) são considerados reservatórios silvestres capazes de contribuir com a transmissão da enfermidade para os humanos e cães domésticos. Outros canídeos silvestres (Curi, Miranda e Talamoni, 2006; Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011), primatas (Malta et al., 2010), morcegos (Savani et al., 2010) e felídeos silvestres (Dahroug et al., 2010) são também indicados como potenciais reservatórios.

A emergência e reemergência de doenças, notadamente as zoonoses, têm amplo impacto sobre o ambiente silvestre, causando principalmente a perda da biodiversidade (Patz et al., 2000; Rotureau, 2006).

Atualmente, a divisão entre os ciclos silvático e urbano da LV está cada vez menos perceptível, havendo relatos de canídeos silvestres infectados naturalmente pela *Leishmania* sp. em zoológicos abertos à visitação pública em grandes centros urbanos (Luppi et al., 2008; Lima et al., 2009). Ainda nesse cenário, têm ocorrido cada vez com mais frequência situações de maior proximidade de habitações humanas com espécies silvestres e os vetores da doença em ambientes silvestres recém-urbanizados (OMS, 2002; Cabrera et al., 2003; Aguirre, 2009). O achado de canídeos de vida livre infectados pela *Leishmania* sp. na região do Litoral Norte da Bahia (Gomes et al., 2007), área de intensa exploração comercial imobiliária (Limonad,

2007), atesta tal situação. A ocupação de áreas verdes pelos humanos e a consequente urbanização em rápida escala dessas áreas são estimuladas através de ofertas crescentes pelo mercado imobiliário à população de maior poder aquisitivo. Curiosamente, a propaganda comercial das empreiteiras relaciona a qualidade de vida residencial humana a uma visão ecológica equivocada, devidamente ilustrada pelos impactos ambientais negativos resultantes (Limonad, 2007). As consequências dessa realidade tornam imprescindíveis os estudos epidemiológicos de infecções em animais silvestres, principalmente pela presença do humano como hospedeiro suscetível no ambiente modificado e desequilibrado.

Polêmica em cães domésticos, a imunoprofilaxia por meio de vacinas comerciais – assim como o tratamento da leishmaniose – não é cogitada na rotina de manutenção de canídeos silvestres. Dessa forma, é importante a produção de dados científicos que possibilitem avanços no conhecimento do perfil clínico, imunológico e patológico natural das espécies silvestres, bem como nas estratégias de controle da doença nesses animais. Entretanto, na literatura especializada, essas informações são extremamente limitadas (Pinto et al., 2008). Assim, a padronização de testes diagnósticos aplicados às espécies silvestres é uma necessidade crucial para que outros campos, como da Epidemiologia, Imunologia, Patologia e da Preventiva sejam explorados.

Os testes sorológicos (ELISA e IFI), moleculares (PCR) e parasitológicos (cultura *in vitro* ou *in vivo* e citologia), indicados para o diagnóstico laboratorial da LV em cães domésticos (Brasil, 2005), têm sido aplicados a estudos em canídeos silvestres (Deane & Deane, 1954; Courtenay et al., 2002a; Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008). Entretanto, os resultados são interpretados de forma empírica e comparativa, devido à ausência de conjugados específicos para os canídeos silvestres e de validação dos testes para esses animais (Ferreira et al., 2009). Neste cenário, torna-se evidente a importância do estudo da LV nas espécies de canídeos silvestres tanto de vida livre (*in situ*) como em cativeiro (*ex situ*), já que as informações obtidas podem ser complementares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais sobre a conservação de canídeos silvestres

No mundo, são descritos 13 gêneros, 35 espécies e uma subespécie de canídeos selvagens pertencentes à Família *Canidae*, conforme aceito pela maioria dos taxonomistas (Xiaoming, Tedford & Van Valkenburgh, 2004; Gomes, 2006). Estes animais apresentam a maior distribuição entre as famílias da ordem Carnivora, sendo registradas espécies em todo o globo, com exceção das seguintes regiões: ilhas oceânicas, Madagascar, Tailândia, Filipinas, Bornéu, Nova Zelândia, Antártida, Nova Guiné e Austrália (Xiaoming, Tedford & Van Valkenburgh, 2004).

Na América do Sul, são relatadas nove espécies, das quais seis são encontradas em conservação *in situ* no território brasileiro, ou seja, em seu ambiente natural, são elas: o cachorro-do-mato de orelhas curtas – *Atelocynus microtis* (Sclater, 1882), o lobo-guará – *Chrysocyon brachyurus*, o cachorro-vinagre – *Speothos venaticus* (Lund, 1842), a raposa-do-campo – *Lycalopex vetulus*, o cachorro-do-mato – *Cerdocyon Thous* e o graxaim-do-campo – *Pseudalopex gymnocercus* (G. Fischer, 1814). Já no ambiente em conservação *ex situ*, fora do ambiente natural – zoológicos, criatórios e Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-IBAMA) – são encontrados com maior frequência a raposa-do-campo (*L. vetulus*) (Figura 01), o cachorro-do-mato (*C. thous*) (Figura 2), o lobo-guará (*C. Brachyurus*) (Figura 03) e o cachorro-vinagre (*S. venaticus*) (Figura 04). Esses canídeos são parte da fauna silvestre brasileira, cuja denominação “canídeo silvestre” é utilizada devida aos seus ciclos biológicos, que ocorrem dentro dos limites do território nacional (Brasil, 1997).

A dieta pode variar conforme a espécie, abrangendo desde a onivoridade até a carnivoridade estrita. Dentre os onívoros encontram-se as espécies *C. brachyurus* (Dietz, 1984; Bueno, Belentani e Mota Junior, 2002), *C. thous* (Rocha, Reis & Sekiyama, 2004) e *L. vetulus* (Dalponte & Lima, 1999), com diversos estudos que reforçam a importância de sua conservação e potencial contribuição ecológica na dispersão de sementes de um número variável de espécies de plantas. O cachorro-vinagre (*S. venaticus*) é o único canídeo brasileiro estritamente carnívoro, com atividade predominantemente diurna, podendo caçar cooperativamente grandes roedores (capivaras, pacas, cutias), tatus, pequenos veados e emas (Deutsch, 1983; Peres et al., 1991; Wallace, Painter & Saldania, 2002; Chieda et al., 2006; de Oliveira et al., 2009; Lima, Jorge & Dalponte, 2009).



Fig. 1: Exemplo de raposinha (*L. vetulus*) cativo.
Foto: Arquivo pessoal.



Fig. 2: Exemplo de cachorro-do-mato (*C. thous*) cativo.
Foto: Arquivo pessoal.



Fig. 3: Exemplo de lobo-guará (*C. brachyurus*) cativo.
Foto: Arquivo pessoal.



Fig. 4: Exemplos de cachorro-vinagre (*S. venaticus*) cativo.
Foto: Marcelo Malta.

No Brasil, o cachorro-do-mato (*C. thous*), a raposa-do-campo (*L. vetulus*) e o lobo-guará (*C. brachyurus*) ocorrem muitas vezes em simpatria, habitando as mesmas regiões geográficas e se adaptando às bordas de matas e áreas alteradas e invadidas pelo homem (Juarez & Marinho Filho, 2002; McDonalds & Sillero-Zubiri, 2004). Essas espécies são encontradas nos biomas do Cerrado, Caatinga e Pantanal (Ramos Junior, Pessuti e Chieregatto, 2003; Cheida et al, 2006). No entanto, o lobo-guará e o cachorro-do-mato também são encontrados nos Campos sulinos e Mata Atlântica (Cheida et al, 2006). Já o cachorro-vinagre está presente nos biomas Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia e Pantanal

(Cheida et al., 2006). Os animais com ocorrência no Cerrado e Mata Atlântica encontra-se numa situação bastante crítica quanto ao status populacional, sendo estes biomas considerados internacionalmente como “*Hotspots*” ou “áreas quentes”, definidas como regiões com alto grau de endemismo, com pelo menos 1500 espécies de plantas ocorrendo apenas naquela área, com destruição de pelo menos 75% de sua vegetação nativa (Myers et al., 2000).

Atualmente, diversos canídeos silvestres são listados como espécies ameaçadas de extinção no IBAMA (BRASIL, 2003), que também podem estar classificados em diferentes graus na lista vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), ainda existindo um acordo internacional, Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora (CITES), que regulamenta o trânsito dos diversos espécimes com o objetivo de garantir a sobrevivência destes (Quadro 1). No geral, espécies classificadas como Apêndice I têm maiores exigências burocráticas para a permissão de seu trânsito quando comparadas às espécies listadas como Apêndices II e III, respectivamente (CITES, 2012). As ações antropogênicas negativas, como a fragmentação do habitat natural e a caça predatória dos canídeos silvestres, são as principais ameaças à sobrevivência desses animais (Andriolo, 2006; Queirogas, 2007). Contudo, atualmente existe a preocupação da comunidade científica quanto ao conhecimento do impacto gerado pelas doenças emergentes e re-emergentes sobre a fauna silvestre e a sua relação com os animais domésticos e a saúde humana (Mangini & Silva, 2006; Curi, Miranda e Talamoni, 2006; Aguirre, 2009), um exemplo disso seria o caso da leishmaniose visceral canina – LVC.

Nome Científico	Nome comum	Lista Vermelha da IUCN-2012	Lista de Espécies ameaçadas - IBAMA - 2003	CITES-2012
<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Illiger, 1815)	Lobo-guará	Quase ameaçada de extinção (NT)	Vulnerável	Apêndice II
<i>Cerdocyon thous</i> (Smith, 1839)	Cachorro-do-mato	Mínima preocupação de extinção (LC)	-----	Apêndice II
<i>Pseudalopex Gymnocercus</i> (G. Fisher, 1814)	Graxaim-do-campo	Mínima preocupação de extinção (LC)	-----	Apêndice II
<i>Lycalopex vetulus</i> (Lund, 1842)	Raposinha	Mínima preocupação de extinção (LC)	-----	-----
<i>Speothos Venaticus</i> (Lund, 1842)	Cachorro-do-mato vinagre	Quase ameaçada de extinção (NT)	Vulnerável	Apêndice I
<i>Atelocynus microtis</i> (Sclater, 1882)	Cachorro-do-mato de orelha curta	Quase ameaçada de extinção (NT)	-----	-----

Quadro 01. Espécies de canídeos silvestres classificadas de acordo com as listas nacionais e internacionais de espécies ameaçadas de extinção.

2.2. Alguns elementos epidemiológicos sobre a leishmaniose visceral e o ambiente silvestre no Brasil

O ciclo de vida e manutenção de *Leishmania* sp. nos ambientes silvestres brasileiros são caracterizados principalmente pela infecção ou soropositividade de canídeos silvestres (Couternay et al., 2002b; Brasil, 2005), marsupiais (Sherlock, 1996; Brasil, 2005; Gomes Neto, 2007; Schallig et al., 2007) e morcegos (Savani et al., 2010), animais que são observados com frequência no ambiente peridoméstico de residências situadas próximas aos fragmentos de florestas. A *Leishmania chagasi* já foi relatada também em primatas (Malta et al., 2010), felídeos (Dahroug et al., 2010) e canídeos (Figueiredo et al., 2008; Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011) mantidos em zoológicos brasileiros abertos à visitação pública (Figura 05).

Os animais silvestres e domésticos geralmente são indicados como reservatórios da doença, enquanto os humanos são considerados hospedeiros susceptíveis em áreas urbanizadas e também em áreas verdes com a presença dos vetores *Lutzomyia longipalpis* ou *L. cruzi* (Brasil, 2005).

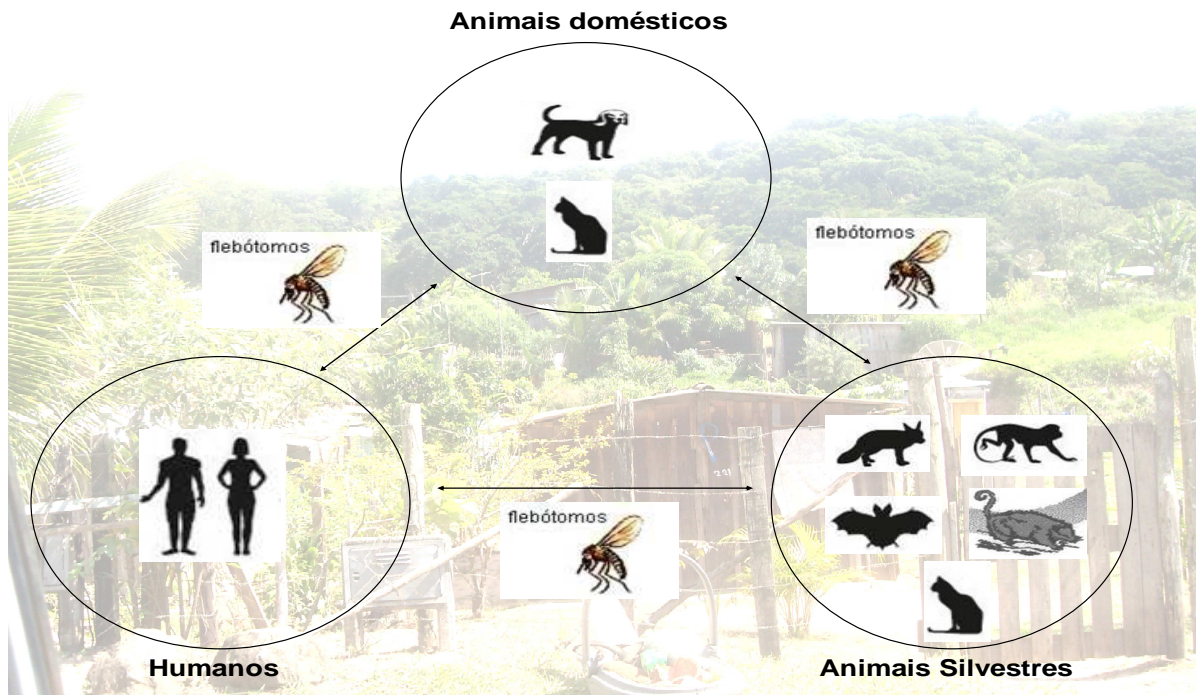


Fig. 5: Potencial ciclo de transmissão do parasito *Leishmania* sp. em humanos, animais silvestres e domésticos através da picada de flebotomos infectados (Modificado de autor desconhecido).

As alterações ecológicas que influenciam a epidemiologia de zoonoses podem ser de origem natural ou antropogênica (Kruse, Kirkemo & Handeland, 2004). A expansão das atividades antrópicas causa impactos ambientais negativos, tais como o desflorestamento e consequente fragmentação do habitat, alterações climáticas (Brasil et al., 2008) e massiva migração humana (Kruse, Kirkemo & Handeland, 2004; Daszak, Cunningham & Hyatt, 2001), sendo estes indicados como fatores predisponentes da LV (Costa et al., 1995; Franke et al., 2002; Gontijo & Melo, 2004). O processo intenso de urbanização e a poluição causada pelos humanos com acúmulo excessivo de matéria orgânica favorecem a reprodução do vetor da doença (Costa et al., 1995; Barboza et al., 2006).

No Brasil, o ambiente silvestre vem sendo afetado negativamente durante anos através de desmatamentos e processos intensos de urbanização, sendo que, no estado da Bahia, nos

últimos 15 anos, houve um aumento da especulação imobiliária em áreas verdes (Limonad, 2008). A profunda influência antrópica sobre o ecossistema silvestre, em razão ao desflorestamento, obriga animais silvestres a viverem próximos aos seres humanos em busca de alimentação e abrigo (Sherlock, 1996). Por sua vez, a presença de animais silvestres (Sherlock et al., 1996; Cabrera et al., 2003; Santiago et al., 2007) e domésticos (Barata et al., 2005; Barboza et al., 2006) no peridomicílio pode atrair diversos flebotomíneos, inclusive algumas espécies que são vetores de leishmanioses, contribuindo, assim, para o aumento do risco de transmissão da infecção.

Alguns zoológicos brasileiros já registraram casos de presença da *Leishmania* sp. em cachorro-vinagre (*S. venaticus*) (Lima et al., 2005; Figueiredo et al., 2008; Luppi et al., 2008; Souza et al., 2010; Jusi et al., 2011). A Fundação Zoobotânica (FZB) de Belo Horizonte (BH) ainda registrou a ocorrência do parasito em raposa-do-campo (*L. vetulus*) e no lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815), como também o desenvolvimento do quadro clínico da LV e o óbito de duas espécies de canídeos, o cachorro-vinagre e a raposa-do-campo (Luppi et al., 2008). Há relatos de ocorrência de canídeos silvestres, em conservação *in situ*, positivos aos testes sorológicos e/ou parasitológicos para a *Leishmania* sp., sem desenvolver sinais clínicos (Courtenay et al., 2002a; Curi, Miranda e Talamoni, 2006).

Portanto, existem muitos trabalhos indicando animais silvestres como potenciais reservatórios da LV (Dahroug et al., 2010; jusi et al., 2011), mas é comum o relato de pouca infectividade ou xenodiagnóstico negativo (Sherlock et al., 1996; Couternay et al., 2002a).

2.3. Canídeos silvestres como parte do ciclo da LV no Brasil

O ciclo da LV envolve a participação de animais domésticos, silvestres e humanos. É um ciclo complexo, sendo imprescindível uma abordagem transdisciplinar quando há o objetivo de manutenção da saúde pública como resultado do equilíbrio entre as saúdes humana, animal e do ecossistema (Figura 6).

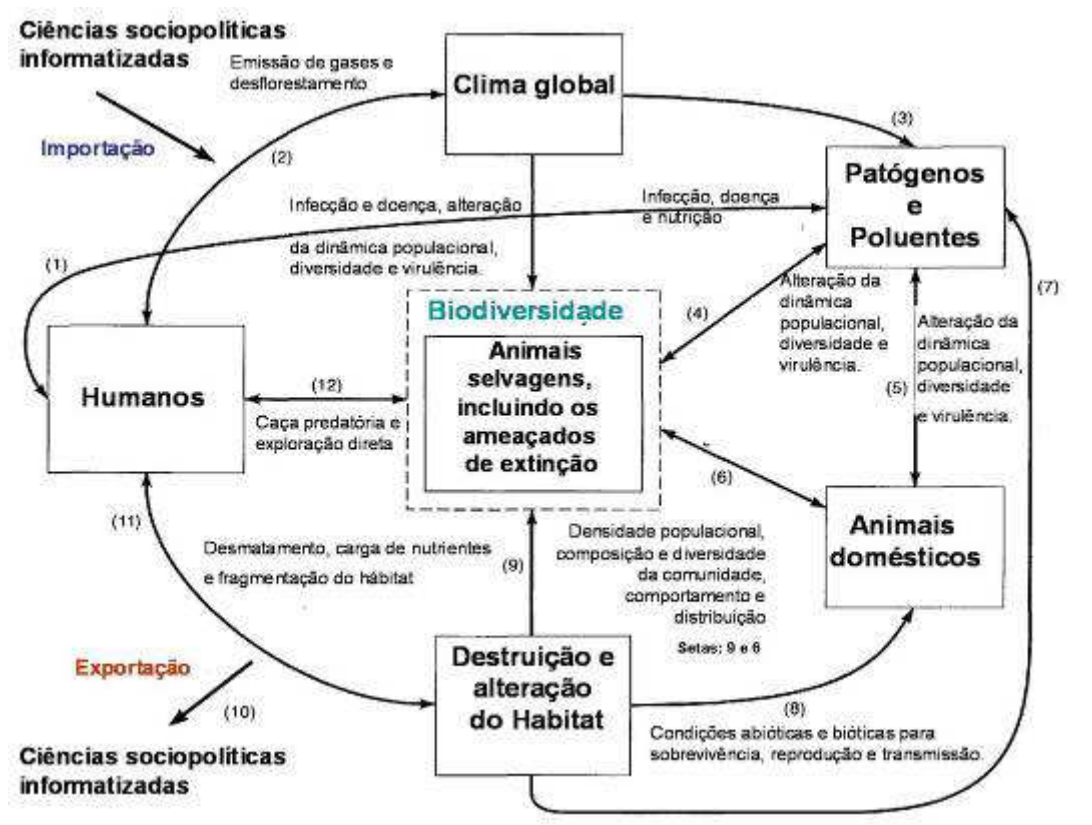


Fig. 6: Ilustração das interações complexas entre as saúdes humana, animal e do ecossistema gerando impactos negativos sobre a biodiversidade global. (Modificado de Aguirre, 2009).

No Brasil, a raposa-do-campo (*L. vetulus*) e o cachorro-do-mato (*C. thous*) são os canídeos considerados reservatórios naturais da LV, sendo estes indicados como os principais responsáveis por manter a *Leishmania* sp. no ambiente natural. Todavia, há indícios de infecção em outras espécies de canídeos, a exemplo do lobo-guará (*C. brachyurus*), inclusive em vida livre (Curi, Miranda e Talamoni, 2006), e cachorro-vinagre (*S. venaticus*) em ambiente cativo (Luppi et al., 2008; Lima et al., 2009; Jusi et al., 2011). Nas instituições conservacionistas presentes em áreas endêmicas para a LV, a situação é tão grave que são também relatadas infecções naturais de felídeos silvestres nativos e exóticos (Dahroug et al., 2010; 2011) bem como de primatas (Malta et al., 2010), não sendo comum este achado na natureza.

O flebotomo *L. longipalpis* é o principal vetor da LV no Brasil (Brasil, 2005), o qual é descrito como uma espécie oportunista, de hábito silvestre e noturno, se alimentando principalmente de aves e mamíferos (Dias, Lorosa & Rebêlo, 2003; Lainson & Rangel, 2005; Missawa et al., 2008). Na Bahia, há indícios de alimentação do flebotomo *L. longipalpis*

sobre o cachorro-do-mato (*C. Thous*), o qual apresentara anticorpos anti-saliva do vetor (Gomes et al., 2007). Esta relação também foi verificada num estudo realizado na Amazônia em 1990 (Laison et al., 1990).

O plano de manejo do lobo-guará (2007) indica a vacinação da espécie contra a raiva, parvovirose e cinomose, bem como o cuidado com o acúmulo de matéria orgânica nos recintos, ou nas áreas próximas, devido à atração de vetores de doenças. Esses cuidados preventivos são extrapolados para todo o plantel de canídeos nas instituições conservacionistas brasileiras (Gomes, 2006).

A imunoprofilaxia dos canídeos silvestres contra a LVC ainda não é cogitada, pois não há estudos nas espécies silvestres e as duas marcas comerciais de vacinas disponibilizadas no Brasil, mesmo já sendo comercializadas e utilizadas nos cães domésticos, ainda carecem de resultados mais significativos sobre a sua eficácia na proteção do cão imunizado contra a *Leishmania* sp. Ainda há dúvidas sobre a capacidade das vacinas em bloquear a transmissão do parasito do animal infectado para o flebótomo (Brasil, 2007; 2009; De Amorim et al., 2010), mesmo com a existência de alguns trabalhos indicando que os cães vacinados podem não permanecer como reservatórios (Da Silva et al., 2000; Nogueira et al., 2005; Dantas-Torres, 2006; Saraiva et al., 2006).

Para os animais cativos, o uso de coleira impregnada com deltametrina e a sua troca a cada três meses, bem como o controle sobre os animais domésticos circulantes nas instituições, são preconizados como meios de prevenção contra a infecção por *Leishmania* sp. em áreas endêmicas (Luppi et al., 2008; Figueiredo et al., 2008). A realização periódica de testes diagnósticos adequadamente validados é importante principalmente para animais recém-chegados de áreas endêmicas, inicialmente sendo imprescindíveis ainda na quarentena.

2.4. A fisiopatologia da infecção por *Leishmania* e a resposta imune em canídeos.

A fisiopatologia e a resposta imune após a inoculação dos parasitos do gênero *Leishmania* pelos vetores vêm sendo objeto de estudos minuciosos em cães domésticos nos campos da imunologia, patologia e clínica médica (Pinelli et al., 1999; Kramer et al., 2006; Carillo et al., 2008). Entretanto, não há estudo detalhado sobre o desenvolvimento da infecção e a resposta imunológica nos canídeos silvestres, geralmente sendo descrita uma cura espontânea (Courtenay et al., 2002a) ou evolução para o óbito (Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011) naqueles animais que apresentam os sinais clínicos característicos da doença.

Muitos trabalhos têm utilizado os modelos murinos e humanos para o estudo da resposta imunológica do hospedeiro infectado com a *Leishmania* (Brunda, 1994; Reiner et al., 1995; Bogdan, 2001; Kane et al., 2001). Foram descritos dois tipos de resposta imunológica efetora contra a *Leishmania* sp, a resposta celular caracterizada pelo tipo Th1, responsável pela resistência contra a doença, e o tipo Th2, caracterizada por uma significativa resposta humoral, sendo esta evidente em animais susceptíveis à LV (Pinelli et al., 1994; Kramer et al., 2006). Os canídeos silvestres de vida livre naturalmente infectados com a *Leishmania* sp. geralmente não desenvolvem a doença (Curi et al., 2006; Gomes et al., 2007), porém em cativeiro são observadas manifestações clínicas da LVC com maior frequência (Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011).

Nos estudos de infecção experimental com modelos murinos e caninos, é comum a via intravenosa (IV) para a inoculação de promastigotas de *L. chagasi* com o objetivo de estudar a sintomatologia clínica e a imunopatologia nos indivíduos (Tafari et al., 1996; Santos-Gomes et al., 2002). A inoculação IV de grandes quantidades de parasito parece ser altamente patogênica e o indivíduo manifesta rapidamente os sinais clínicos da LVC sob condições artificiais (Travi et al., 2009). Por outro lado, a inoculação de antígenos lisados associados à forma promastigota viva por via subcutânea (SC), parece estimular a resposta celular em cães, os quais podem permanecer um longo período assintomáticos, sendo indicados como modelos para controle positivo no estudo de resposta imune celular em organismo vivo (Teixeira et al., 2011).

A evolução clínica, parasitológica e imunológica da LVC em cães domésticos infectados artificialmente com altas taxas de formas promastigotas pela via IV é associada a maior disseminação do parasito para os linfonodos e maior infectividade de flebótomos (Travi et al., 2009). Portanto, esse estudo esclarece que modelos experimentais desencadeiam respostas imunológicas intensas, que podem ser bastante distintas das condições naturais de infecção.

Em condições naturais, a *L. chagasi* é inoculada no hospedeiro através da picada do flebótomo infectado. Resumidamente, após a inoculação, os parasitos invadem os macrófagos, onde se multiplicam e são levados aos linfonodos drenantes e ao baço pela circulação linfática, causando uma doença disseminada pela via sanguínea e fatal, caso o hospedeiro apresente falhas na geração de resposta protetora contra o patógeno (Pinelli et al., 1999). Uma resposta intensa de linfócitos Th1 contra os antígenos, além da produção de citocinas, como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), necessárias para ativação de macrófagos, são imprescindíveis para a morte do parasito intracelular (Pinelli et al., 1999). A interleucina (IL) 12 é também relatada como uma citocina característica de indivíduos com padrão de resposta imunológica Th1, enquanto a susceptibilidade está relacionada com a produção de IL-4, IL-10 e fator de crescimento tumoral (TGF- β) (Bogdan, 2001; Kane et al., 2001; Murray et al., 2002). A IL 12 é produzida pelas células do sistema fagocitário mononuclear e induz a produção de IFN- γ (Brunda, 1994), esta por sua vez produzida por células dendríticas, natural killer (NK) e macrófagos, induz a produção de óxido nítrico, uma das moléculas mais importantes para a destruição do parasito intracelular (Trinchieri et al., 1993; Reiner et al., 1995; Pinelli et al., 1999; Bogdan, 2001; Sisto et al., 2001).

No caso dos canídeos silvestres, a pertinência da idéia de desenvolver estudos consistentes sobre a infecção natural tem inúmeras razões, sendo o desconhecimento científico das interações parasito-hospedeiro-ambiente nesses animais a principal delas. Como exemplo: o lobo-guará tem como principal alimento na sua dieta o fruto de uma planta nativa das áreas geográficas onde ainda há remanescentes de matas e populações naturais de lobos, a lobeira, *Solanum lycocarpum* (Dietz, 1984). Uma planta da mesma família e gênero da *S. lycocarpum*, a *Solanum lyratum*, é amplamente utilizada na medicina coreana, sendo descrita sua principal função terapêutica o aumento da produção de óxido nítrico, ou seja, da atividade

dos macrófagos (Kim et al., 1999; Yang et al., 2010). Esse comportamento alimentar do lobo guará, portanto, poderia consistir em um fator fundamental a manter uma resposta imunológica protetora contra a *Leishmania* sp, explicando uma possível resistência natural dos animais de vida livre ao desenvolvimento da doença. Foram observados animais de vida livre soropositivos e assintomáticos para a LVC na Serra do Cipó por Curi, Miranda e Talamoni (2006). Esse mesmo aspecto poderia ainda explicar porque as mesmas espécies quando mantidas em cativeiro em áreas endêmicas adoecem mais frequentemente.

Em cães domésticos naturalmente infectados com *L. chagasi*, há uma complexa infinidade de parâmetros que caracterizam as respostas de animais infectados, bem diferentes do que ocorre em condições de laboratório. Reunindo trabalhos de diferentes países onde a doença é endêmica, incluindo o Brasil, os autores Sollano-Gallego et al, (2009) definiram estágios de gravidade clínica com alterações imunopatológicas equivalentes e diversas. O papel de elementos como as citocinas IL.12, I IFN- γ (Miralles et al., 1994; Andrade et al., 1999; Pinelli et al., 1999), o TGF- β (Barral et al., 1993; Kaye et al., 2004), IL-2, IL-4 (Lage et al, 2007), ou IL-10 (Quinnell et al., 2001; Santos-Gomes et al., 2002; Alves et al., 2009; Boggiato et al., 2010) vem sendo bem descrito nesse animais.

As maiores cargas parasitárias teciduais e sanguíneas, índice mais importante no aspecto de transmissibilidade ao vetor (Travi et al, 2001), foram associadas por alguns autores à maior expressão de IL-10 (Verma et al, 2010) tanto em cães quanto em seres humanos.

Os cães que desenvolvem a resposta Th2 apresentam uma resposta predominantemente humoral, passível de detecção em ensaios sorológicos padronizados. Alguns trabalhos associam uma maior resposta humoral às complicações clínicas da doença nos indivíduos infectados (Sollano-Gallego et al., 2001; 2009; Travi et al., 2001), pelo depósito de imunocomplexos nos glomérulos renais causando insuficiência renal nos cães doentes (Lopez et al., 1996; Blavier, 2001) e outras lesões imunomediadas, como as uveítes, artrites e vasculites cutâneas (Torres et al., 2011). A predominância da imunoglobulina IgG2 tem sido indicada como aspecto do perfil de resposta de cães assintomáticos e, portanto, resistentes à doença, enquanto a predominância da IgG1 é associada à resposta de animais sintomáticos e susceptíveis ao progresso da doença (Deplazes et al., 1995; Solano-Gallego et al., 2001). Contudo, há controvérsias, pois há trabalhos com resultados discordantes em que

não foram observadas as mesmas associações entre as subclasses de imunoglobulinas (IgG1 e IgG2) e a evolução clínica da LVC em cães infectados (Cordeiro-da-Silva et al., 2003; Iniesta et al., 2005; Travi et al., 2009).

Todos esses elementos ainda estão por ser analisados e descritos em canídeos silvestres.

2.5. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral em canídeos

A sintomatologia clínica da LVC em canídeos silvestres infectados é semelhante à dos cães domésticos (Luppi et al., 2008; Souza et al., 2010; Jusi et al., 2011). Em geral, cães infectados são classificados em assintomáticos e sintomáticos, respectivamente na ausência ou presença de sinais clínicos conhecidos e associados à infecção (Blavier et al., 2001; Cordeiro-da-Silva et al., 2003; Gontijo et al., 2004). Os animais sintomáticos, por sua vez, são caracterizados por critérios variáveis, geralmente quantitativos, de classificação de sinais clínicos em diferentes sistemas, em oligossintomáticos, quando apresentam poucos sinais da doença e polissintomáticos, quando apresentam maior número de alterações clínicas, incluindo entre elas as dermatopatias cutâneas, emaciação, anemia, adenopatia, hepato-esplenomegalia, onicogribose, febre, hipergamaglobulinemia (Barrouin-Melo et al., 2004; Brum et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2009).

No geral, há relatos de canídeos silvestres soropositivos e/ou infectados com a *Leishmania* sp. sem desenvolver o quadro clínico característico da doença (Sherlock, 1996; Curi, Miranda e Talamoni, 2006; Lima et al., 2009). Em casos mais raros, a doença pode manifestar-se discretamente após a infecção, porém pode ocorrer a cura espontânea (Couternay et al., 2002a). Os quadros mais graves e com evolução para a morte, são já relatados em ambiente cativo (Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011; Tenório et al., 2011).

Os animais cativos parecem tornar-se mais susceptíveis à depressão do sistema imunológico, ação patogênica bem descrita nos estudos sobre a *Leishmania* (Kaye et al., 2004), pois esses canídeos estão submetidos a um elevado nível de estresse com o manejo

frequente, a modificações de fontes alimentares e a maior exposição às picadas dos vetores infectados (Luppi et al., 2008). Além disso, a presença de animais domésticos (cavalos, cães, gatos) e sinantrópicos (aves, sariguês, roedores), nos zoológicos, problema bastante comum no Brasil, é indicada como fator de risco para a manutenção da *Leishmania* sp. em áreas com registro de flébotomos (Jusi et al., 2011).

Alguns autores têm contribuído para o conhecimento da leishmaniose em animais silvestres com relatos de casos. Figueiredo e colaboradores (2008) relataram a infecção cutânea de um cachorro-vinagre por *L. chagasi* no Zoológico do Rio de Janeiro (RJ), que na avaliação física foi considerado assintomático, porém no exame histopatológico foi verificada dermatite focal crônica com ausência de formas amastigotas do parasito. Os autores enfatizaram a necessidade de maiores cuidados preventivos sobre as doenças infecto-contagiosas no trânsito de animais silvestres entre as instituições conservacionistas, já que a origem do canídeo era o estado de Mato Grosso, uma área endêmica para a LV. Souza e colaboradores (2010) descreveram o quadro clínico de um cachorro-do-mato (*C. thous*) mantido em cativeiro no estado do Mato Grosso, Brasil. O canídeo era positivo para *L. chagasi* em amostras de linfonodo, medula óssea e pele, sendo verificado no exame físico dermatite fufurácea, emaciação, onicogribose, uveíte e hepato-esplenomegalia. Ainda no estado do Mato Grosso, Almeida e colaboradores (2011) verificaram a associação entre as infecções por *L. chagasi* e Adenovírus canino tipo 1, causando hepatite infecciosa e uma série de lesões inflamatórias em outros órgãos, observadas macroscopicamente durante a necrópsia de um espécime de cachorro-vinagre (*S. venaticus*) cativo e microscopicamente através do exame histopatológico dos órgãos coletados.

2.6. O diagnóstico laboratorial da LV

2.6.1. Técnicas Sorológicas

Os testes sorológicos para pesquisa de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* sp. são os mais frequentemente empregados no diagnóstico laboratorial da infecção em cães domésticos (Barboza et al., 2006; Barrouin et al., 2006; Brasil et al., 2005). Alguns trabalhos relatam a utilização de ELISA e/ou IFI na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em diferentes espécies de canídeos silvestres (Courtenay et al., 2002a; Curi, Miranda e Talamoni, 2006; Luppi et al., 2008; Lima et al., 2009).

Existe certa dificuldade na padronização dos testes sorológicos para as diversas espécies de canídeos silvestres devido à falta de conjugados específicos. A utilização de anti-IgG de cão doméstico é descrita para a pesquisa de anticorpo anti-*Leishmania* sp. em cachorro-do-mato (*C. thous*), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) e lobo-guará (*C. brachyurus*) (Mancianti, Mignone e Galestri, 1994; Courtenay et al., 2002a; Curi, Miranda & Talamoni, 2006; Lima et al., 2009), de acordo com as semelhanças genéticas entre indivíduos pertencentes à mesma família, tais como aqueles da família Canidae (Zrzavy & Ricancova, 2004). O uso de conjugados inespecíficos, tais como a proteína A, já foi descrito também em sorotestes com o objetivo de avaliações em cachorro-vinagre (*S. venaticus*) (Lima et al., 2005), lobo-guará (*C. brachyurus*), raposa-do-campo (*L. vetulus*) e cachorro do mato (*C. thous*) (Ferreira et al., 2009).

Os testes imunenzimáticos (ELISA), baseados no reconhecimento da molécula de IgG, permitem a leitura de uma reatividade mensurável, diretamente proporcional ao título de anticorpos específicos para o parasito presentes na amostra de soro (Soares, 2001). Essa propriedade depende da ligação entre o anticorpo específico do animal examinado, fixado ao antígeno, e o segundo anticorpo, no caso o anti-IgG ou a proteína A, conjugados a uma molécula de enzima que reage com o substrato, permitindo a reação de cor quantificada por espectrofotometria (Soares, 2001; Lima et al., 2005;2009).

O conjugado anti-IgG de cão com peroxidase é uma imunoglobulina desenvolvida em animais de espécie diferente (rato, coelho e outros), sensibilizados com IgG de cão. Essa imunoglobulina identifica especificamente as moléculas de IgG canina reativas a antígenos de *Leishmania* sp. adsorvidos na fase sólida, representada por uma placa de poliestireno (Soares, 2001). No caso de canídeos de diferentes espécies, é necessário que o conjugado seja capaz de ligar-se especificamente às suas moléculas de IgG, presentes no soro, para que o teste seja capaz de diagnosticar a sororreatividade aos antígenos do parasito e, conseqüentemente, detectar a soroconversão. A mesma condição ocorre com os testes de imunofluorescência que utilizam como conjugado uma imunoglobulina específica para IgG de cão, marcada com fluoresceína (Oliveira et al, 2005). Portanto, a adequação dos reagentes, da mesma forma que os desenvolvidos para cães domésticos, é uma condição importante a ser observada em estudos baseados em imunotestes em canídeos silvestres, que devem ser devidamente padronizados para cada espécie.

A proteína A ligada a peroxidase é um conjugado polivalente, obtido a partir da bactéria *Staphylococcus aureus* que, no teste de ELISA, se liga inespecificamente às diferentes classes de imunoglobulinas (Igs) reativas ao antígeno de *Leishmania* sp., adsorvido na fase sólida, a placa de poliestireno (Fisa et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2003). Esta proteína possui uma boa afinidade com as imunoglobulinas G (IgGs) de diferentes espécies (cão, gato, humano) (Goudswaard et al., 1978; Fisa, et al., 1997). Este conjugado ainda possui a capacidade de detectar parcialmente moléculas de IgA e IgM, sendo descrita como uma ferramenta útil para a identificação de animais na fase aguda da infecção (Goudswaard et al., 1978; Lima, et al., 2005). Não é comum o achado de conjugados específicos para a padronização dos testes sorológicos em espécies silvestres, o que faz da proteína A uma boa alternativa na ausência daqueles.

Lima e colaboradores (2005), ao estudar a eficiência do teste ELISA com a proteína A conjugada à peroxidase, na detecção de cães domésticos com LV, demonstraram que não houve reações cruzadas quando foram testados soros de cães domésticos positivos para outros agentes infecciosos, como *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis* ou *Dirofilaria immitis*.

Um estudo com 21 canídeos de vida livre (*C. thous*, *C. brachyurus* e *L. vetulus*) do Parque Nacional de Serra do Cipó, Minas Gerais, analisou as amostras de soros através da técnica de imunofluorescência indireta e ELISA, ambas com o conjugado anti-IgG de cão para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. (Curi, Miranda e Talamoni, 2006). Nesse trabalho foi detectada a soropositividade em 19% dos animais (4/21), dois cachorros-do-mato (*C. thous*) e dois lobos-guará (*C. brachyurus*). No estudo, os autores não excluíram a possibilidade de reação cruzada com outros kinetoplastídeos.

Couternay e colaboradores (2002a) verificaram, no estado do Pará, a prevalência de 78% (29/37) de cachorros-do-mato de vida livre soropositivos na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. pelo teste ELISA com o conjugado anti-IgG de cão doméstico. O título calculado para cães domésticos da mesma região, foi utilizado como ponto de corte, já que o valor do ponto de corte não era conhecido para a espécie *C. thous*.

Os testes ELISA e IFI podem apresentar especificidade e sensibilidade variáveis para cães domésticos (Paranhos-Silva et al., 1996; Oliveira et al., 2005; Curi, Miranda & Talamoni, 2006). Em um estudo realizado na Região Metropolitana de Salvador, Oliveira e colaboradores (2005), ao testarem comparativamente a capacidade diagnóstica do ELISA indireto e da IFI, em 30 cães domésticos positivos em exames parasitológicos para detecção de *Leishmania* sp., constataram especificidades e sensibilidades de 90% e 100% para o ELISA e 40% e 98,6% para a IFI, respectivamente. Com isso, os autores demonstraram a possibilidade de ocorrência de resultados falsos positivos no teste IFI para o diagnóstico da infecção canina. Os testes ELISA e IFI podem gerar um número variável de resultados falso-positivos e falso-negativos (Paranhos-Silva et al., 1996; Silva et al., 2005).

A técnica de Western Blot (WB) é um teste sorológico também de ligação primária entre antígeno e anticorpo, sendo descrita como um método mais sensível e precoce, quando comparado a IFI e ELISA, sugerindo a possibilidade da sua utilização como método confirmatório, preditor da doença e do parasitismo no cão (Aisa et al., 1998). O WB já foi utilizado em canídeos selvagens na Espanha acompanhado pela PCR, para investigar a ocorrência de infecção por *L. infantum* nos canídeos europeus (Sobrino et al., 2008). Silva e colaboradores (2005) realizaram WB em cães domésticos com infecção natural em Barra de Guaratiba (RJ), área endêmica para a LVC. Foram detectados os peptídeos com 29 kDa e 32

kDa, indicados pelos autores como preditores de infecção tecidual, sendo ainda reconhecido um antígeno com 68,5 kDa, este reconhecimento com a possibilidade de ser utilizado como preditor de susceptibilidade para o desenvolvimento da doença.

Oliveira e colaboradores (2005) testaram no WB dez soros de cães domésticos provenientes da cidade de Camaçari-BA, com resultado parasitológico positivo para *Leishmania chagasi* em cultura esplênica e resultados sorológicos concordantes, ou não, entre os testes ELISA e IFI. Neste trabalho, o teste ELISA apresentou uma acurácia maior do que a IFI quando comparados aos resultados dos testes parasitológico e WB. As bandas imunodominantes detectadas pelo WB nesse estudo corroboraram algumas previamente descritas: 14 (Berrahal et al., 1996; Aisa et al., 1998) e 16 kDa (Berrahal et al., 1996), 30 e 68 kDa (Vercammen et al., 2002), 32 (Mancianti et al., 1995; Aisa et al., 1998; Silva et al., 2005) e aproximadamente 120 kDa (Mancianti et al., 1995).

O WB foi utilizado como parte de monitoramento de cães infectados naturalmente pela *L. infantum* (= *L. chagasi*) submetidos ao tratamento numa região endêmica situada na Espanha. Nesse estudo foram detectadas várias bandas de diferentes pesos moleculares, porém a de 26 kDa foi indicada como uma banda preditora do prognóstico clínico da LVC. Presumivelmente, os animais que apresentaram uma reatividade forte dessa banda, não foram curados através do uso de Alopurinol e Glucantime durante o tratamento (Fernandez-Perez et al., 1999).

2.6.2. Exame Parasitológico

Os exames parasitológicos por cultura *in vitro* ou *in vivo* permitem um diagnóstico definitivo da LV em até 100% de especificidade, mas a sensibilidade é bastante variável, a depender da carga parasitária do animal, do órgão de escolha na técnica de amostragem ou da habilidade do pessoal técnico de laboratório (Mathis & Deplazes, 1995; Barrouin-Melo et al., 2004; Gontijo & Melo, 2004; Brasil, 2005; Sastre et al., 2008).

A demonstração do parasito pode ser realizada em material de biopsia ou punção aspirativa do baço, fígado, linfonodo ou medula óssea (Gontijo & Melo, 2004). O esfregaço de sangue periférico é um método capaz de identificar a *Leishmania* sp. nos animais com parasitemia, que ocorre quando o animal alberga altas cargas parasitárias (Gomes et al., 2008). Atualmente, sabe-se que a sensibilidade mais alta no teste parasitológico pode ser obtida quando se utiliza aspirado do baço (Barrouin-Melo et al., 2004; Gontijo & Melo, 2004; Brasil, 2005).

Em cães domésticos, o diagnóstico parasitológico em cultura *in vitro* de aspirados esplênicos obtidos por punção é um método bastante seguro e sensível, capaz de detectar a *Leishmania* sp. em animais assintomáticos (Barrouin-Melo et al, 2006) (Figura 7). De acordo com a experiência do nosso grupo de pesquisa, a técnica descrita para cães domésticos pode ser extrapolada para os canídeos silvestres (Figura 8 e 9).

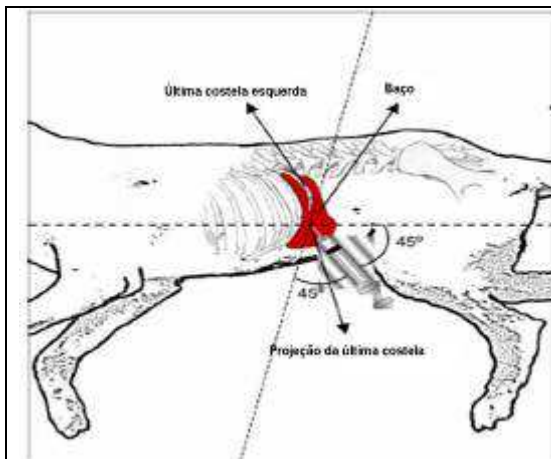


Fig. 7: Técnica de punção esplênica descrita para cão doméstico. **Fonte:** Barrouin-Melo et al., 2006.



Fig. 8: Técnica de punção esplênica extrapolada de cão doméstico para cachorro-do-mato (*C. thous*). **Foto:** Rogério Cunha.



Fig. 9: Aspirado esplênico obtido de um cachorro-do-mato (*C. thous*). Foto: Rogério Cunha.

Courtenay e colaboradores (2002a) verificaram a positividade para a *Leishmania* sp. em 25,8% (8/31) das amostras de cachorros-do-mato, em conservação *in situ*, através da utilização do exame parasitológico, cultura *in vitro* ou *in vivo*, no município de Salvaterra, estado do Pará, Brasil. Já Figueiredo e colaboradores (2008) relataram a identificação da *L. chagasi* em um cachorro-vinagre cativo utilizando a cultura de pele associada à eletroforese enzimática multilocus (EEM). Apesar da segurança no diagnóstico, os métodos parasitológicos são utilizados em menor escala para a detecção da *Leishmania* sp. em canídeos selvagens, por serem mais invasivos, laboriosos e menos sensíveis que os métodos sorológicos.

2.6.3. Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

Desde a década de 80, diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas para a detecção precisa dos parasitos do gênero *Leishmania* sp., tais como as PCRs que detectam os ácidos nucleicos do parasito (Gontijo & Melo, 2004).

A técnica de PCR permite diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade, entretanto a possibilidade de reação cruzada entre a *Leishmania* sp. e o *Trypanossoma* sp. não pode ser ignorada e depende do desenho do primer utilizado (Courtenay et al., 2002a; Lachaud et al., 2002). Courtenay e colaboradores (2002a), ao considerar este fato, submeteram o DNA extraído de amostras de medula óssea de *C. thous* ao PCR, utilizando dois primers específicos para a *Leishmania* sp., o mini-círculo DNA e o DNA ribossomal. Foram considerados animais infectados apenas os positivos para ambos os primers, somando-se um total de 38% (8/21) dos indivíduos da amostra.

Os materiais biológicos utilizados na PCR podem ser obtidos de aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, do sangue total, da camada leucocitária, de cultura e sangue coletado em papel-filtro (Tavares, Fernandes & Melo, 2003; Luppi et al., 2008; Souza et al., 2010; De Almeida et al., 2011; Tenório et al., 2011). Contudo, a sensibilidade da PCR pode variar conforme o método e o material biológico utilizados, uma vez que existe relato de baixa quantidade de parasito em sangue periférico de lobos (*Canis lupus*) cativos no sul da Europa (Sastre et al., 2008) e tropismo do parasito por outros tecidos, tais como baço, medula óssea, linfonodo e pele (Reale et al., 1999; Sollano-Gallego et al., 2001).

Em geral, a positividade de diversas espécies de canídeos silvestres ou exóticos para a *Leishmania* sp. já foi verificada pela técnica PCR, tanto nos animais em conservação *in situ* (Courtenay et al., 2002a; Sobrino et al., 2008) quanto naqueles em conservação *ex situ* (Figueiredo et al., 2008; Luppi et al., 2008; Souza et al., 2010; Jusi et al., 2011).

No Zoológico de Belo Horizonte quatro canídeos silvestres foram soropositivos no ELISA e IFI, sendo detectado o DNA da *L. chagasi* nas amostras de medula óssea de duas raposinhas (*L. vetulus*) e de um lobo-guará (*C. brachyurus*). Contudo, o cachorro-do-mato

soropositivo, porém negativo na PCR, era o que tinha o título sorológico mais baixo entre os positivos da IFI (Luppi et al., 2008).

No ano de 2010, cinco cachorros-do-mato (*C. thous*) e um cachorro-vinagre (*S. venaticus*), cativos no zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), foram positivos para *L. chagasi* em amostras de medula óssea, linfonodo e fragmentos cutâneos testadas pela técnica de PCR – Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP). Ainda nesse estudo, um cachorro-do-mato e um cachorro-vinagre adultos manifestaram o quadro clínico característico da doença.

Em um zoológico situado na Ilha Solteira, São Paulo, um lobo-guará (*C. brachyurus*), um cachorro-do-mato (*C. thous*) e um cachorro-vinagre (*S. venaticus*) foram todos soropositivos no ELISA e IFI para a *Leishmania* sp. (Jusi et al., 2011). No entanto, o cachorro-do-mato manifestou os sinais clínicos da doença vindo a óbito, sendo detectada a *Leishmania* sp. em amostras de baço, fígado, pele e linfonodo coletados post-mortem. Ainda nesse trabalho, foi possível detectar o parasito pela PCR em fragmento de pele hígida do lobo-guará soropositivo, reforçando a possibilidade da participação dos canídeos silvestres assintomáticos no ciclo da LV como reservatório da doença.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação de ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico sorológico da infecção por *Leishmania* sp. em canídeos silvestres

Evaluation of immunoenzymatic assays for the *Leishmania* sp. infection diagnosis in wild canids

FERREIRA, Paulo Roberto Bahiano¹; LARANGEIRA, Daniela Farias²; OLIVEIRA, Lídia Silva de¹; MALTA, Marcelo de Campos Cordeiro³; GOMES, Marta Calasans⁴; BASTOS, Bruno Lopes⁵; PORTELA, Ricardo Wagner⁵; BARROUIN-MELO, Stella Maria²

¹ Universidade Federal da Bahia (UFBA), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ), Laboratório de Infectologia Veterinária (LIVE), Salvador, Bahia (BA), Brasil.

² UFBA, EMVZ, LIVE, Departamento de Patologia e Clínicas, Salvador-BA, Brasil.

³ Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte (FZB-BH), Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brasil.

⁴ Fundação Zoobotânica Getúlio Vargas (PZGV), Salvador-BA, Brasil.

⁵ UFBA, Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO), Salvador-BA, Brasil.

RESUMO

No presente estudo, é descrita a padronização da técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA) para o sorodiagnóstico da infecção causada por *Leishmania* em canídeos silvestres brasileiros. Na América do Sul, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *L. chagasi*, sendo alguns canídeos considerados reservatórios naturais do parasito. A resposta imunológica à *Leishmania* é pouco estudada nos canídeos silvestres, que parecem apresentar resistência natural ao parasito. Foram estudadas amostras de soro/plasma obtidas de 12 canídeos cativos: sete lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), três raposinhas (*Lycalopex vetulus*) e dois cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*). Dentre os canídeos estudados, um lobo-guará e uma raposinha eram positivos na PCR para *Leishmania* sp. Foram então realizados diferentes ensaios imunoenzimáticos com o conjugado anti-IgG de cão e proteína A. Os testes com ambos os conjugados foram capazes de distinguir claramente as amostras positivas das negativas. Os testes ELISA com a proteína A e o conjugado anti-IgG de cão apresentaram uma concordância excelente (Kappa = 1 p. 0,001) e moderada com o Western Blot

respectivamente. O ensaio com a proteína A mostrou ser adequado a testes sorológicos de triagem, mas o desenvolvimento de conjugados com anticorpos espécie-específico deve ser almejado para a padronização de sorotestes mais sensíveis para as diferentes espécies silvestres considerando um maior número de animais.

Palavras-chave: Canídeos silvestres; Leishmaniose visceral, Proteína A, Sorologia; Diagnóstico; *Leishmania* sp

ABSTRACT

In the present study, the standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of infection by *Leishmania* in brazilian species of wild canids is described. In South America, visceral leishmaniosis (VL) is caused by *L. chagasi*, being some wild canids considered natural reservoirs of the parasite. The immunological response to *Leishmania* is not studied enough in the wild canids, which seem to show natural resistance to the parasite. Samples of serum/plasma from 12 captive wild canids were studied: seven maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*), three hoary foxes (*Lycalopex vetulus*) and two crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). Among the studied canids, a maned wolf and a fox were positive to PCR for *Leishmania* sp (Ezequiel Dias Foundation – BH – MG). Different ELISAs methodologies were conducted, which evaluated the samples of all animals with the anti-dog IgG conjugate and protein A. It was found that ELISA tests with either conjugate were able to distinguish clearly positive from negative samples. The ELISA with protein A and conjugated anti-dog IgG showed excellent agreement (Kappa = 1 p. 0.001) and moderate (Kappa = 0,8 p. 0,0015) with the Western Blot respectively. The test showed the protein to be suitable for serological screening tests, but the development of conjugated species-specific antibodies should be desired to standardize serotests more sensitive to the different wild espécies whereas a greater number of animals.

Keywords: Wild canids; Visceral leishmaniasis; Serology; Diagnosis; *Leishmania* sp.; Protein A.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma metazoonose de humanos e canídeos, causada nas Américas pela *Leishmania chagasi* (Brasil, 2005). A *L. chagasi* é considerada geneticamente idêntica à *L. infantum*, que causa, na Europa, quadro clínico e resposta imunológica semelhantes aos descritos em canídeos no Brasil (Maurício et al., 1999).

O cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) é considerado reservatório silvestre da LV no Brasil, onde a infecção é transmitida para os hospedeiros ou reservatórios naturais através da picada *Lutzomyia longipalpis* ou *L. cruzi* (Courtenay et al., 1996; Brasil, 2005). Estudos recentes confirmaram também a presença da *Leishmania* sp. em lobo-guará - *C. brachyurus* (Luppi et al., 2008; Jusi et al., 2011) e cachorro-vinagre - *Speothos venaticus* (Luppi et al., 2008; Lima et al., 2009; Souza et al., 2010; De Almeida et al., 2011) mantidos em conservação *ex situ*. Ambas as espécies encontram-se em risco de extinção (Ibama, 2003; Iucn, 2011).

Existe dificuldade na padronização dos testes sorológicos para as diversas espécies de canídeos selvagens, devido à falta de conjugados específicos. A utilização de conjugados à base de imunoglobulinas anti-IgG de cão doméstico ligadas a enzimas como a peroxidase é descrita para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em *C. thous* (Courtenay et al., 2002), *S. venaticus* (Jusi et al., 2011), *Vulpes vulpes* (Mancianti, Mignone e Galestri, 1994) e *C. brachyurus* (Curi, Miranda e Talamoni, 2006) em ensaios imunoenzimáticos. Tal utilização baseia-se na propriedade de ligação cruzada, devido à semelhança genética entre indivíduos pertencentes à mesma família, tais como aqueles da família *Canidae*, cujas imunoglobulinas apresentam epitopos comuns entre si (Zrzavy & Ricancova, 2004).

Conjugados à base de proteína A ligada à enzima representam outra alternativa no desenvolvimento de testes sorológicos para animais silvestres, como o cachorro-vinagre (*S. venaticus*) (Lima et al., 2005). A proteína A é um conjugado polivalente, obtido a partir da bactéria *Staphylococcus aureus* que, no ELISA, se liga inespecificamente às diferentes classes de imunoglobulinas (Igs) reativas ao antígeno de *Leishmania* sp., adsorvido na fase sólida (Solano-Gallego et al., 2003; Lima et al., 2005). Esta proteína possui uma boa afinidade com as imunoglobulinas G (IgGs) de diferentes espécies de mamíferos silvestres e exóticos (Kelly et al, 1993; Stöbel, Schönberg & Staak, 2002; Lima et al, 2005), reagindo com menor afinidade com as IgGs de aves e répteis (Kelly et et al., 1993).

O presente estudo teve como objetivo comparar diferentes metodologias de ELISA para diagnóstico sorológico de infecção por *Leishmania* sp. diferentes espécies de canídeos cativos no Brasil. Foram comparadas as reatividades produzidas pelos conjugados à base de anticorpo anti-IgG de cão doméstico (Sigma) e Proteína A (Zymed), marcados com a peroxidase no teste ELISA indireto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e aspectos éticos e legais

Foram estudados 10 canídeos silvestres, sendo sete lobos-guará (*C. brachyurus*) e três raposas-do-campo (*L. vetulus*), pertencentes ao plantel da Fundação Zoobotânica (FZB) em Belo Horizonte (BH), Minas Gerais (MG), Brasil, situado em área endêmica para a LV, onde houve o relato de ocorrência de infecção por *Leishmania* associada à sintomatologia clínica com óbito de dois animais (Luppi et al., 2008). Foram incluídos no estudo dois cachorros-do-

mato (*C. thous*) em conservação *ex situ* no Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (PZGV), Salvador, Bahia (BA), Brasil, considerada área não-endêmica, sem histórico de ocorrência da LV nessa instituição. Todos os animais são mantidos em recintos de acordo com as Instruções Normativas nº 04, 2002 e 169/2008 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que definem o tipo de substrato e abrigo para cada espécie da Família *Canidae* e as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em território brasileiro respectivamente. No geral, todos os animais recebem uma dieta onívora conforme a espécie e os recintos são compostos por pisos com gramas, presença de árvores e alguns arbustos.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados pelos médicos veterinários dos zoológicos, respeitando aspectos éticos e legais, presentes no Artigo 32, da Lei Federal nº 9.605 de 1998 (Lei de Crimes Ambientais, Brasil) e na Instrução Normativa nº 154, de 01 de Março de 2007, IBAMA). Este trabalho também está de acordo com o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO – nº 22473-1).

2.2. Exame clínico e amostras biológicas

Todos os canídeos foram clinicamente examinados para a presença, frequência e intensidade de sinais clínicos associados a LV, tais como lesões na pele e mucosas, mudanças na cor das mucosas, presença de onicogribose, alterações oculares e conjuntivais, presença de descargas anormais, perda de peso, alterações na atitude mental e disposição geral, presença de esplenomegalia e linfadenomegalia, sangramentos, bem como a história e os sinais clínicos de outras patologias, antes de serem submetidos à coleta de sangue. As amostras de sangue periférico foram obtidas com seringas e agulhas descartáveis, da veia cefálica ou jugular, mantidas em tubos com e sem anticoagulante (EDTA) em recipiente com gelo, até

processamento em laboratório para separação de plasma ou soro respectivamente, sendo estes mantidos em freezer a -20°C.

Um dos *C. brachyurus* (indivíduo 1) estudados apresentava resultado positivo prévio em PCR para infecção por *Leishmania* sp. e já manifestara quadro clínico compatível com leishmaniose visceral, sendo suas amostras de soro e plasma utilizadas como positivas de referência para a padronização dos testes ELISA.

2.3. Histórico clínico dos canídeos silvestres cativos na FZB-BH.

2.3.1 IFI para detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* sp. no soro de canídeos silvestres.

Os soros de dez canídeos silvestres (sete *C. brachyurus* e três *L. vetulus*) cativos na FZB-BH haviam sido avaliados quanto à detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* sp. na técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) de acordo com o descrito por Curi et al (2006) no ano de 2006.

2.3.2 PCR para detecção específica de material nucleico de DNA de *Leishmania* sp. em amostras clínicas de canídeos silvestres.

Dez canídeos silvestres (sete *C. brachyurus* e três *L. vetulus*) cativos na FZB-BH haviam sido submetidos ao diagnóstico da presença de *Leishmania* em aspirados de medula óssea, sendo realizada a obtenção das amostras biológicas, extração do DNA e a técnica de PCR de acordo com o descrito por Luppi et al (2008). Para esta reação foram utilizados os primers minicírculos kDNA (CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG e

CCACCTGGCCTATTTTACACCA), que são específicos para detectar o complexo donovani (Lachaud et al., 2002).

2.5. Padronização do teste ELISA

2.5.1. Antígeno

As formas promastigotas de *Leishmania chagasi* foram isoladas de cães doentes e caracterizadas por eletroforese de isoenzimas (Biomanguinhos – FIOCRUZ – IOC, Brasil, LTCC - *Leishmania Typing Culture Collection* - WDCM731). A amostra foi cultivada em meio Schneider (Sigma Chemical Co) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Para a obtenção do lisado total antigênico (LTA), culturas do parasito foram sonicadas a 10 ciclos, de um minuto cada, em aparelho de Ultra-som, centrifugadas a 10.000 x g, a 4°C por 10 minutos, sendo o sobrenadante separado e dialisado três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril pH 7.4. Após a dosagem de proteínas, o antígeno foi aliquotado e armazenado a -20 °C.

2.5.2. ELISA indireto com soros-padrão de cães domésticos

O ensaio de ELISA padronizado para cães domésticos e utilizado como referência neste estudo, foi realizado de acordo com a técnica descrita previamente (Paranhos-Silva et al., 1996), com algumas modificações. Para os procedimentos iniciais de titulação em bloco, soros de 20 cães naturalmente infectados e positivos para anticorpos anti-*Leishmania*, assim como de 20 cães saudáveis, não infectados e de região não-endêmica, foram utilizados como soros-padrão. Microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com antígeno de *Leishmania*, nas concentrações de 1,5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e

10,0µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05 M, pH 9,6. Após 12 horas de incubação a 4° C, as placas foram lavadas com PBS, pH 7.4. O bloqueio foi feito com 200 µL/poço de PBS, contendo 0,05% de *Tween* 20 (PBS-T) e 5% de leite em pó desnatado, por 1h à temperatura ambiente (22° C), seguido de quatro lavagens com água destilada. Em seguida, foram adicionadas as amostras de soros em 100 µL/poço diluídos a 1:125; 1:250; 1:500; 1:1.000 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS pH 7.4. Foram em seguida adicionados 100 µL/poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sigma, USA), diluída a 1:6.250; 1:12.500; 1:25.000; 1:50.000 em PBS-T com 0,05% de leite em pó desnatado. Após incubação por 1 hora à temperatura ambiente, foram feitas quatro lavagens. A revelação foi feita com 100 µL/poço de solução contendo peróxido de hidrogênio a 0,03% e orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma, USA) em tampão em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico - C₆H₈O₇ a 0.1 M; fosfato de sódio – NaH₂PO₄ a 0.2 M) pH 5.1, em ambiente escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 25 µL de ácido sulfúrico 4 N por poço e a placa lida imediatamente em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

2.5.3. ELISA indireto com soros-teste dos canídeos silvestres.

As amostras de soro ou plasma, na diluição de 1:500, dos doze canídeos silvestres foram testadas com o conjugado anti-IgG de cão com peroxidase (Sigma, USA) na diluição de 1:25.000 de acordo com o ELISA indireto padronizado para cães domésticos descrito no item 2.5.2. As diluições da proteína A (Zymed, USA) d1 (1:8.000) e d2 (1:16.000) foram utilizadas conforme as recomendações do fabricante. Um pool de soros de cães domésticos de área endêmica sintomáticos para a LVA, com diagnósticos sorológicos e parasitológicos

positivos para a infecção foi utilizado como controle-positivo. O controle-negativo foi definido como um pool de soros de cães domésticos, sem sinais clínicos da doença, de uma região sem casos autóctones para a LVA, com diagnósticos sorológico, parasitológico e/ou molecular negativos para doença.

2.5.4. Titulação em bloco com soros dos *C. brachyurus*, indivíduos 5 (positivo referência) e 6 (negativo referência), e conjugado imunoglobulina anti-IgG de cão com peroxidase.

Verificada a sorologia das 12 amostras de soro dos canídeos silvestres no ELISA indireto descrito no item 2.5.3, dois soros de *C. brachyurus*, um controle positivo (PCR positivo) e um controle negativo (PCR negativo), foram submetidos ao ensaio de ELISA indireto previamente padronizado para cães domésticos com intuito de verificar qual seria a melhor diluição do soro e conjugado para o melhor discernimento entre animais soropositivos e soronegativos. Neste ensaio, foram utilizados como controles positivos e negativos, os mesmos citados anteriormente no item 2.3.3. A microplaca de 96 poços foi sensibilizada durante a noite a 4°C com 100 µL/poço de antígeno LTA na concentração de 5,0 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05 M, pH 9,6, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05 M, pH 9,6. Para o bloqueio da placa, foram utilizados 200 µL/poço de PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) com 5% de leite em pó desnatado, incubada por 1h à temperatura ambiente, seguida de quatro lavagens com PBS pH 7,4. Foram incubados 100 µL/ poço de soro do indivíduo 1 e 6 nas diluições a 1:125; 1:250; 1:500; 1:1.000 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado durante 1h à temperatura ambiente. Após quatro lavagens, 100 µL de imunoglobulina de coelho anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sigma, USA), diluídos a 1:6.250; 1:12.500; 1:25.000; 1:50.000, em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, foram acrescentados e incubados durante 1h à temperatura ambiente. A placa foi

lavada, sendo realizada a revelação com peróxido de hidrogênio (0,03%) e orto-fenilenediamina (OPD) em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico - $C_6H_8O_7$ a 0.1 M; fosfato de sódio - NaH_2PO_4 a 0.2 M) pH 5.1. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico 4 N por poço e a placa lida imediatamente em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

2.5.5. Titulação em bloco com soros dos *C. brachyurus*, indivíduos 5 (positivo referência) e 6 (negativo referência), e conjugado Proteína A com peroxidase.

Com as mesmas condições de sensibilização da placa e controles positivos e negativos da titulação em bloco em ELISA descrita no item 2.5.4, foi realizado um ensaio com a substituição da imunoglobulina anti-IgG de cão doméstico por Proteína-A conjugada à peroxidase, conforme descrito previamente (Lima et al., 2005; Silva et al., 2005; Fattori & Lima, 2007), com algumas modificações com o mesmo objetivo do item 2.5.4. Amostras de soro dos indivíduos 1 e 5 nas diluições a 1:125; 1:250; 1:500; 1:1.000 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado em um volume de 100 μ L/ poço foram incubados durante 1h à temperatura ambiente após a etapa de bloqueio de reações inespecíficas e lavagens. Em seguida, 100 μ L de proteína A conjugada à peroxidase (Zymed Laboratories Inc- USA) nas diluições 1:8.000, 1:16.000, 1:32.000 e 1:64.000, em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, foram acrescentados e incubados durante 1h à temperatura ambiente. A placa foi lavada e a revelação feita com peróxido de hidrogênio (0,03%) e OPD em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico - $C_6H_8O_7$ a 0.1 M; fosfato de sódio - NaH_2PO_4 a 0.2 M) pH 5.1. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico 4 N por poço e a placa lida imediatamente em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

2.6. Técnica de Western-Blotting para detecção de bandas antigênicas identificadas por anticorpos anti-*Leishmania* sp.

A técnica de Western-Blotting foi realizado de acordo com o teste padronizado por Oliveira et al., (2005) com algumas modificações. O antígeno solúvel de *Leishmania* sp descrito no ítem 2.5.1 foi separado por um sistema SDS-PAGE descontínuo em gel de poliacrilamida (gel de empilhamento: 4%; gel de corrida: 12,5%) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi bloqueada em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado. Então, na etapa seguinte as amostras de soro dos canídeos silvestres, foram diluídas a 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado, sendo incubadas durante 1 h a 37° C. Após cinco lavagens com PBS-T 0,05%, foi adicionado o conjugado anti-IgG de cão com peroxidase produzido em ovelha (Bethyl Laboratories, Inc.) numa diluição de 1:250 em PBS-T e incubado por 1 hora a 37° C. Após cinco lavagens adicionais, a revelação foi feita com o cromógeno 4-cloro-a-Naftol a 0,3% diluído em 1:5 em PBS e 10 ml de água oxigenada. A reação foi então interrompida com a adição de água destilada.

2.5. Análise estatística.

O Microsoft Office Excel foi o aplicativo utilizado para a construção do banco de dados (Identificação dos animais, características clínicas, resultados dos exames laboratoriais e histórico clínico) e cálculo das médias e desvio padrão das DOs produzidas nos ensaios imunoenzimáticos. O ponto de corte foi calculado pelo método de Frey et al (1998), correspondendo a média do controle negativo mais três vezes o desvio padrão.

O software SPSS Statitics v.18.0 (IBM®) foi usado para calcular o coeficiente de correlação de Spearman entre as DOs produzidas nos três ensaios sorológicos. O valor de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A repetitividade (RP) foi calculada testando os controles positivo e negativo de lobo-guará 40 vezes cada, nos ensaios com ambos os conjugados no mesmo dia sob as mesmas condições, e foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $RP = (1 - CV) \times 100$, sendo CV correspondente a coeficiente de variação.

Foi determinada a melhor diluição dos soros-controles e dos conjugados testados na padronização dos ELISAs descrita nos itens 2.5.4 e 2.5.5. Para isso foram considerados os valores das DOs dos brancos obtidas em cada ensaio e melhor razão entre os controles positivo e negativo.

A concordância entre os testes sorológicos e a reprodutibilidade da leitura do teste ELISA foi determinada pelo índice de Kappa e interpretada de acordo com Shrout (1998), considerando $k < 0,1$, ausente; $k = 0,10$ a $0,40$, fraca; $k = 0,41$ a $0,60$, discreta; $k = 0,61$ a $0,80$, moderada; e $k = 0,81$ a $1,00$, substancial.

3. RESULTADOS

No presente estudo, houve a constatação de sintomatologia clínica possivelmente relacionada à LV em 50% (6/12) dos canídeos silvestres avaliados por meio de exame físico. Através da técnica de palpação direta, evidências de esplenomegalia foram verificadas em 57,1% (4/7)

dos lobos-guará (*C. brachyurus*). No mesmo grupo de animais, 50% (2/4) também apresentaram linfadenomegalia dos linfonodos pré-escapulares. Ainda foi constatada uma raposinha (*L. vetulus*) com dermatite em fase de resolução e ferimentos nos membros posteriores, bem como outro indivíduo da mesma espécie com secreção purulenta vulvar, mas ambos não apresentavam histórico de infecção por *Leishmania* sp. e se mostraram soronegativos no teste ELISA (Tabela 01).

As condições ótimas padronizadas no ELISA com amostras de soro de cães domésticos foram: concentração de antígeno de 5µg/mL, diluição dos soros a 1:500 e do conjugado anti-IgG de cão com peroxidase a 1: 25.000. A titulação em bloco realizada com os soros de *C. brachyurus* e conjugado anti-IgG de cão com peroxidase definiram como condições ótimas a diluição de 1:25.000 e 1:500 do conjugado e soro, respectivamente, apresentando uma razão de 19,29 entre as DOs dos controles positivo e negativo, com o valor da DO do branco de 0,066. A titulação em bloco com a utilização Proteína A com peroxidase como conjugado definiram como condições ótimas a diluição de 1:500 do soro e 1:16.000 do conjugado apresentando uma razão de 8,06 entre as DOs dos controles positivo e negativo, com o valor da DO do branco de 0,049.

No teste ELISA indireto que avaliou os 12 canídeos silvestres, quatro lobos-guará (*C. brachyurus*) foram positivos com o uso dos conjugados anti-IgG de cão (DO do ponto de corte = 0,180) (Gráfico 1), já a proteína Ad1 (DO do ponto de corte = 0,368) e a proteína Ad2 (DO do ponto de corte = 0,263) detectaram somente três lobos-guará positivos (Gráficos 2 e 3). Curiosamente, um lobo-guará da FZB-BH soropositivo, que apresentou uma leitura de DO discretamente acima do ponto de corte no ensaio com o anti-IgG de cão (DO = 0,300, ponto de corte = 0,180), também apresentou valores sorológicos limítrofes nos diferentes testes que

utilizaram a proteína Ad1 (DO = 0,416: ponto de corte = 0,368) e proteína Ad2 (DO = 0,298: ponto de corte = 0,293). Os ELISAs com ambos os conjugados apresentaram correlações positivas entre si (Tabela 2) sendo capaz de diferenciar os animais positivos dos negativos.

Um lobo-guará (animal 5), da FZB-BH, com o histórico de positividade nos exames moleculares (PCR) e sorológicos (IFI), apresentou-se soropositivo no presente estudo, em ambos os ELISAs, com anti-IgG de cão doméstico e proteína A. Esse animal também apresentou esplenomegalia e linfadenomegalia. Em contraposição, uma raposa (animal 08), também com o histórico anterior de positividade para a *Leishmania* sp. por PCR, apresentou-se soronegativa no ELISA com ambos os conjugados. O exame sorológico não detectou a presença de anticorpos relacionados à *Leishmania* sp. nos dois cachorros-do-mato (*C. thous*) do PZGV-BA.

As densidades ópticas (DO) médias das amostras de soro ou plasma de todos os canídeos silvestres foram maiores quando o conjugado utilizado foi a proteína A (DO média = 0,546) em comparação com o anticorpo anti-IgG de cão (D.O média = 0,251). Os valores das DOs dos animais positivos e negativos variaram entre 0,899-0,300 (Média = 0,531; desv-padr = 0,307) e 0,153-0,087 (Média = 0,110; desv-padr = 0,040) com o valor da média das DOs do branco de 0,045 no teste com o anti-IgG de cão diluído em 1:25.000 (Gráfico 1), 3,183-2,286 (Média = 1,961; desv-padr = 0,634) e 0,278-0,071 (Média = 0,126; desv-padr = 0,108) com o valor da média das DOs do branco de 0,039 com a Proteína Ad1 (Gráfico 2) e 2,359-1,769 (Média = 1,475; desv-padr = 0,417) e 0,182-0,066 (Média = 0,095; Desv-padr= 0,072) com o valor da média das DOs do branco de 0,042 no teste que utilizou a Proteína Ad2 (Gráfico 3). A média das DOs das amostras negativas foi 4,8 vezes mais baixa do que a média das DOs

das amostras positivas no ensaio com o conjugado anti-IgG de cão e 15,5 vezes mais baixa nos testes com a Proteína A independente das diluições realizadas.

Os soros controle de lobos-guará selecionados foram validados, uma vez que foram constatadas repetitividades altas tanto para o controle positivo quanto para o controle negativo nos diferentes testes de ELISA indireto com ambos os conjugados (Tabela 3).

O teste de Western blotting evidenciou a detecção de 22 bandas por soros de três lobos-guará soropositivos nos testes de ELISA, com destaque para bandas de peso molecular 19, 22, 24, 45 e 66 kDa, presentes em todos os animais com soropositividade nos ELISAs (Tabela 4). Nenhuma banda foi detectada pelas amostras de soro dos animais soronegativos (Figura 01).

O teste ELISA indireto com a Proteína A apresentou alta concordância com os resultados do WB (Kappa = 1 - $p < 0,001$), enquanto o teste com o conjugado anti-IgG de cão apresentou uma concordância moderada (Kappa = 0,8 – $p < 0,0015$).

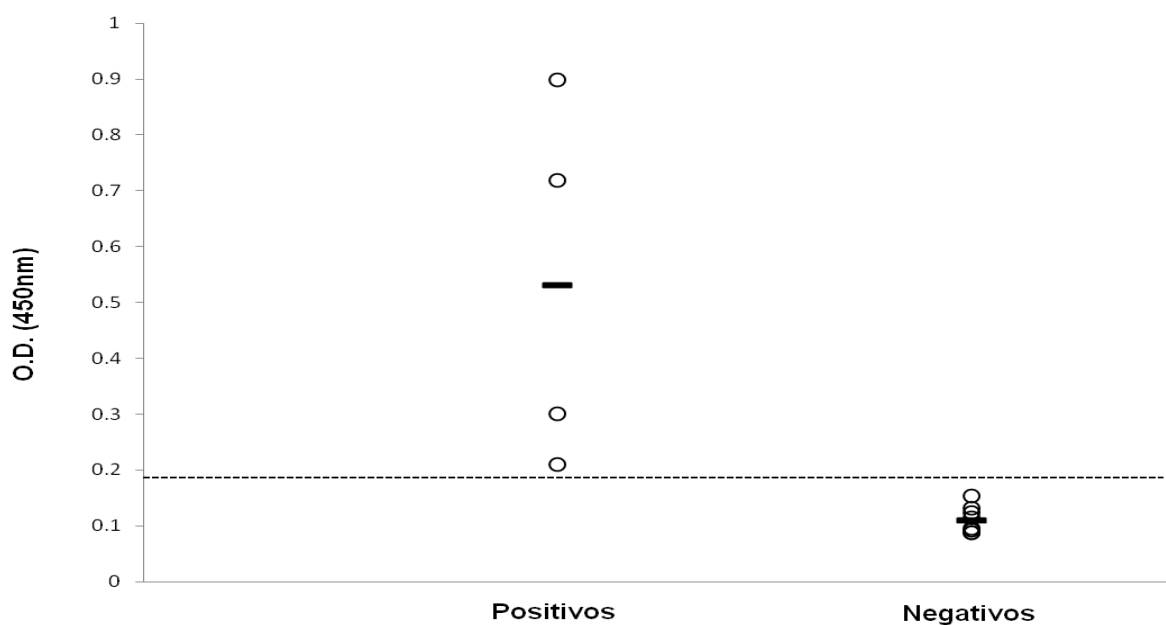
Tabela 1. Resultados da avaliação clínica e sorológica para o diagnóstico de LV em 12 canídeos silvestres cativos.

Identificação	Espécie	Sinais Clínicos	ELISA (Anti-IgG de cão)	ELISA (Proteína A)	Bandas reconhecidas no WB	* Histórico
01	<i>C. brachyurus</i>	Linadenomegalia (linfonodo cervical) e otite crônica	Positivo	Positivo	212, 66 , 54, 49, 45 , 32, 24 , 23, 22 , 19 , 18, 17	Negativo na IFI e PCR
02	<i>C. brachyurus</i>	Aparentemente saudável	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo na IFI e PCR
03	<i>C. brachyurus</i>	Aparentemente saudável	Positivo	Positivo	66 , 45 , 38, 24 , 22 , 19	Negativo na IFI e PCR
04	<i>C. brachyurus</i>	Esplenomegalia	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo para na IFI e PCR
05	<i>C. brachyurus</i>	Esplenomegalia e linfadenomegalia (linfonodo cervical)	Positivo	Positivo	212, 103, 94, 85, 68, 66 , 45 , 32, 24 , 23, 22 , 19	Positivo na IFI, PCR e microscopia direta de raspado de pele
06	<i>C. brachyurus</i>	Aparentemente saudável	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo para na IFI e PCR
07	<i>C. brachyurus</i>	Esplenomegalia	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo na IFI e PCR
08	<i>L. vetulus</i>	Linfadenomegalia (linfonodo poplíteo)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo na IFI e PCR
09	<i>L. vetulus</i>	Animal em recuperação de Dermatite	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo na IFI e PCR
10	<i>L. vetulus</i>	Secreção vulvar purulenta	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo na IFI e PCR
11	<i>C. thous</i>	Aparentemente saudável	Negativo	Negativo	Negativo	Animal cativo de área não endêmica
12	<i>C. thous</i>	Aparentemente saudável	Negativo	Negativo	Negativo	Animal cativo de área não endêmica

* Os dados do histórico clínico de todos os animais foram obtidos através de fichas clínicas do arquivo morto da FZB-BH e PZGV-BA cedidas gentilmente pelas Instituições colaboradoras. (dados não publicados).

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Spearman entre os ELISAs realizados com diferentes conjugados.

Ensaio do ELISA	Medida estatística	Ensaio do ELISA		
		Anti-IgG de cão	Proteína Ad1	Proteína Ad2
Anti-IgG de cão	Coeficiente de correlação	1,000	0,792**	0,869**
	<i>p</i>	.	0,002	0,0001
	N	12	12	12
Proteína Ad1	Coeficiente de correlação	0,792**	1,000	0,977**
	<i>p</i>	0,002	.	0,0001
	N	12	12	12
Proteína Ad2	Coeficiente de correlação	0,869**	0,977**	1,000
	<i>p</i>	0,0001	0,0001	.
	N	12	12	12

**Gráfico 1.** Distribuição dos resultados individuais dos soros de canídeos silvestres submetidos a ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, usando o conjugado anti-IgG de cão com peroxidase. Cada círculo representa o resultado de um animal testado, e as barras a média de cada grupo, positivo ou negativo. A linha tracejada indica o cut-off calculado, usando o método de Frey et al (1998).

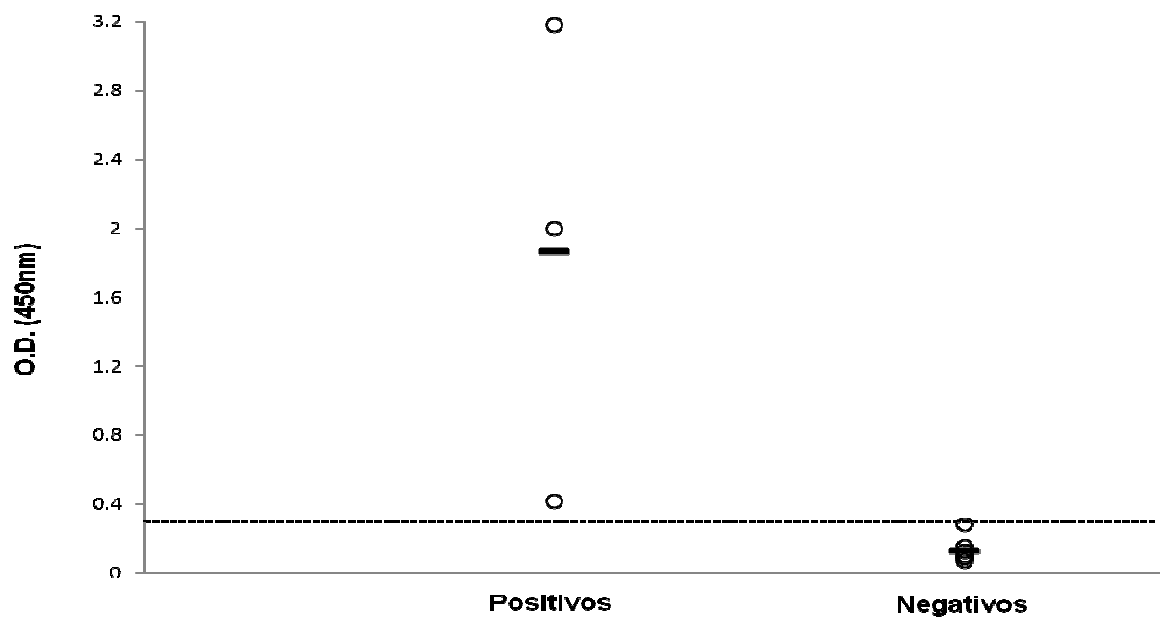


Gráfico 2. Distribuição dos resultados individuais dos soros de canídeos silvestres submetidos a ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, usando o conjugado Proteína A com peroxidase (1:8.000). Cada círculo representa o resultado de um animal testado, e as barras a média de cada grupo, positivo ou negativo. A linha tracejada indica o cut-off calculado, usando o método de Frey et al (1998).

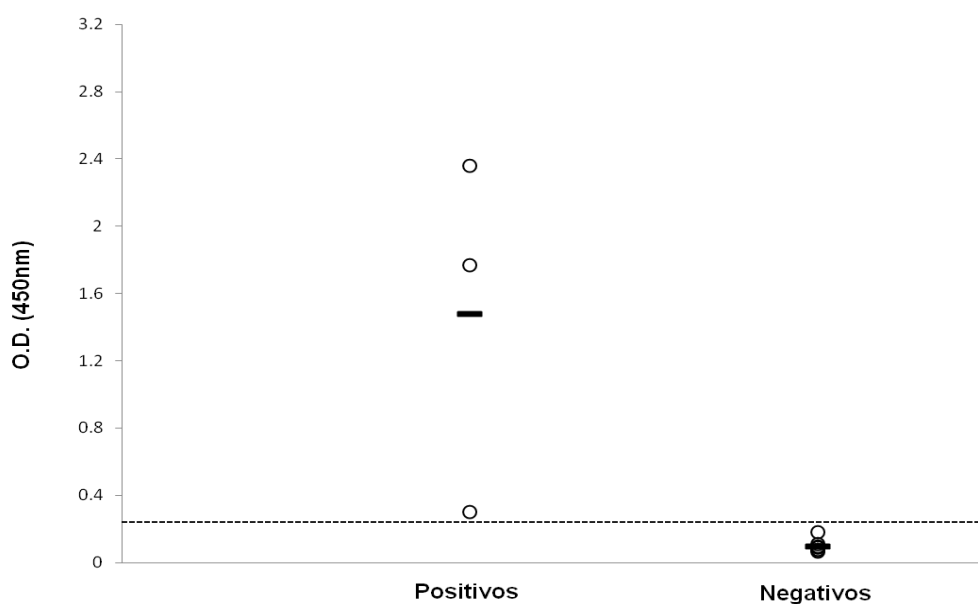


Gráfico 3. Distribuição dos resultados individuais dos soros de canídeos silvestres submetidos a ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, usando o conjugado Proteína A com peroxidase (1:16.000). Cada círculo representa o resultado de um animal testado, e as barras a média de cada grupo, positivo ou negativo. A linha tracejada indica o cut-off calculado, usando o método de Frey et al (1998).

Tabela 3. Parâmetros de densidade optica encontrados nos diferentes ELISAs para detecção de anticorpos específicos anti-Leishmania em canídeos silvestres. Foram utilizados soros de animais previamente positivos no PCR e IFI para confecção de pool positivo, e soros de animais de região não endêmica, e resultados sorológicos prévios negativos, para confecção de pool negativo.

Soros controles	Conjugado anti-IgG de cão			Proteína A 1:8.000			Proteína A 1:16.000		
	Média das DOs	Repetitividade %	Razão (Pos/Neg)	Média das DOs	Repetitividade %	Razão (Pos/Neg)	Média das DOs	Repetitividade %	Razão (Pos/Neg)
Lobo-guará +	0,801	92,171	9,137	0,777	92,156	14,292	0,711	92,422	10,549
Lobo-guará -	0,088	91,351		0,054	91,944		0,067	87,006	

Tabela 4. Resultado em ensaio de Western-Blot para a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em canídeos silvestres, São mostradas os pesos moleculares dos antígenos reconhecidos quando amostras de cada animal foram testadas. São relacionadas apenas as amostras com resultados positivos.

Peso Molecular das Bandas (kDa)	* Controle			
	positivo	Indivíduo 0 1	Indivíduo 03	Indivíduo 05
212	X	X		X
170	X			X
143	X			
124	X			
111	X			
103	X	X		
94	X	X		
85		X		
68		X		
66	X	X	X	X
54				X
49	X			X
45	X	X	X	X
38	X		X	
32	X	X		X
28	X			
24	X	X	X	X
23	X	X		X
22	X	X	X	X
19	X	X	X	X
18	X			X
17				X

*Foi utilizado um pool formado por três amostras de soro de lobos-guará positivos no ELISA.

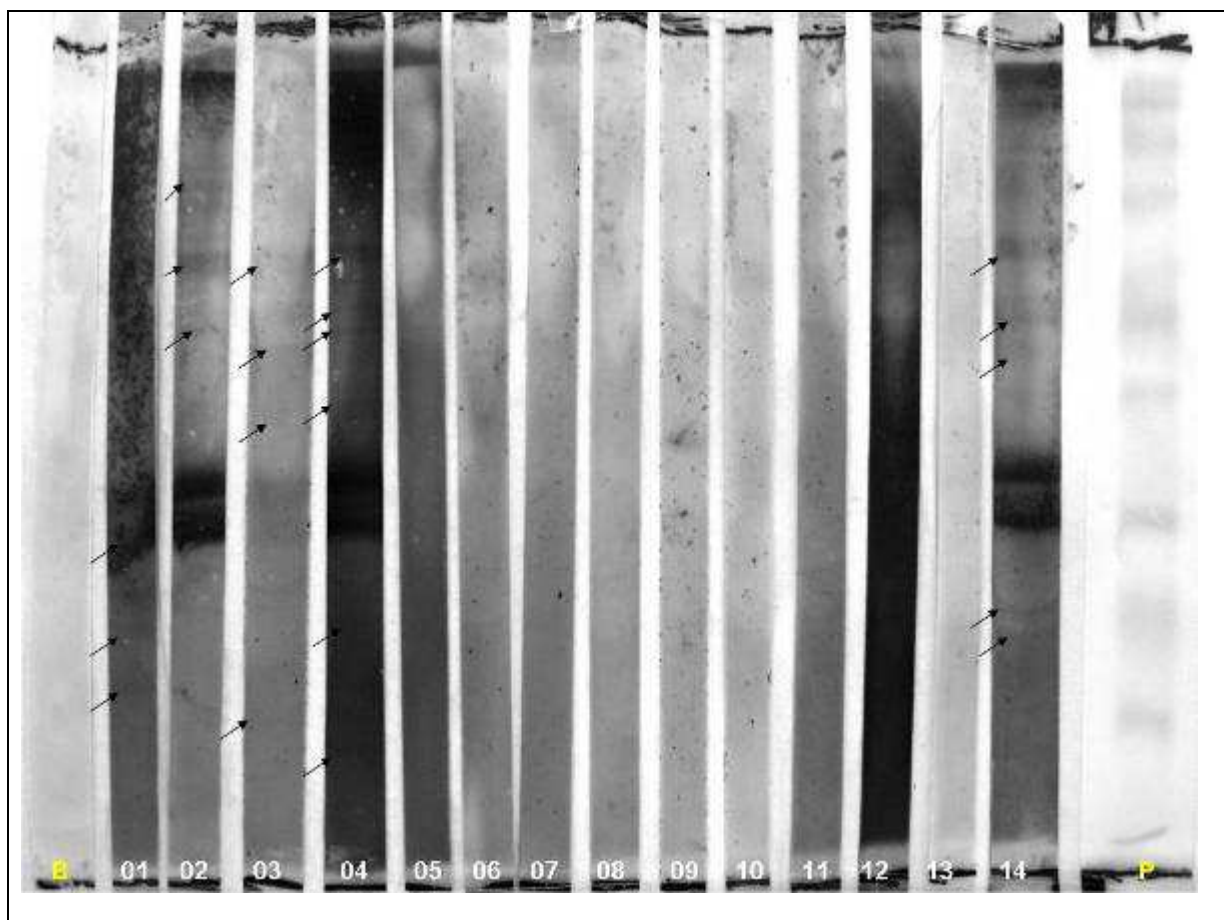


Fig. 1. Western-Blot realizado para detecção da reatividade dos anticorpos específicos anti-*Leishmania* nos soros de canídeos silvestres cativos. **B** = branco; **01 e 14** = Pool positivo; **02** = indivíduo 05; **03** = ind. 03; **04** = ind. 01; **07** = indivíduo soropositivo somente no ELISA com anti-IgG de cão. **05, 06, 08 até 13** = indivíduos soronegativos no ELISA; **setas** = algumas bandas detectadas.

4. DISCUSSÃO

Mesmo com a constatação de esplenomegalia e linfadenomegalia em metade dos lobos-guará examinados, os sinais clínicos verificados são inespecíficos, sendo necessária uma avaliação clínica cautelosa para o diagnóstico da LVC, já que esses sinais podem ocorrer em outras enfermidades de canídeos, tais como a babesiose, esta já relatada em lobos-guará (Ruas et al., 2003). Muitos trabalhos científicos descrevem os canídeos selvagens como reservatórios da doença e assintomáticos, resistentes à infecção (Mancianti, Mignone e Galestri, 1994; Sherlock, 1996; Silva et al., 2000; Gomes et al., 2007; Curi, Miranda e Talamoni, 2006; Dipineto, et al., 2007). Entretanto, dados mais recentes demonstram a presença da forma clínica da LVC, tanto em canídeos de vida livre (Courtenay et al., 2002) quanto naqueles em conservação *ex situ* (Luppi, et al., 2008; Jusi et al., 2011; Tenório et al., 2011).

Os testes de ELISA indireto padronizados com conjugados Proteína A com peroxidase e anti-IgG de cão com peroxidase foram capazes de detectar três e quatro animais soropositivos respectivamente, apresentando uma excelente ($Kappa = 1 - p < 0,001$) ou moderada ($Kappa = 0,8 - p < 0,0015$). concordância com o WB. Quando o conjugado utilizado foi o anticorpo anti-IgG de cão, a capacidade de discernimento entre as amostras negativas e positivas foi de 4,8 vezes. Nos ensaios com a Proteína A d1 e d2, nas condições padronizadas no presente estudo, a capacidade de discernimento entre os soros negativos e positivos foi maior, sendo de 15,5 vezes.

As densidades ópticas (D.O.) médias das amostras de soro de todos os canídeos silvestres foram maiores quando utilizada a proteína A (D.O média = 0,546) em comparação com o

anticorpo anti-IgG de cão (D.O média = 0,251). A maior reatividade da proteína A no ELISA indireto pode ser explicada por sua alta afinidade pela fração IgG presente no soro, responsável pela resposta específica ao antígeno (Lima et al., 2005). Além disso, a Proteína A pode reagir tanto com as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, se ligando à cadeia pesada (Fc) do anticorpo, quanto com IgM e IgA caninas (Goudswaard et al., 1978; Lima et al., 2005). Dessa forma, animais na fase aguda da infecção, ainda não detectáveis quando o ensaio é baseado no uso de anti-IgG, podem ser identificados no ensaio padronizado com a Proteína A, que ainda detecta maiores quantidades de moléculas de IgGs.

O conjugado anti-IgG de cão atua sobre a cadeia pesada do anticorpo a qual pode apresentar variações de sequência aminoacídica em diferentes espécies, ou mesmo em diferentes isotipos de uma mesma espécie (Silva et al., 2005a). O conjugado anti-IgG de cão é citado na padronização de testes sorológicos em diversas espécies de canídeos selvagens nativas (Courtenay et al., 2002; Curi, Miranda e Talamoni, 2006; Luppi et al., 2008) ou exóticas (Mancianti, Mignone & Galestri, 1994). Em um estudo semelhante, na investigação de reatividade sorológica no teste ELISA anti-*Toxoplasma gondii* com amostras de soros de lobos-guará, os resultados com diferentes conjugados enzimáticos, tais como a Proteína A, conjugado anti-IgG de cão e conjugado anti-IgG de lobo-guará foram equivalentes (Silva et al., 2005a). Estudos como esses são necessários para avaliar a eficácia de testes sorológicos utilizando a Proteína A como conjugado na detecção de anti-*Leishmania* sp. em canídeos silvestres.

Um lobo-guará (animal 7) foi positivo apenas no ELISA com o conjugado anti-IgG de cão, sendo soronegativo nos testes com Proteína A e WB. No exame clínico foram constatadas esplenomegalia e linfadenomegalia sob palpação direta, porém havia o histórico de

negatividade na PCR e IFI para este animal. Portanto, este resultado pode estar associado a uma reação cruzada considerando a maior especificidade do WB frente ao ELISA. Existem relatos de reações cruzadas entre *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* com a utilização de conjugados homólogos (Luciano et al., 2009), sendo de grande importância a determinação da especificidade dos ensaios sorológicos empregados. Entretanto, essa possibilidade não foi confirmada em pelo menos um estudo em que foram testados soros de cães domésticos positivos para a *Leishmania* sp. no ELISA indireto com a Proteína A, o qual não apresentou reação cruzada para outros agentes de doenças, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *T.gondii*, *Dirofilaria immitis* (Lima et al., 2005).

A soronegatividade da raposa-do-campo (*L. vetulus*) com histórico de positividade na PCR (medula óssea) e IFI, no presente estudo com ELISAs padronizados com os diferentes conjugados, pode indicar que essa espécie pode não apresentar uma resposta humoral expressiva durante uma infecção antiga pela *Leishmania*. Esse aspecto deve ser estudado e compreendido, uma vez que em cães domésticos, a resposta imune celular predominante sobre a resposta humoral é associada ao perfil de resistência e baixa transmissibilidade da infecção (Pinelli et al., 1994, Travi et al., 2001). Se o animal 08 (*L. vetulus*) apresenta um perfil de resistência imunológica, na qual a resposta celular mediada por linfócitos T combate o crescimento da *Leishmania* sp, com níveis baixos de IgGs anti-*Leishmania*, seu papel como reservatório da doença deve ser bem situado, principalmente no âmbito de saúde pública. Outro aspecto que deve ser bem definido é a adequação desses conjugados à espécie, para que não haja subdiagnóstico em decorrência de um conjugado de baixa afinidade pela molécula de imunoglobulina da *L. vetulus* utilizado no soroteste. Estudos com um número maior de animais buscando avaliar essa hipótese devem ser realizados.

Os dois cachorros-do-mato (*C. thous*), presentes em área não endêmica para a LV, apresentaram-se negativos ao ELISA indireto com ambos os conjugados, assim como no teste WB. Mesmo sendo comum o achado de canídeos parasitados pela *Leishmania* sp. (Silva et al., 2000; Gomes et al., 2002; Luppi et al., 2008; Lima et al., 2009; Souza et al., 2010), dentre estes o *C. thous* (Courtenay et al., 1996), um estudo aponta que esta espécie, comparada aos cães domésticos, tem um papel irrelevante como reservatório da doença na Ilha de Marajó, Pará, Brasil (Courtenay et al., 2002).

Nos ensaios de WB foram detectadas cinco bandas (66 kDa, 45 kDa, 24 kDa, 22 kDa, 19 kDa) comuns aos três animais soropositivos no ELISA. Entretanto, as bandas de 212 kDa, 32 kDa e 23 kDa foram constatadas apenas nos animais com soropositividade mais intensa, tais como os indivíduos 01 e 05. A banda de 32 kDa já foi descrita em ensaios com soros de cães domésticos infectados com a *L. chagasi* (Mancianti, Pedonesi & Poli, 1996; Oliveira et al., 2005; Silva et al., 2005b), inclusive antes da soroconversão de animais com parasitismo tecidual comprovado (Silva et al., 2005b). Todas as bandas detectadas pelo soro do lobo-guará nº 05, comprovadamente infectado, devem ser avaliadas com maior acurácia em um estudo mais detalhado, com um número maior de animais naturalmente parasitados e diferentes perfis clínicos.

A morte de dois canídeos silvestres na FZB-BH, um cão-vinagre (*S. venaticus*) e uma raposa-docampo (*L. vetulus*), descrita por Luppi e colaboradores (2008), assim como soropositividade de mais três lobos-guará confirmada pelo teste WB desenvolvido no presente estudo, demonstram a importância da continuidade dos estudos e o estabelecimento de estratégias de prevenção e controle da LV para as espécies silvestres de área endêmica em conservação *ex situ*.

Com a comprovação da susceptibilidade de canídeos silvestres à infecção por *Leishmania*, com o desenvolvimento de doença clínica, as medidas preventivas recomendadas para cães domésticos devem ser aplicadas também aos canídeos cativos em áreas endêmicas. No Brasil, são recomendadas a utilização de coleira impregnada com inseticida, vigilância e controle de os animais domésticos e sinantrópicos próximos aos recintos, a remoção diária de matéria orgânica, a borrifação da área com inseticida de acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2005; Luppi et al, 2008; Jusi et al., 2011). Além disso, o monitoramento clínico e a investigação sorológica do plantel de canídeos das instituições conservacionistas devem ser realizados periodicamente. A soropositividade de animais ameaçados de extinção, tais como o lobo-guará, requer uma reflexão da comunidade científica e práticas que possibilitem a saúde ecológica. A diversidade genética é importante para a manutenção, preservação e conservação das espécies, tanto em conservação *ex situ* quanto em vida livre nos diferentes ecossistemas. Presumivelmente, é imprescindível a harmonia, baseada em estudos bem conduzidos, entre os parâmetros conservacionistas e a promoção da saúde pública.

Com base nos resultados deste estudo, ambos os conjugados são capazes de diferenciar canídeos soropositivos dos soronegativos para imunoglobulinas anti-*Leishmania*. Contudo, apesar do ensaio com a Proteína A ter-se mostrado adequado a testes de triagem para estudos referentes à resposta imune dos hospedeiros silvestres à infecção pela *Leishmania* sp., o desenvolvimento de conjugados com anticorpos espécie-específicos deve ser almejado para padronização de sorotestes mais sensíveis para as diferentes espécies silvestres considerando um número maior de animais.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FAPESB, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização da pesquisa; a FZB-BH e PZGV-BA, pela disponibilização dos animais. Ao LIVE-UFBA e LABIMUNO, que foram imprescindíveis para a realização dos ensaios laboratoriais disponibilizando as equipes técnicas e a infra-estrutura.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.B.P.F; DE PAULA, D.A.J; COLODEL, E.M; DUTRA, V; NAKAZATO, L; SOUSA, V.R.F.. Leishmaniose visceral e hepatite infecciosa em cachorro-vinagre mantido em cativeiro no Brasil – Relato de Caso. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p.333-338, 2011.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. 815p.

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. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.90, p.498-502, 1996.

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

CURI, N.H.A; MIRANDA, I; TALAMONI, A.S. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.1, 2006.

DANTAS-TORRES, F. . Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, p.929-930, 2006..

DIPINETO, L; MANNA, L; BAIANO, A; GALA, M; FIORETTI, A; GRAVINO, A.E; MENNA, L.F. Presence of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. **Journal of Wildlife Disease**, v. 43, n.3, p.518-20, 2007.

FATTORI, K.R & LIMA, V.M.F. American visceral leishmaniasis in *Speothos venaticus*. In: 8 th International Veterinary Immunology Symposium, 2007, Ouro Preto. **8th International Veterinary Immunology Symposium**, 2007. p.116.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D.A. A statistically defined endpoint 335 titer determination method for immunoassays. **Journal Immunology Methods**, v.221, p.35–41, 1998.

GOMES, M.S. 2006. Carnivora – Canidae (Lobo-guará, Cachorro-do-mato, Raposa-do-campo). In: CUBAS, Z.S; SILVA, J.C; DIAS, J.L.C. **Tratado de Animais Selvagens**. 1.ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2006, p.492-504.

GOMES, R.B; BRODSKY, C; OLIVEIRA, C.I; COSTA, J.M.L; MIRANDA, J.C; CALDAS, A; VALENZUELA, J.G ; BARRALNETTO, M; BARRAL, A. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.10, p.1530-1534, 2002.

GOMES, R. B. B. ; MENDONÇA, I. L. ; SILVA, V. C. ; RUAS, J. ; SILVA, M. R. B. ; CRUZ, M. S. ; BARRAL, A. ; COSTA, C H N . Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.2, p.127-133, 2007.

GOUDSWAARD, J; VANDER DONK, J.A; NOORDZIJ, A; VAN DAM, R.H; VAERMAN, J.P. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. **Scand. J. Immunol**, v.8, p.21-28,1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS (IBAMA). 2003. Lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Ministério do Meio Ambiente, IBAMA, Brasília. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br>. Acessado em: 05 de janeiro de 2012.

INTERNATIONAL UNION CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL REOURCES (IUCN). Red list of threatened species 2011.2. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 de janeiro de 2012.

JUSI, M.M.G; STARKE-BUZETTI, W.A; OLIVEIRA, T.M.F.S; TENÓRIO, M.S; SOUSA, L.O; MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v.20, n.3, p.219-222, 2011.

KELLY, P.J; TAGWIRA, M; MATTHEWMAN, L; MASON, P.R; WRIGHT, E.P. Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.16, n.4, p.299-305, 1993.

LACHAUD, L., MARCHERGUI-HAMMAMI, S., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J.P., BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiology**, v.40, 210–215, 2002.

LIMA, V.M.F; BIAZONNO, L; SILVA, A.C; CORRÊA, A.P.F.L; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n.4, p.215-218, 2005.

LIMA, V.M.F; FATTORI, K.R; MICHELIN, A.F; NOGUEIRA, F.S; SOUZA, L.O.E. Evidence of *Leishmania* spp. antibodies and DNA in bush dog (*Speothos venaticus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.40, n° .1, p.91-94, 2009.

LUCIANO, R.M; LUCHEIS, S.B; TRONCARELLI, M.Z; LUCIANO, D.M; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na

resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci**, v.46, p.81-187, 2009.

LUPPI, M; MALTA, M; SILVA, T; SILVA, F; MOTTA, R.O.C; MIRANDA, I; ECCO, R; SANTOS, R. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.146-151, 2008.

MANCIANTI, F., MIGNONE, W; GALESTRI, F. Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, p.454–456, 1994.

MANCIATI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay, **Veterinary Parasitology**, v.65, n. 1-2, p. 1-9, 1996.

MAURICIO, I.L; HOWARD, M.K; STOTHARD, J.R; MILES, M.A. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v.119, p.237-246, 1999.

OLIVEIRA, L.S; JULIÃO, F.S; SOUZA, V.M.M; FREITAS, D.S; SOUZA, B.M.P.S; PAULE, B.J.A; AGUIAR, P.H.P; BARROUIN-MELO, S.M; FRANKE, C.R. A utilização da Imunofluorescência Indireta no diagnóstico de rotina da Leishmaniose Visceral Canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira (UFG)**, Goiânia, v.6, n.1, p.41-48, 2005.

OLIVEIRA, T.M.F.S; FURUTA, P.L; CARVALHO, D.C; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,v.17, p.7-11, 2008.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, p.229-35, 1994.

RUAS, J.L; FARIAS, N.A.R; SOARES, M.P; BRUM, J.G.W. *Babesia* sp. em graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*) no sul do Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, n.1, p.113-114, 2003

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p. 671–683, 1996.

SHROUT, P. Measurement reliability and agreement in psychiatry. **Statistical Methods in Medical Research**, v.7, p.301-317, 1998.

SILVA, E.S, PIRMEZ, C; GONTIJO, C.M.F; FERNANDES O; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Vet Rec**, v.147, p.421- 422, 2000.

SILVA, D.A.O; VITALIANO, S. N; MINEO, T.W.P; R.A, FERREIRA†, BEVILACQUA‡, E; MINEO, J. R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Journal of Parasitology**, v.91. n.5, p.1212-1216, 2005a.

SILVA, A.V.M; DE PAULA, A.A; CABRERA, M.A.A; CARRERA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, p324-328, 2005b.

SOLANO-GALLEGO, L; RODRIGUEZ, A; INIESTA, L; ARBOIX, M; PORTÚS, M; AALBEROLA, J. Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.10, n.5, p.849–855, 2003.

SOUZA, N.P; ALMEIDA, A.B.P.F; FREITAS, T.P.T; PAZ, R.C.R; DUTRA, V; NAKAZATO, L; SOUSA, V.R.F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos

silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3, p.333-335, 2010.

STÖBEL, K; SCHÖNBERG, A; STAAK, C. A new non-species dependent ELISA for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s. l. in zoo animals. **Int J Med Microbiol**, v.33, 88-99, 2002.

TENÓRIO, M.S; OLIVEIRA E SOUSA, L; PAIXÃO, M.S; ALVES, M.F; PAULAM, S.C; LIMA, F.L; JUSI, M.M; TASCA, K.I, MACHADO, R.Z; STARKE-BUZETTI, W.A. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **J. Zoo Wild Med**. v.42, n.4, p.608-16, 2011.

TRAVI, B.L., TABARES, C.J., CADENA, H., FERROO, C., OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, p.119–124, 2001.

ZRZAVY, J & RICANKOVA, V. Phylogeny of recent canidae (Mammalia, Carnivora): relative reliability and utility of morphological and molecular datasets. **Zool Scripta**, v.33, n.04, p.311-333, 2004.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde os primeiros registros de infecção por *Leishmania* sp. em canídeos silvestres, estes são indicados como reservatórios naturais da doença. As manifestações clínicas são descritas com poucos detalhes nesses animais, que, quando cativos em área endêmica para a LVC, aparentemente estão mais susceptíveis à doença. Contudo, existem poucos trabalhos sobre LVC nos canídeos de vida livre, sendo descrita a cura clínica bem como animais soropositivos e/ou infectados, porém assintomáticos.

A realização de testes sorológicos, IFI e ELISA, é bastante comum sobre as amostras de soros ou plasma em canídeos silvestres, tanto nos cativos quanto naqueles de vida livre. A maior dificuldade é encontrar os conjugados para cada espécie buscando uma padronização específica, no entanto o anti-IgG de cão doméstico tem se mostrado eficaz na diferenciação de positivos e negativos nas espécies de lobo-guará (*C. Brachyurus*), raposinha (*L. vetulus*), cachorro-vinagre (*S. venaticus*) e cachorro-do-mato (*C. Thous*).

O WB é uma técnica pouco utilizada no estudo da LV em cães domésticos e canídeos exóticos, ainda não sendo utilizada nos canídeos silvestres. Contudo, esta técnica é importantíssima para a validação de testes sorológicos de menor sensibilidade e especificidade tais como a IFI e o ELISA. Outra característica importante dessa técnica é o seu poder preditivo, detectando imunocomplexos de peso molecular muito baixo, responsáveis por predizer infecção tissular, a susceptibilidade do indivíduo testado e o prognóstico da doença em animais sob tratamento.

O presente trabalho demonstra que a extrapolação de técnicas sorológicas (ELISA e WB) entre canídeos é capaz de distinguir os animais soropositivos dos soronegativos, tanto nos ensaios com conjugado anti-IgG de cão quanto naqueles com proteína A, já que o WB confirmou o resultado dos ensaios do ELISA indireto.

As técnicas sorológicas são ferramentas que alcançam rápidos resultados e imprescindíveis como primeira abordagem para a investigação da presença de *Leishmania* sp. em plantéis de canídeos mantidos em instituições conservacionistas presentes ou não em áreas endêmicas.

No âmbito da imunopatologia, encontra-se um dos campos menos explorado pelos pesquisadores que estudam a LVC em canídeos silvestres, sendo esta imprescindível para o entendimento da resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasito, bem como para o desenvolvimento de vacinas capazes de serem utilizadas em animais cativos presentes em área endêmica

Alguns estudos com canídeos silvestres geralmente relatam a identificação do gênero *Leishmania*, utilizando a técnica de PCR e/ou parasitológico de tecidos como fígado, baço, linfonodo e fragmento de pele, algumas vezes sendo identificada a espécie do parasito. No entanto, existe a necessidade de mensurar a carga parasitária nos diferentes indivíduos infectados, bem como o seu papel como transmissores do parasito para o flebótomo através do xenodiagnóstico. Essa técnica ainda é pouco utilizada em canídeos silvestres infectados, sendo observados resultados de infectividade baixos, demonstrando que animais infectados e assintomáticos não são bons transmissores.

5. PERSPECTIVAS

São necessários estudos com um número maior de animais da mesma espécie com o objetivo de padronizar e validar as diversas técnicas diagnósticas para os canídeos silvestres. No entanto, as dificuldades de obtenção de amostras de animais silvestres é uma realidade no Brasil, principalmente aquelas de instituições conservacionistas localizadas em regiões mais distantes, muitas vezes sendo relatadas dificuldades na coleta e no envio dos materiais biológicos pelos profissionais.

Durante o mestrado, entre o período de 2010 e 2012, foram obtidas 22 amostras de sangue, soro e/ou plasma de canídeos silvestres cativos em zoológicos ou CETAS ou em vida livre situados no estado de Belo Horizonte ou na Bahia. Dentre o total de amostras, foram extraídos os DNAs de 21 das 22 amostras de sangue coletadas, os quais estão sendo analisados pela PCR atualmente. Os primeiros testes sorológicos utilizando o ELISA indireto indicaram soropositividade de 15/22 (68,18%), sendo dois *C. brachyurus*, seis *C. thous*, uma *L. vetulus* e seis *S. venaticus*. Foi realizado também o WB, no qual foram detectadas oito bandas de peso molecular de 24, 28, 32, 45, 49, 54, 124 e 143 kDa em cinco animais da

espécie *C. thous* ou *C. brachyurus* em ambiente cativo. Ainda foram obtidos aspirados esplênicos de dois *L. vetulus* e seis *C. thous* presentes no CETAS e um *C. thous* de vida livre, todos presentes em Salvador (BA), para o diagnóstico parasitológico, porém todos apresentaram-se negativos no teste. Todos os dados, incluindo os da PCR que está em andamento, farão parte de um segundo artigo que será encaminhado para a revista *Veterinary Parasitology* com o intuito de demonstrar a aplicação dos testes padronizados pelo nosso grupo de pesquisa para o diagnóstico de leishmaniose visceral em diversas espécies de canídeos silvestres.

O LIVE-UFBA pode tornar-se futuramente um centro de apoio de diagnóstico sorológico para *Leishmania* sp. em canídeos silvestres na Bahia, podendo prestar serviços epidemiológico e clínico importantes para as gestões em Instituições Conservacionistas, bem como para os profissionais que lidam com o monitoramento e resgate de fauna de vida livre.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, A.A. & GÓMEZ, A. Essential veterinary education in conservation medicine and ecosystem health: a global perspective. **Rev. Sci. Tech**, v.28, n.2, p.597-603, 2009.

AISA MJ, CASTILLEJO S, GALLEGO M, FISA R, RIERA MC, DE COLMENARES M, et al.. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, p.154-9, 1998.

ALMEIDA, A.B.P.F; DE PAULA, D.A.J; COLODEL, E.M; DUTRA, V; NAKAZATO, L; SOUSA, V.R.F. Leishmaniose visceral e hepatite infecciosa em cachorro-vinagre mantido em cativeiro no Brasil – Relato de Caso. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p.333-338, 2011.

ALVAR, J; YACTAYO, S; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v.22, n.12, p.552–557, 2006.

ALVES, C.F; DE AMORIM, I.F; MOURA, E.P; RIBEIRO, R.R; ALVES, C.F; MICHALICK, M.S; KALAPOTHAKIS, E; BRUNA-ROMERO, O; TAFURI, W.L; TEIXEIRA, M.M; MELO, M.N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.128, n.4, p.349-58, 2009.

ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.C.P.; MAYRINK, W; GENARO, O. Evaluation of the Immune Response and Production of Interferon in Canine Visceral Leishmaniasis. **Revue Med Vet**, v.150, n.10, p.809-814, 1999.

ANDRIOLO, A. Desafios para a Conservação da Fauna. In: CUBAS, Z.S; SILVA, J.C; DIAS, J.L.C. **Tratado de Animais Selvagens**. 1.ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, p.19-25, 2006.

BARATA, R.A; FRANÇA-SSILVA, J.C; MAYRINK, W; SILVA, C.J; PRATA, A; LOROSA, E.S; FIÚZA, J.Á; GONÇALVES, C.M; DE PAULA, K.M; DIAS, E.S. Aspectos

da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38 (5): 421 – 425, set-out, 2005.

BARBOZA, D.C.P.M; GOMES NETO, C.M.B; LEAL, D.C; BITTENCOURT, D.V.V; CARNEIRO, A.J.B; SOUZA, B.M.P; S; OLIVEIRA, L.S; JULIÃO, F.S; SOUZA, V.M.M; FRANKE, C.R. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.2, p. 152-163, 2006.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDIZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor b as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** , v.90, p.3442-3446, 1993.

BARROUIN-MELO, S.M; LARANGEIRA, D.F; TRIGO, J; AGUIAR, P.H.P; DOS-SANTOS, W.L.C; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 195-197, 2004.

BARROUIN-MELO, S. M; LARANGEIRA, D.F; FILHO, F.A.A; TRIGO, J; JULIÃO, F.S; FRANKE, C.R; AGUIAR, P.H.P; DOS-SANTOS, W.L.C; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, v.171.n.2, p.331-339, 2006.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERANGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273-277, 1996.

BLAVIER, A; KEROACK, S; DENEROLLE, P; GOY-THOLLOT, I; CHABANNE, L; CADORE, J.L; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, n. 62, p.108-20, 2001.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v.2, n.10, p. 907-16, 2001.

BOGGIATO, P.M; RAMER-TAIT, A.E; METZ, K; KRAMER, E.E; GILSON-CORLEY, K; MULLIN, K; HOSTETTER, J.M; GALLUP, J.M; JONES, D.E. Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.2, p.267–273, 2010.

BRASIL. Portaria nº 118/97 de 15 de outubro de 1997. Dispõe sobre o funcionamento de criadouros de animais da fauna silvestre brasileira com fins econômicos e industriais. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 17 nov., 1997.

BRASIL. IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa nº 3 de 27 de maio de 2003: Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. **IBAMA**, Brasília, 2003.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 815p, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE & MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho. 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, 14 jul. 2007. 2p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mudanças climáticas e ambientais e seus efeitos na saúde: cenários e incertezas para o Brasil/BRASIL. **Ministério da Saúde - Organização Pan-Americana da Saúde**. Brasília: 2008. 40p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE & MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Nota de esclarecimento sobre as vacinas anti-leishmaniose visceral registradas no MAPA. **Esplanada dos Ministérios**, Brasília-DF, 3 mai. 2009. 2p.

BRUM, L.C; CONCEIÇÃO, L. G.; RIBEIRO, V. M.; HADDAS JR, V. Principais dermatoses zoonóticas de cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v.12, n.69, p.29-46, 2007.

BRUNDA, M.J. Interleukin-12. Review. **J. Leukoc. Biol.**, v.55, p.280-288, 1994.

BUENO, A.A; BELENTANI, S.C.S; MOTTA JUNIOR, J.C. Ecologia alimentar do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Mammalia: Canidae), na Estação Ecológica de Itirapina, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v.2, n.2, 2002.

CABRERA, M.A.A; DE PAULA, A.A; CAMACHO, L.A.B; MARZOCHI, C.A; AGUIAR G.M; XAVIER, S.C; et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.45, n.2, p.79-83, 2003.

CARRILLO, E; CRUSAT, M; NIETO, J; CHICHARRO, C; THOMAS, M.D.C; MARTÍNEZ, E; VALLADARES, B; CAÑAVATE, C; REQUENA, J.M; LÓPEZ, M.C; ALVAR, J; MORENO. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.26, p.1902-1911, 2008.

CHIEDA, C.C; OLIVEIRA, E.N; FUSCO-COSTA, R; COSTA-MENDES, F; QUADROS, J. Ordem carnívora. In: REIS, N.R; PERACHI, A.L; PEDRO, W.A; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Midiograf, 2006, v.1, p. 231-275.

CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES). SPECIES DATABASE: CITES-LISTED SPECIES. Disponível em: <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. Acesso em: 12 jan. 2012.

CORDEIRO-DA-SILVA, A., CARDOSO, L., ARAUJO, N., CASTRO, H., TOMAS, A., RODRIGUES, M., CABRAL, M., VERGNES, B., SERENO, D., OUAISSI, A. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR 2) protein homologue during canine natural infections: patho-logical implications. **Immunol. Lett.** v.68, n.2, p.155-162, 2003.

COSTA, J.M.L.; VIANA, G.M.C.; SALDANHA, A.C.R.; NASCIMENTO, M.A.S.; ALVIM, A.C.; BURATTINI, M.N; SILVA, A.R. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A evolução de uma epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p321-324, 1995.

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. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.90, p.498-502, 1996.

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

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

CURI, N.H.A; MIRANDA, I; TALAMONI, A.S. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.1, 2006.

DAHROUG, M.A.A; ALMEIDA, A.B.P.F; SOUSA, V.R.F; DUTRA, V; TURBINO, N.C.R.M; NAKAZATO, L; SOUZA, R.L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, p.73–74, 2010.

DAHROUG, M.A.A; ALMEIDA, A.B.P.F; SOUSA, V.R.F; DUTRA, V; GUIMARAES, L. D; SOARES, C.E; NAKAZATO, L; SOUZA, R.L.. The first case report of *Leishmania (leishmania) chagasi* in *Panthera leo*. **Asian Pac. J. Trop. Med**, v.190, p.249-250, 2011.

DALPONTE, J. C. & LIMA, E. S. 1999. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora – Canidae) em um cerrado em Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2, p.325-332, 1999.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.1–8, 2006.

DA SILVA, A et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v.19, p.1082-1092, 2000.

DASZAK P; CUNNINGHAM, A.A; HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Trop**, v.287, p. 103-116, 2001.

DE AMORIM, I.F.G.; FREITAS, E.; ALVES, C.F; TAFURI, W.L; MELO, M.N; MICHALICK, M.S.M; COSTA-VAL, A.P. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune® vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.55–63, 2010.

DEANE, M.P; DEANE, L.M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectada pela *L. donovani*. **O Hospital**, 46: p. 651-653, 1954.

DE OLIVEIRA, T.G. Distribution, habitat utilization and conservation of the vulnerable bush dog *Speothos venaticus* in northern Brazil. **Oryx**, v.43, p.247-253, 2009.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol**, v.17, n.9, p.451-458, 1995.

DEUTSCH, L. A. An encounter between bush dog (*Speothos venaticus*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Mammalogy**, v.64, p.532-533, 1983.

DIAS, F.O.P, LOROSA, E.S & REBÊLO. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cad. Saúde Pública**, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contributions to Zoology**, Washington, D.C, v. 392, p1-51, 1984.

FERNANDEZ-PEREZ, F.J., MENDEZ, S., DE LA FUENTE, C., CUQUERELLA, M., GOMEZ, M.T., ALUNDA, J.M.. Value of Western blotting in the clinical following-up of canine Leishmaniasis. **J. Vet. Diagn.** v.11, p170-173, 1999.

FERREIRA, P.R.B; LARANGEIRA, D.F; OLIVEIRA, L.S; MALTA, M.C.C; OLORTEGUI, C.D.C; NORBERTO, G.O; GOMES, M.C; BARROUIN-MELO, S.M. Avaliação da reatividade de diferentes conjugados para a padronização de ELISA indireto para o sorodiagnóstico de leishmaniose visceral em soros de canídeos silvestres em conservação ex situ. In: II Encontro Internacional de Medicina da Conservação, 2009, Recife-PE. Anais do II EIMC, 2009.

FIGUEIREDO, F.B; PEREIRA, S.A; FEDULO, R.C; MENEZES, D.A; 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**, v.102, p. 200-201, 2008.

FISA, R; GÁLLEGO, M; RIEIRA, C; AISA, M.J; VALLS, D; SERRA, T; COLMENARES, M. Serological diagnosis of canine these antigens requires equipments and long time for leishmaniasis by dot - Elisa. **J. Vet. Diag. Invest**, v.9, p.50-55, 1997.

FRANKE, C. R.; ZILLER, M.; STAUBACH, C.; LATIF, M. Impact of the El Niño/Southern oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n.9, p. 914-917, 2002.

GOMES, M.S. Carnívora – Canidae (Lobo-guará, Cachorro-do-mato, Raposa-do-campo). In: CUBAS, Z.S; SILVA, J.C; DIAS, J.L.C. **Tratado de Animais Selvagens**. 1.ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, p. 492-504, 2006.

GOMES, R. B. B. ; MENDONÇA, I. L. ; SILVA, V. C. ; RUAS, J. ; SILVA, M. R. B. ; CRUZ, M. S. ; BARRAL, A. ; COSTA, C H N . Antibodies against *Lutzomyia longipalpis*

saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.2, p.127-133, 2007.

GOMES, Y.M; PAIVA, M; PAIVA CAVALCANTI, M; 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.

GOMES-NETO. **Pesquisa sobre o envolvimento do marsupial *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Didelphimorphia, Didelphidae) e de cães domiciliados na epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Camaçari, localidade de Barra do Pojuca, Bahia.** 2007.78f.Dissertação (mestrado)-Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev . Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338- 349, 2004.

GOUDSWAARD, J; VAN DER DONK, J.A; NOORDZIJ, A; VAN DAM, R.H; VAERMAN, J.P. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. **Scand. J. Immunol**, v.8, p.21-28, 1978.

INIESTA, L; GÁLLEGO, M; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v.103, p.77–81, 2005.

INTERNATIONAL UNION CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES (IUCN). Red list of threatened species 2012.1. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 10 jan. 2012.

JUAREZ, K.M; MARINHO FILHO, J. Diet, habitat, use and home ranges of sympatric canids in central Brazil. **Journal of mammology**, v.83, n.4, p.925-933, 2002.

JUSI, M.M.G; STARKE-BUZETTI, W.A; OLIVEIRA, T.M.F.S; TENÓRIO, M.S; SOUSA, L.O; MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v.20, n.3, p.219-222, 2011.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol**, v.166, p.1141-1147, 2001.

KAYE, P.M; SVENSSON, M; ATO, M; MAROOF, A; POLLEY, R; STAGER, S; ZUBAIRI, S; ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunology Rev.**, v.201, p.239-53, 2004.

KIM, H.M; KIM, M.J; LI, E; LYU, Y.S; HWANG, C.Y; AN, N.H. The nitric oxide-producing properties of *Solanum lyratum*. **J. Ethnopharmacol.**,v.67, n.2, p.163-9, 1999.

KRAMER, L; CALVI, L.E; GRANDI, G. Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: resistance and disease. *Veterinary Research Communications*, v.30, p.53-57, 2006.

KRUSE, H; KIRKEMO, A.M; HANDELAND, K. Wildlife as Source of Zoonotic Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, No. 12, 2004.

LACHAUD, L; MARCHERGUI-HAMMAMI, S. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol.** v.40, p.210 - 215, 2002.

LAGE, R.S; OLIVEIRA, G.C; BUSEK, S.U; GUERRA, L.L; GIUNCHETTI, R.C; CORREA-OLIVEIRA, R; REIS, A.B. **Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.** *Vet. Immunology Immunopathology*, v.115, p.135-45, 2007.

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

LAINSON, R & RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p.811-827, 2005.

LIMA, V.M.F; BIAZZONO, L; SILVA, A.C; CORRÊA, A.P.F.L; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n.4, p.215-218, 2005.

LIMA, E.D., JORGE, R.S.P., & DALPONTE, J.C. Habitat use and diet of bush dogs, *Speothos venaticus*, in the Northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. **Mammalia**, v.73, p.13-19, 2009.

LIMA, V.M.F; FATTORI, K.R; MICHELIN, A.F; NOGUEIRA, F.S; SOUZA, L.O.E. Evidence of *Leishmania spp.* antibodies and DNA in bush dog (*Speothos venaticus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.40, n°.1, p.91-94, 2009.

LIMONAD, E. . Yes, Nós Temos Bananas! Praias, Condomínios Fechados, Resorts e Problemas Sócio-Ambientais. **GEOgraphia (UFF)**, v. 8, p.12-32, 2007.

LIMONAD, E.. "Você já foi à Bahia, nêga? Não! Então vá! Antes que acabe..." Planejamento, urbanização e turismo no litoral do Nordeste brasileiro. **Scripta Nova (Barcelona)**, v. 12, p.1-15, 2008.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALEZ, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zent Vet**, v.43, p.460-474, 1996.

LUPPI, M; MALTA, M; SILVA, T; SILVA, F; MOTTA, R.O.C; MIRANDA, I; ECCO, R; SANTOS, R. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p.146-151, 2008.

MACDONALD, D.W; SILLERO-ZUBIRI, C. Dramatis personae: wild canids – an introduction and dramatis personae. In:_____. **The biology and conservation of the wild canids**. New York (USA): Oxford University Press, 2004, v.1, p.3-36.

MALTA, M.C.C; TINOCO, H.P; XAVIER, M.N; VIEIRA, A.L.S; COSTA, E.A; SANTOS, R.L. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p.193-197, 2010.

MANCIANTI, F., MIGNONE, W; GALESTRI, F. Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v.30 p.454–456, 1994.

MANED WOLF, SSP. 2007. Manual de manejo do lobo-guará. **Maned Wolf, SSP**, 94p.

MANGINI, P. R; SILVA, J.C.R. Medicina da Conservação: Aspectos Gerais. In: CUBAS, Z.S; SILVA, J.C; DIAS, J.L.C. **Tratado de Animais Selvagens**. 1.ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, p.1258-68, 2006.

MARZOCHI, M.C.A.; SABROZA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.F.B.; TRAMONTANO, N.C. & RANGEL, F. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde públ**, 1: p.5-11, 1985.

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

MIRALLES, G.D.; STOECKLE, M.Y.; McDERMOTT, D.F.; FINKELMAN, F.D.; MURRAY, H.W. Th1 e Th2 Cell- associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.62, n.3, p.1058-1063,1994.

MISSAWA, N.A; VELOSO, M.A.E; MACIEL, G.B.M.L; MICHALSKY, E.M; DIAS, E.S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44 , n.1, p.76-78, 2011.

MURRAY, H.W.; LU, C.M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R.T. Interleukin- 10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun**, v.70, n.11, p.6284-6293, 2002.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858,2000.

NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.B; BORJA-CABRERA, G.P; SANTOS, F.N.; MENZ, I; PARRA, L.E; XU, Z; CHU, J; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B; LUVIZOTTO, M.C.R.

Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v.23, p.4805–4810, 2005.

OLIVEIRA, L.S; JULIÃO, F.S; SOUZA, V.M.M; FREITAS, D.S; SOUZA, B.M.P.S; PAULE, B.J.A; AGUIAR, P.H.P; BARROUIN-MELO, S.M; FRANKE, C.R. A utilização da Imunofluorescência Indireta no diagnóstico de rotina da Leishmaniose Visceral Canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.1, p.41-48, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly epidemiological Record**, v.77, n.44, p.365-371, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. Leishmaniasis: magnitude of the problem. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis>. Acesso em 08 de janeiro de 2012.

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

PATZ, J.A; GRACZYK, T.K; GELLER, N; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **Int J Parasitol**, v.1, p.1-11, 2000.

PERES, C.A.. Observations on hunting by small-eared (*Atelocynus microtis*) and bush dogs (*Speothos venaticus*) in central-western Amazonia. **Mammalia**, v.5, p.635-639, 1991.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, p.229-35, 1994.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG,

E.J.; BERNADINA, W.; RUTTEM, V.P.M.G. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Vet Immunol Immunophatol**, v.69, p.121-126, 1999.

PINTO, J.M.S.; CATENACCI, LÍLIAN S.; COLOSIO, A. C. ; VLEESCHOUWER, K.M.. OCORRÊNCIA DE *Prosthenorchis elegans* (DIESING, 1861) TRAVASSOS, 1915 EM *Leontopithecus chrysomelas* (MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA) NA RESERVA BIOLÓGICA (REBIO), DE UNA - BA. 2008. In: **35° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008, Gramado-RS**. Anais do 35° Conbravet, 2008.

QUEIROGAS, V.L. Estudo dos conflitos entre população rural e lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) em fragmentos de cerrado próximo ao município de Bom Despacho – MG. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007. Caxambu – MG**: Disponível em: <http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/2045.pdf>. Acessado em: 10 de junho, 2009.

QUINNELL. R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.1421-1424, 2001.

RAMOS JR, V.A; PESSUTI, C; CHIEREGATTO, C.A.F.S. Guia de Identificação dos Canídeos Silvestres Brasileiros. Sorocaba: **joyjoy Studio Ltda**, 2003. 34p.

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

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol**, v.13, p.151-177, 1995.

ROCHA, V.J; REIS, NR; SEKIAMA, M.L. Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae), em um fragmento florestal no Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21 n°. 4, p.871–876, 2004.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregions complex. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.74, n°.1, p. 81–96, 2006.

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

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.88, p.21-30, 2002.

SARAIVA, E.M. The FML-vaccine (Leishmune1) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, v.24, p.2423–2431, 2006.

SASTRE, N; FRANCINO, O; RAMIREZ, O; ENSEÑAT, C; SÁNCHEZ, A; ALTER, L. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. **Vet. Parasitol**, p.117-20, 2008.

SAVANI, E.S.M.M; DE ALMEIDA, M.F; CAMARGO, M.C.G.D.O; D´AURIA, S.R.N; SILVA, M.M.S; DE OLIVEIRA, M.L; SACRAMENTO, D. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 5-10, 2010.

SCHALLIG, H.D; DA SILVA E.S; VAN DER MEIDE, W.F; SCHOONE, G.J; GONTIJO, C.M. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector Borne Zoonotic Dis**, v.7, n.3, p.387-93, 2007.

SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, p. 671–683, 1996.

SILVA, E.S; GONTIJO, C.M; PACHECO, R.S; FIUZA, V; BRASIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96(3): p. 285-91, 2001.

SILVA, A.V.M; DE PAULA, A.A; CABRERA, M.A.A; CARRERA, J.C.A.. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, p.324-328, 2005.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLAL MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.24, p.247-254, 2001.

SOARES, C.O. Imunodiagnóstico em medicina veterinária. In: MADRUGA, C.R; ARAÚJO, F.R; SOARES, C.O. Imunodiagnóstico em medicina veterinária. 1.ed. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, p.13-16, 2001.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J.E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet Parasitol**, v.96, n.4, p.265-76, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L; RODRIGUEZ, A; INIESTA, L; ARBOIX, M; PORTÚS, M; ALBEROLA, J. Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.5, p.849–855, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A; MIRÓ, G; CARDOSO, L; PENNISI, M.G; FERRER, L; BOURDEAU, P; OLIVA, G; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol**, v.165, n°1-2, p.1-18, 2009.

SOUZA, N.P; ALMEIDA, A.B.P.F; FREITAS, T.P.T; PAZ, R.C.R; DUTRA, V; NAKAZATO, L; SOUSA, V.R.F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3, p.333-335, 2010.

TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A.; MICHALICK, M.S.; GENARO, O; FRANCA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.38, p.81-89, 1996.

TAVARES, C.A.P; FERNANDES, A.P; MELO, M.N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, p.657-67, 2003.

TEIXEIRA, M.C.A; OLIVEIRA, G.G.S; SANTOS, P.O.M; BAHIENSE, T.C; DA SILVA, V.N.G; RODRIGUES, M.S; LARANJEIRA, D.F; WASHINGTON, L.C.S; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n.2, p.182-189, 2011.

TENÓRIO, M.S; OLIVEIRA E SOUSA, L; PAIXÃO, M.S; ALVES, M.F; PAULAM, S.C; LIMA, F.L; JUSI, M.M; TASCA, K.I, MACHADO, R.Z; STARKE-BUZETTI, W.A. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **J. Zoo Wild Med**. v.42, n.4, p.608-16, 2011.

TORRES, M; BARDAGÍ, M; ROURA, X; ZANNA, G; RAVERA, I; FERRER, L.. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J**. v.188, n.3, p.346-51, 2011.

TRAVI, B.L; TABARES, C.J; CADENA, H; FERRO, C; OSORIO, Y..Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.64, p.119-24, 2001.

TRAVI, B.L; OSORIO, E.Y; SALDARRIAGA, O.A; CADENA, H; TABARES, C.J; PENICHE, A; LEE, S; MELBY, P.C. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.81, p.994-1003, 2009.

TRINCHIERI, G.; RENGARAJU, M.; D'ANDREA, A.; VALIANTE, N.M.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHEHIME, J. Producer cells of interleukin-12. **Immunol Today**, v.14, p.237-238, 1993.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; RAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T.; LE RAY, D. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Veterinary Record**, v.141, n.13, p.328-330, 1997.

XIAOMING, W; TEDFORD, R.H; VAN VALKENBURGH, B; WAYNE, R.K. Phylogeny, Classification, and Evolutionary Ecology of the Canidae. In: SILLERO-ZUBIRI, C; HOFFMANN, M; MACDONALD, D.W. Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan. Cambridge, **IUCN/SSC Canid Specialist Group**, 2004, cap. 2, p. 8-20.

WALLACE, R.B., PAINTER, R.L.E., & SALDANIA, A.. An observation of bush dog (*Speothos venaticus*) hunting behaviour. **Mammalia**, v.66, p.309-311, 2002.

YANG, J.S; WU, C.C; KUO, C.L; YEH, C.C; CHUEH, F.S; HSU, C.K; WANG, C.K; CHANG, C.Y; IP, S.W; HSU, Y.M; KUO, W.W; CHUNG, JG. Solanum lyratum extract affected immune response in normal and leukemia murine animal in vivo. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.29, n.5, p.359-67, 2010.

ZRZAVY, J & RICANCOVA, V. Phylogeny of recent canidae (Mammalia, Carnivora): relative reliability and utility of morphological and molecular datasets. **Zool Scripta**, v. 33, n. 04, p. 311-333, 2004.

