

SAMUEL SOUZA SILVA

**PESQUISA DE PROTOZOÁRIOS EM CANINOS DOMÉSTICOS NO
MUNICÍPIO DE ÁGUAS BELAS, PERNAMBUCO**

GARANHUNS – PE

2019

SAMUEL SOUZA SILVA

**PESQUISA DE PROTOZOÁRIOS EM CANINOS DOMÉSTICOS NO
MUNICÍPIO DE ÁGUAS BELAS, PERNAMBUCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de graduação em Medicina Veterinária.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos

GARANHUNS – PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

S586p Silva, Samuel Souza
Pesquisa de protozoários em caninos domésticos no
Município de Águas Belas, Pernambuco / Samuel Souza
Silva. – 2019.
55 f. : il.

Orientador: Rafael Antonio do Nascimento Ramos.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina
Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Medicina Veterinária, Garanhuns, BR-PE,
2019.

Inclui referências e anexos

1. Cão - doença 2. Protozoário 3. Leishmaniose visceral
4. Babésia 5. Tripanossomose I. Ramos, Rafael Antonio do
Nascimento, orient. II. Título

CDD 636.7

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE PROTOZOÁRIOS EM CANINOS DOMÉSTICOS NO
MUNICÍPIO DE ÁGUAS BELAS, PERNAMBUCO**

Trabalho de Conclusão de Curso elaborado por

SAMUEL SOUZA SILVA

Aprovado em 07/01/2019

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

Carlos Roberto Cruz Ubirajara Filho
(Médico Veterinário)

Prof^a Dr^a Gílcia Aparecida de Carvalho
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS



FOLHA COM A IDENTIFICAÇÃO DO ESO

I. ESTAGIÁRIO

NOME: Samuel Souza Silva

MATRÍCULA Nº: 110778865436

CURSO: Medicina Veterinária

PERÍODO LETIVO: 2018.2

ENDEREÇO PARA CONTATO: Rua Antônio Miguel, nº 51, Centro, Quixaba-PE

FONE: (87) 99614-5606

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos

SUPERVISOR: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

FORMAÇÃO: Médico Veterinário

II. EMPRESA/INSTITUIÇÃO

NOME: Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

ENDEREÇO: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos.

CIDADE: Recife

ESTADO: Pernambuco

CEP: 52171-900

FONE: (87) 3764-5505

III. FREQUÊNCIA

INÍCIO E TÉRMINO DO ESTÁGIO: 10/09/2018 a 22/11/2018

TOTAL DE HORAS ESTAGIADAS: 405 horas.

Dedico este trabalho a minha avó **Luísa Carlos da Silva** (*in memoriam*), que foi uma batalhadora e me ensinou muito durante sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido o dom da vida, pois sem Ele, nada disso seria possível.

A meus pais, José Luciano da Silva e Risomar Lourenço da Silva, que foram alicerces, dedicando a mim incentivos e auxílio para todos os momentos sem medir esforços, a eles devo minha vida e a realização deste sonho.

Às minhas avós Estela Maria de Souza e Luísa Carlos da Silva (*in memoriam*), por me darem todo o aconchego que necessitei durante esses anos de luta até essa sonhada conquista.

À minha irmã Samilla Mariani da Silva, que cuidou e me protegeu em todos os momentos, incentivando e encorajando, para nunca desistir, sendo uma das pessoas mais importantes em minha vida, servindo de exemplo à seguir.

À minha madrinha Ana Maria Pereira de Medeiros, que sempre foi como uma segunda mãe.

Ao professor e orientador Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos, por contribuir com minha formação. Obrigado pela confiança e incentivo.

À Clarice¹, Clarice², Luís Gustavo, Eloisa e Miguel que me fazem esquecer dos problemas mesmo sem ter nenhuma ideia, o fazem.

À todos meus amigos, em especial Júnior, Maciel, Jean, Antônio, Mirella, Jaine, Mercia, Manuela, Rhaniel, Sâmia, Vanessa e Joseane que sempre me incentivaram e me apoiaram até o fim.

À Erika Laiany, pois sempre me deu forças em todos momentos, principalmente naqueles mais difíceis.

Às amizades que pude fazer durante a graduação, foram muitas, mas em especial a Anne, Michelle, Talita, e Sthênio, amigos para a vida.

À Victória e João Bosco, irmãos que ganhei durante a convivência em Garanhuns.

À todos do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas do DMV/UFRPE por contribuírem significativamente para o engrandecimento dos conhecimentos que adquiri durante o tempo que convivemos.

Ao professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota, por ter supervisionado e disponibilizado o Laboratório de Doenças Infectocontagiosas para realização do meu estágio.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para com minha formação pessoal e acadêmica, o meu muito obrigado.

RESUMO

Os cães são susceptíveis à infecção por uma ampla diversidade de protozoários, e dentro desse grupo é importante ressaltar a *Leishmania infantum* causadora da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), o *Trypanosoma cruzi* que causa a Tripanossomose e a *Babesia* sp. que causa a Babesiose. Clinicamente os animais acometidos por estes agentes apresentam-se desde assintomáticos até manifestações clínicas variadas. Desta forma, objetivou-se neste estudo detectar cães expostos a *L. infantum*, e infectados por *T. cruzi* e *Babesia* sp. no município de Águas Belas, Pernambuco. Amostras sanguíneas (n = 73) foram obtidas e analisadas através do teste imunocromatográfico TR-DPP Leishmaniose Visceral Canina e microscopia do esfregaço sanguíneo para detecção de *T. cruzi* e *Babesia* sp.. Das amostras analisadas 20,55% (15/73) reagiram ao teste imunocromatográfico. Por outro lado, na análise microscópica de esfregaço sanguíneo todas as amostras resultaram negativas. Diante disso, conclui-se que os cães residentes no município de Águas Belas foram expostos a *L. infantum* sendo importante a adoção de medidas preventivas para o controle da LVC e consequentemente da leishmaniose humana.

Palavras chaves: *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Babesia*, cães, Nordeste.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Setor de Doenças Infectocontagiosas – DMV/UFRPE	15
Figura 2	Laboratório de Microbiologia – DMV/UFRPE	16
Figura 3	Laboratório de Biologia molecular – DMV/UFRPE	16
Figura 4	Atividades realizadas nos laboratórios de Microbiologia e Biologia molecular	17
Figura 5	<i>Leishmania</i> na forma flagelada	26
Figura 6	<i>Leishmania</i> na sua forma aflagelada	27
Figura 7	Flebotomíneo ingurgitado	28
Figura 8	Ciclo biológico da <i>Leishmania infantum</i>	29
Figura 9	Crescimento anormal das unhas	30
Figura 10	Lesões na face de cão	30
Figura 11	Cão apresentando emagrecimento	31
Figura 12	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 13	Ciclo biológico da <i>Babesia</i> sp.	36
Figura 14	Mucosa pálida	37
Figura 15	Município de Águas Belas, Pernambuco	40
Figura 16	Coleta de sangue	41

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Total e percentual de amostras processadas para exame micológico no laboratório de microbiologia segundo espécie e sexo animal	23
Tabela 2	Total e percentual de amostras processadas para exame bacteriológico no laboratório de microbiologia segundo espécie e sexo animal	24

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Atividades desenvolvidas no Setor de Doenças Infectocontagiosas do DMV/UFRPE durante o ESO – Laboratório de Microbiologia	18
Quadro 2. Atividades desenvolvidas no Setor de Doenças Infectocontagiosas do DMV/UFRPE durante o ESO – Laboratório de Biologia Molecular	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI – Brain Heart Infusion

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DAT – Teste de Aglutinação Direta

DMEM – Dulbecco MEM

DMV/UFRPE – Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ESO – Estágio Supervisionado Obrigatório

FC – Fixação de Complemento

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

HOVET/DMV – Hospital Veterinário Escola do Departamento de Medicina Veterinária

LDIC – Laboratório de Doenças Infectocontagiosas

LIT – *Liver Infusion Triptofane*

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

NNN – *Novy, Mc Neal e Nicolle*

PAF – Punção por Agulha Fina

PBS - Phosphate Buffer Solution

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm – Rotações por minuto

SIM – Citrato, Lisina, Sulfato/Indol/Motilidade

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSI – Triple Sugar Iron

VM – Vermelho de Metileno

VP – Voges-Proskauer

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS	15
1 LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS	15
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	16
CAPÍTULO II – PESQUISA CIENTÍFICA	25
1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	26
2.1.1 Agente Etiológico	26
2.1.2 Distribuição	27
2.1.3 Reservatório	27
2.1.4 Vetores	28
2.1.5 Ciclo Biológico	29
2.1.6 Sinais Clínicos	29
2.1.7 Diagnóstico	31
2.1.8 Profilaxia	32
2.2 Tripanossomose canina	32
2.2.1 Agente Etiológico	32
2.2.2 Distribuição	32
2.2.3 Reservatório	32
2.2.4 Vetores	33
2.2.5 Ciclo Biológico	33
2.2.6 Sinais Clínicos	34
2.2.7 Diagnóstico	34
2.2.8 Profilaxia	35
2.3 Babesiose canina	35
2.3.1 Agente Etiológico	35
2.3.2 Distribuição	35
2.3.3 Vetores	35
2.3.4 Ciclo Biológico	35
2.3.5 Sinais Clínicos	36
2.3.6 Diagnóstico	37

2.3.7 Profilaxia	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Aspectos éticos	40
4.2 Área de estudo	40
4.3 Obtenção de amostras	40
4.4 Processamento laboratorial	41
4.4.1 Teste imunocromatográfico para <i>Leishmania infantum</i> (TR-DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Biomanguinhos)	41
4.4.2 Pesquisa de <i>Babesia</i> sp. e <i>T. cruzi</i>	41
4.5 Análise dos dados	41
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	42
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
8 REFERÊNCIAS	45

1 CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES REALIZADAS

2 1 LOCAL DO ESO E CARACTERÍSTICAS

3 O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no período de 10 de setembro a
4 22 de novembro de 2018, sendo cumprida uma carga horária de 405 horas. As atividades
5 foram desenvolvidas no Setor de Doenças Infectocontagiosas do Departamento de Medicina
6 Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV/UFRPE (Figura 1),
7 localizado na cidade de Recife. O ESO foi orientado pelo Prof. Dr. Rafael Antonio do
8 Nascimento Ramos e supervisionado pelo Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.



9 **Figura 1:** Setor de Doenças Infectocontagiosas – DMV/UFRPE (Fonte: Arquivo pessoal)

10

11 O setor de Doenças Infectocontagiosas é coordenado pelos Professores Dr. Rinaldo
12 Aparecido Mota e Dr. José Wilton Pinheiro Junior, e tem como objetivo realizar testes
13 diagnósticos de doenças infectocontagiosas de animais. Este setor compreende de três
14 laboratórios, sendo eles o de Microbiologia, o de Biologia Molecular e o de Vírus. As
15 amostras processadas eram provenientes da rotina do Hospital Veterinário Escola do
16 Departamento de Medicina Veterinária – HOVET/DMV da UFRPE, coletadas por técnicos,
17 residentes e professores e também eram recebidas amostras externas que eram coletadas por
18 Médicos Veterinários autônomos. Além dos laboratórios, existe um biotério para realização
19 de bioensaios, uma sala de autoclave destinada à realização de esterilização e
20 descontaminação de todo o material utilizado, três salas de professores e dois banheiros
21 comuns.

22

23

24

1 2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2 Durante o período do ESO as atividades foram distribuídas nos laboratórios de
3 Microbiologia (Figura 2) e Biologia Molecular (Figura 3), sendo do dia 10 de setembro de
4 2018 ao dia 22 de outubro de 2018 no laboratório de Microbiologia e do dia 23 de outubro ao
5 dia 22 de novembro de 2018 no laboratório de Biologia Molecular.



6

7

Figura 2: Laboratório de Microbiologia – DMV/UFRPE (Fonte: Arquivo pessoal)



8

9

Figura 3: Laboratório de Biologia Molecular – DMV/UFRPE (Fonte: Arquivo pessoal)

10 No laboratório de Microbiologia foi possível acompanhar coleta de material,
11 elaboração de meios para cultivo, cultivo e isolamento microbiano, avaliação macroscópica de
12 colônias, coloração de Gram, provas bioquímicas, antibiograma e exames diretos. No
13 laboratório de Biologia Molecular foi possível acompanhar as seguintes atividades: Extração
14 de DNA, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), eletroforese, cultivo celular, Reação de

- 1 Imunofluorescência Indireta (RIFI), sensibilização de lâminas para RIFI, bioensaio em
- 2 camundongos e ELISA (Ensaio Imunoenzimático) (Figura 4).



Figura 4: Atividades realizadas nos laboratórios de Microbiologia e Biologia molecular (Fonte: Arquivo pessoal). A: coleta de Material em felino; B: cultivo celular em placas de Petri; C: leitura de lâminas de RIFI; D: cultivo celular *in vitro* de *Toxoplasma gondii*; E: interpretação de provas bioquímicas; F: contenção de animais.

- 3
- 4
- 5
- 6
- 7

1 **Quadro 1: Atividades desenvolvidas no Setor de Doenças Infectocontagiosas do DMV/UFRPE**
 2 **durante o ESO – Laboratório de Microbiologia.**

3

Atividades	Detalhamento da atividade
Coleta de material	As coletas eram realizadas em pacientes do HVU-UFRPE, e quando solicitado, de outros locais. Dentre as amostras coletadas tiveram swab e <i>imprint</i> de lesão, Punção por Agulha Fina (PAF), punção de líquido sinovial e coleta de plumas de ave. Sempre que se realizava a coleta, quando necessário, era feito a antissepsia local com álcool 70° ou iodo, e as amostras eram armazenadas adequadamente até o processamento laboratorial.
Elaboração de meios de cultivo	A elaboração dos meios de cultivo, tanto para crescimento bacteriano, como para crescimento fúngico, era feito de acordo com as informações do fabricante. A água destilada sempre era utilizada como solvente, e em seguida o meio pronto era submetido a esterilização em autoclave vertical (121 °C/15 min). Os principais meios líquidos utilizados na rotina eram o caldo Brain Heart Infusion – BHI, e os sólidos: ágar base enriquecido com sangue ovino (5%), ágar levine, ágar Mueller Hinton e ágar sabouraud.
Cultivo e isolamento microbiano	O cultivo era feito em placas de Petri (meios sólidos) e em tubos de ensaio (meios líquidos). Nos meios sólidos a técnica utilizada para realizar a semeadura era através do esgotamento em estrias ou estrias múltiplas. Nessa técnica é transferido uma alçada da amostra sobre o meio e realizado estrias em movimentos de zig-zag. Após semeadura as amostras eram incubadas em estufa a 37°C por 24 a 48 horas, e em seguida era realizado a leitura das colônias. No cultivo em meios líquidos, uma porção da amostra era colocada no tubo de ensaio contido do meio, através de uma alça microbiana, em seguida esse era submetido a incubação em estufa, a 37°/24 a 48 horas.
Avaliação macroscópica das colônias bacterianas	Essa técnica consiste em avaliar as características das colônias bacterianas nos meios sólidos a olho nu. As características avaliadas eram: cor, aspecto, tamanho, forma e hemólise. Em seguida era realizado a coloração de Gram para identificar a forma e o arranjo das bactérias e se eram Gram positivas ou Gram negativas.

Coloração de Gram	<p>A coloração de Gram é uma técnica utilizada para diferenciar dois tipos de bactérias, as Gram positivas e as Gram negativas, essa técnica consiste em utilizar quatro reagentes diferentes, os quais têm funções específicas quando atuam nos micro-organismos. Os corantes utilizados atuarão no citoplasma das células diferenciando-os a visualização em microscópio. As bactérias Gram positivas são visualizadas na cor púrpura (violeta) e as Gram negativas na cor rosa bengala. Além de fazer essa diferença esta técnica permite diferenciar as diferentes formas e arranjos que as bactérias são encontradas. A partir das colônias cultivadas, era pego com uma alça microbiana, uma porção de uma dessas colônias e colocado em uma lâmina de vidro que previamente tinha sido colocado também uma alçada de água destilada, em seguida eram misturados e fixados em chama no bico de Bunsen, para posterior coloração. Na metodologia utilizada para coloração no laboratório, os reagentes eram o Violeta Genciana, o Lugol, o Álcool absoluto (descorante) e a Fucsina. O primeiro corante utilizado na técnica era o Cristal Violeta, esse penetra no citoplasma de todas as bactérias, independente se são Gram positivas ou negativas, tornando-as púrpura, em seguida utilizava-se o lugol que tem por função fixar o corante Cristal Violeta no citoplasma das células, após realizar essa fixação era lavado a lâmina com álcool absolto, o qual tem por função a destruição da parede das bactérias Gram negativas, conseqüentemente eliminava o primeiro corante utilizado. Por fim era utilizado o contracorante (Fucsina) que tem por função a coloração das bactérias Gram negativas.</p>
Provas bioquímicas	<p>A finalidade da realização das provas bioquímicas é avaliar as atividades metabólicas das bactérias, afim de se aproximar da espécie do agente isolado. As provas bioquímicas utilizadas no LDIC eram: Ureia, Vermelho de Metileno (VM), Voges-Proskauer (VP), Citrato, Lisina, Sulfato/Indol/Motilidade (SIM) e Triple Sugar Iron (TSI).</p>
Antibiograma	<p>O uso de antibiogramas em laboratórios é para avaliar a ação das bactérias frente a determinados antibióticos. Os antibiogramas eram</p>

	<p>realizados através da técnica de difusão em disco, onde era transferido a bactéria isolada do meio BHI para placa com meio ágar Mueller Hinton, em seguida era selecionado os antibióticos a serem utilizados (de acordo com a origem da amostra). Esses antibióticos tinham o formato de disco e em cada placa se fixava em média de 5 a 7 fármacos. Após fazer as placas de antibiograma, elas eram colocadas em estufa para serem incubadas por 24 horas para que em seguida fosse realizada a leitura que foi feita através de um foco de luz sobre a placa, onde era medido o alo formado ao redor do disco. Para cada antibiótico utilizado era especificado uma medida ao redor do disco que condizia com a ação do antibiótico sobre o agente testado, podendo ele ser sensível, intermediário ou resistente.</p>
<p>Exame direto para pesquisa de <i>Leptospira</i> spp.</p>	<p>A pesquisa direta de <i>Leptospira</i> spp. realizada no laboratório de doenças infectocontagiosas era realizada em amostra de urina obtida por cistocentese. A amostra era colocada em tubos de ensaio e submetida a centrifugação durante 5 minutos a 3500 rpm. Durante o processo de centrifugação era formado um pellet no fundo do tubo de ensaio, então 30 µl da urina era pipetado juntamente com o pellet e colocado em uma lâmina de vidro coberta com lamínula. Observações eram realizadas em microscópio de campo escuro. O diagnóstico positivo era confirmado quando observava-se espiroquetas em movimentos espiral.</p>
<p>Exame direto para pesquisa de <i>Sporothrix</i> spp.</p>	<p>Os animais atendidos que apresentavam sinais clínicos sugestivos de esporotricose eram submetidos ao exame. No exame direto, após ser coletado o material em lâminas de vidros, essas eram corados através da técnica elaborada por Romanowsky (Panótico Rápido) e visualizadas em microscópio óptico na objetiva de 100X. Nos animais positivos observavam-se esporos com formato característico de charuto. Esses animais, a critério do tutor, eram submetidos ao tratamento com itraconazol ou eutanasiados.</p>

Quadro 2: Atividades desenvolvidas no Setor de Doenças Infectocontagiosas do DMV/UFRPE durante o ESO – Laboratório de Biologia Molecular.

Extração de DNA	Para realização da extração do material genético, era levado em consideração a origem do material. Dentre as técnicas utilizadas no laboratório, estão a extração térmica, a extração por fenol-clorofórmio e também através de kits, as quais eram seguidos protocolos específicos.
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Previamente à realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o material genético era quantificado, e quando obtido a quantidade desejada realizava-se a PCR. Para tanto, o DNA era homogeneizado com um MIX de reação (água ultrapura, solução tamponada, magnésio, taq polimerase e primers específicos). Por fim, a reação era realizada em termociclador automático.
Eletroforese	A técnica de Eletroforese consiste em identificar o agente através da leitura de bandas de DNA. Era realizada em um gel de agarose a diferentes concentrações contendo vários poços modelados durante a confecção do mesmo. Em cada poço era colocado uma alíquota da amostra amplificada juntamente com um corante. O gel era submetido a uma corrente elétrica a qual estimulava a corrida do material genético pelo campo eletromagnético. Por fim, o gel era levado ao fotodocumentador e fotografado.
Cultivo celular	No laboratório de biologia molecular essa prática era destinada a proliferação de células in vitro, as quais serviam como substrato para a manutenção dos agentes <i>Toxoplasma gondii</i> e o <i>Neospora caninum</i> . O tipo de células utilizadas no cultivo, eram as células aderentes, que se aderem a superfície de contato das garrafas de cultivo celular. A linhagem de células é a MARC 145, tendo como origem o rim de macacos. O meio utilizado para o cultivo dessas células era o Dulbecco MEM (DMEM), e sua concentração era dependente da atividade que iria ser realizada.
Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).	A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é uma técnica de diagnóstico sorológico, que tem por função a identificação de anticorpos através da reação antígeno-anticorpo. Inicialmente era realizado a diluição da amostra em solução PBS (phosphate buffer

		<p>solution), essa diluição era de acordo com o agente e a espécie analisada. Após ser diluído, 10 µl eram colocados no poço da lâmina de RIFI já sensibilizada com o antígeno, em seguida era feito a primeira incubação dessa lâmina em câmara úmida (37°C/30 min.), depois da incubação realizava-se duas lavagens em solução PBS por 10 minutos cada. Posteriormente era colocado o conjugado (marcado com Isotiocinato de fluoresceína) o qual iria se ligar ao anticorpo caso o animal fosse reagente. Posteriormente as lâminas eram lavadas (10 minutos cada) e incubadas no mesmo binômio tempo-temperatura da anterior. Por fim, as lâminas eram observadas em microscópio de fluorescência.</p>
Sensibilização de lâminas para RIFI		<p>Os antígenos utilizados eram taquizoítos oriundos do cultivo celular os quais estavam diluídos em formol e solução PBS. A técnica consistia em fazer a contagem desse taquizoítos em uma câmara de Neubauer, após contagem era colocado em cada poço da lâmina de RIFI 10 µl da solução, em seguida as lâminas eram levadas para estufa para que ocorresse a secagem, por fim eram fixadas com acetona e armazenadas a - 20°C.</p>
Bioensaio em camundongos		<p>Nesta atividade, os roedores eram inoculados com amostras de agentes infecciosos no intuito de avaliar a virulência da cepa que tinha sido inoculada. Em seguida os mesmos eram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical. Após serem eutanasiados, era colhido um dos hemisférios cerebrais e macerado em solução de PBS com 5% de antibiótico. Esse macerado então era inoculado em outros camundongos ou levados para o cultivo celular <i>in vitro</i>.</p>
ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indireto		<p>O teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) é um método de diagnóstico que tem por objetivo a detecção de anticorpos a partir de reações enzimáticas. No protocolo realizado no laboratório, inicialmente as amostras foram submetidas a uma diluição em solução presente no kit, o processo de diluição é completado após incubação das amostras. Em seguida essas amostras diluídas foram transferidas para a placa de ELISA já sensibilizada com o agente, onde ocorre a segunda incubação que tem por finalidade a ligação do antígeno ao anticorpo, passada essa</p>

incubação foi feito três lavagens da placa, colocado o conjugado (anti-anticorpo) e incubado novamente (esse conjugado se ligará ao anticorpo caso o animal seja positivo). Em seguida foi colocado o substrato e incubado mais uma vez, depois dessa última incubação é colocado a solução de parada e feita a leitura em espectrofotômetro.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

Durante o período de atividades no laboratório de microbiologia, foram processadas um total de 124 amostras. As tabelas 1 e 2 mostram detalhadamente as amostras que foram processadas para exames micológico e bacteriológico segundo espécie e sexo. Já no laboratório de biologia molecular as atividades eram realizadas com amostras provenientes das pesquisas conduzidas no local pelos discentes de pós-graduação.

Tabela 1: Total e percentual de amostras processadas para exame micológico no laboratório de microbiologia segundo espécie e sexo animal.

Espécie Animal	Sexo		Percentual (%)	Total
	M	F		
Felina	31	15	77,97	46
Canina	08	05	22,03	13
Percentual (%)	66,10	33,90	100	-
Total	39	20	-	59

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Tabela 2: Total e percentual de amostras processadas para exame bacteriológico no laboratório**
 2 **de microbiologia segundo espécie e sexo animal.**
 3

Espécie animal	Sexo		Percentual (%)	Total
	M	F		
Canina	28	20	73,85	48
Felina	07	04	16,92	11
Equina	01	00	1,54	01
Caprina	01	00	1,54	01
Ovina	01	00	1,54	01
Bovina	00	02	1,54	01
Avestruz	01	02	3,07	02
Percentual (%)	60	40	100	-
Total	39	26	-	65

4

1 CAPÍTULO II: PESQUISA CIENTÍFICA

2 1 INTRODUÇÃO

3 As infecções por protozoárias em animais são responsáveis por importantes doenças,
4 algumas delas de caráter zoonótico como as leishmanioses, toxoplasmose e malária (Sibley,
5 2004). Estas parasitoses acompanham o homem desde os primórdios e muitas afetam também
6 os animais de companhia como os cães. Recentemente, com as ações antrópicas muitas dessas
7 enfermidades tem reemergido, afetando a população animal e humana em grandes centros
8 urbanos (Arias et al., 1996).

9 Um exemplo clássico é a Leishmaniose Visceral Canina (LVC), zoonose de distribuição
10 mundial, que tem os cães como principais reservatórios no meio urbano (Gramiccia e
11 Grandoni, 2005). No Brasil, o agente etiológico é a *Leishmania infantum* e sua transmissão se
12 dá pela espoliação de flebotômíneos vetores, sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis*, a mais
13 importante de um ponto de vista epidemiológico (Gontijo e Melo, 2004). Clinicamente os
14 animais apresentam diversas manifestações, variando de portadores assintomáticos (Brasil,
15 2014) a animais apresentando uma ampla gama de sinais clínicos, como dermatopatias,
16 onicogribose, alterações oculares e emagrecimento (Ramsey et al., 2010).

17 Sabe-se também que cães podem ser acometidos por alguns protozoários pertencentes
18 ao gênero *Trypanosoma*, sendo a espécie *Trypanosoma cruzi* a mais importante por ser
19 considerada o agente etiológico da doença de Chagas (Roux et al., 2011; Bezerra et al., 2012;
20 Coelho, 2013). Mais de 100 diferentes mamíferos são considerados reservatórios competentes
21 para *T. cruzi*, mas envolvidos principalmente no ciclo silvestre da doença (Teixeira et al.,
22 2009). Os cães por sua vez, desempenham um importante papel no ciclo peri-doméstico
23 atuando como elo entre o meio silvestre e domiciliar (Gürtler e Cardinal, 2015).

24 Além dos agentes supracitados, a infecção em cães por *Babesia* sp. tem sido
25 frequentemente reportada em todo o mundo. *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* são
26 considerados os agentes etiológicos da babesiose canina. A *B. canis* é dividida em três
27 subespécies (*Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*), que são
28 caracterizadas por sua distribuição geográfica, vetor e patogenicidade (Uilenberg et al., 1989).
29 Sabe-se que em quase todo o Brasil a *B. canis* é predominante e frequentemente transmitida
30 pelo carrapato marrom do cão, o *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) (Maroli et al., 1996).

31 Considerando a importância destes patógenos para a saúde única e canina e a presença
32 de condições ambientais favoráveis para proliferação de seus vetores e disseminação dos
33 agentes, objetivou-se neste estudo pesquisar infecções protozoárias em cães domésticos
34 provenientes do Município de Águas Belas, região Nordeste do Brasil.

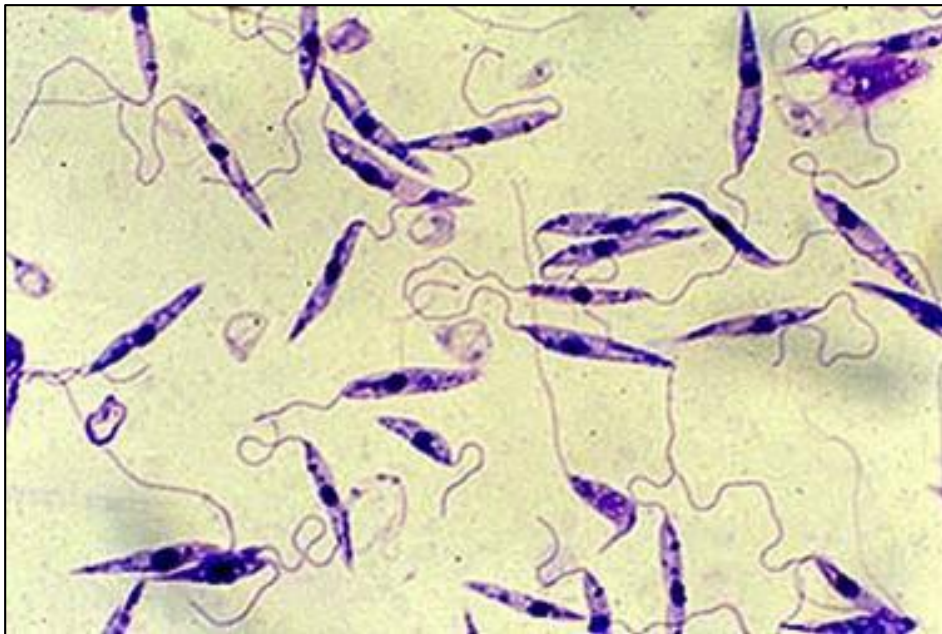
1 2 REVISÃO DE LITERATURA

2 2.1 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

3 2.1.1 Agente etiológico

4 Os agentes responsáveis pela Leishmaniose são protozoários intracelulares que
5 pertencem a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (Dantas
6 Torres, 2006) e subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Lainson et al., 1987). Nas Américas e
7 Europa a espécie responsável pela Leishmaniose Visceral Canina (LVC) pertence ao
8 subgênero *Leishmania*, sendo conhecida como *Leishmania (Leishmania) infantum* (Dantas
9 Torres, 2006).

10 A *Leishmania* apresenta formas distintas no seu ciclo biológico, o que a torna um
11 agente pleomórfico. As formas encontradas são a promastigota (Figura 5) que apresenta um
12 flagelo e é identificada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, e a forma amastigota
13 (Figura 6) que se localiza nos macrófagos de hospedeiros vertebrados (Fortes, 2004).



14

15

Figura 5: Formas promastigotas de *Leishmania* spp. (Fonte: FIOCRUZ)

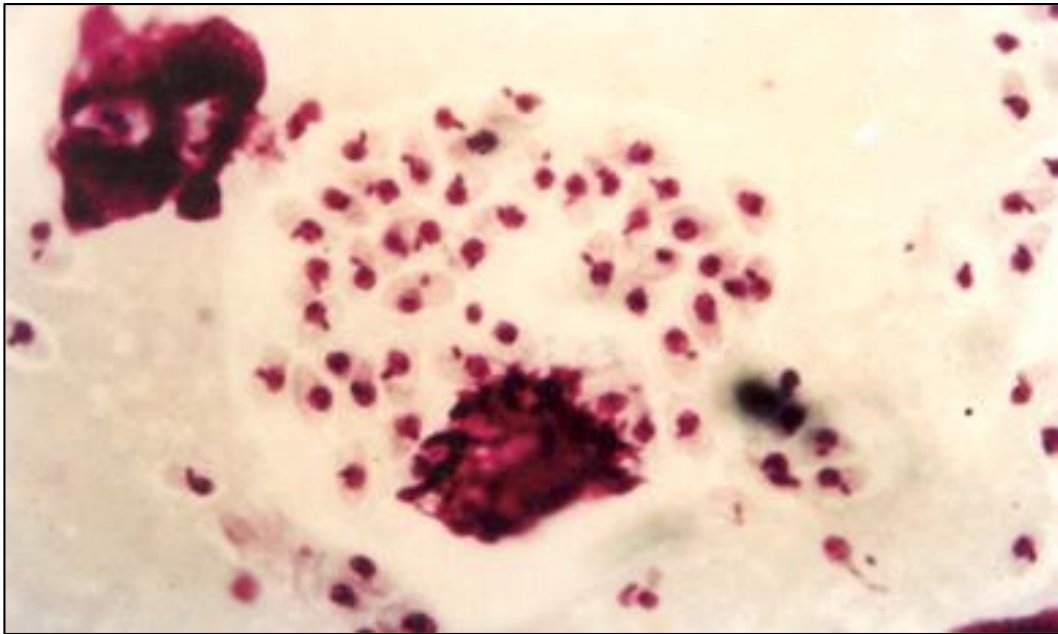


Figura 6: Forma amastigota de *Leishmania* spp. (Fonte: Brasil, 2014)

2.1.2 Distribuição

A Leishmaniose é comumente observada em áreas onde prevalece um clima tropical ou subtropical, pois nessas regiões os vetores estão presentes (Oliveira et al., 2004). Dentro do território brasileiro ela ocorre em locais onde as condições, climáticas, geográficas e sociais são variadas (Harhay et al., 2011). A soro frequência de *Leishmania* spp. têm sido relatada em todo o Brasil (Dantas-Torres, 2008). Historicamente, o Nordeste é a região onde há a predominância de casos de LVC, com prevalências variando de 0,7% a 51,61% (Abreu-Silva et al., 2008; Barboza et al., 2009; Fernandes et al., 2016).

No estado de Pernambuco, estudo realizado pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), obteve uma taxa de infecção em cães de 2,5% (Alexandrino, 2001). No entanto, nesse mesmo estado com o passar dos anos, observa-se uma ampla variação nesta positividade com frequências de 40,3% em Paulista (Dantas-Torres et al., 2006), 19% em Petrolina (Pimentel et al., 2015) e 2,4% (Lins et al., 2018) e 16% em Garanhuns (Santos et al., 2010).

2.1.3 Reservatórios

A infecção causada por esse parasito pode acometer uma ampla variedade de hospedeiros, como mamíferos silvestres e domésticos (Bhargava e Singh, 2012). Dentro do ciclo silvestre, alguns animais apresentam grande importância na epidemiologia, como é o caso dos canídeos silvestres que intermediam o agente para as áreas rurais pelo fato de terem como hábito o deslocamento para essas áreas (Ashford, 2000). Por outro lado, o cão (*Canis*

1 *lupus familiaris*) é o principal reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico (França-
2 Silva et al., 2005). Nesses animais os locais em que se encontra o parasito são as vísceras e a
3 derme, no entanto, o animal que se apresenta infectado pode ou não apresentar sinais clínicos,
4 e os que não apresentam sintomatologia são importantes fontes de infecção para a
5 disseminação do agente (WHO, 2010).

6

7 **2.1.4 Vetores**

8 Os vetores responsáveis pela transmissão do agente aos vertebrados são os insetos
9 hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Figura 7), estes pertencem a ordem Diptera,
10 família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. O seu tamanho varia de 1 a 3 mm, e são
11 encontrados com maior frequência em locais que estejam presentes animais, assim como lixo
12 e matéria orgânica em processo de decomposição (Feliciangele, 2004). A principal espécie
13 responsável pela transmissão no Brasil é a *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912), no
14 entanto, estudo realizado por Missawa et al., (2011), revelou que a espécie *Lutzomyia cruzi*
15 tem grande importância na epidemiologia da LV no estado do Mato Grosso. Além desses
16 vetores, estudos também foram realizados com carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) para
17 saber a importância no ciclo epidemiológico dessa enfermidade (Coutinho et al., 2005;
18 Dantas-Torres, 2006). Outras formas de transmissão já foram também relatadas, como a
19 venérea e a transplacentária (Dantas-Torres, 2006).

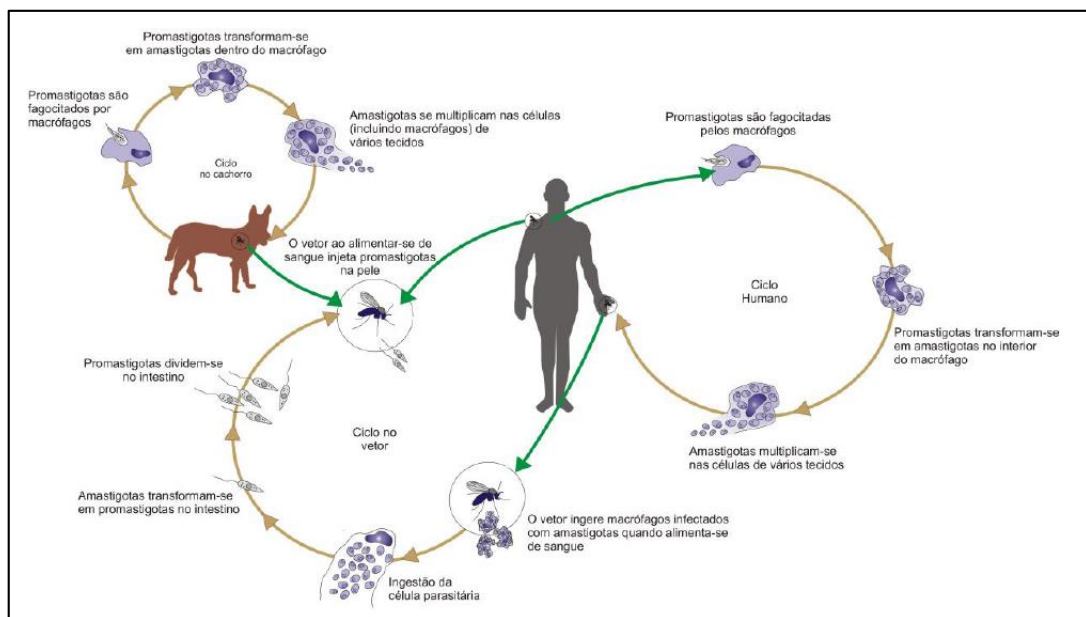


20

Figura 7: Flebotomíneo fêmea ingurgitada (Fonte: Brasil, 2014)

1 2.1.5 Ciclo biológico

2 Para que o ciclo biológico da *Leishmania* aconteça é necessária a participação de um
 3 hospedeiro invertebrado e um vertebrado (Alves e Faustino, 2005). O ciclo é iniciado quando
 4 a fêmea já infectada pelo agente realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado,
 5 ocorrendo no local da inoculação a liberação de saliva com a forma promastigota do parasito.
 6 No ponto inoculado o parasito é fagocitado por macrófagos, onde é transformado para a sua
 7 forma amastigota e realizado sua multiplicação. Após ter um grande número de parasitos
 8 dentro do macrófago, este se rompe liberando os agentes para que outras células possam
 9 fagocitá-los (Figura 8). Além disso, há a migração da forma aflagelada para diversos órgãos
 10 através da via hematogênica, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Brasil, 2006).



11 **Figura 8:** Ciclo biológico da *Leishmania infantum* (Fonte: Adaptado de Almeida, 2017)

12 2.1.6 Sinais clínicos

13 A LVC é uma doença de caráter crônico (Marcondes e Rossi, 2013) podendo se
 14 apresentar de forma assintomática (ausência de sinais clínicos) ou sintomática que se
 15 caracteriza por vários sinais clínicos inespecíficos. Desta forma, 60% dos animais se
 16 apresentam como assintomáticos, e os que apresentam clínica o período de incubação pode
 17 variar de meses a anos (Brasil, 2014). Além dos sinais já citados os animais apresentam
 18 também epistaxe, baço e fígado aumentados, lesões cutâneas e problemas digestivos, nervosos
 19 e renais (Feitosa et al., 2000; Paltrinieri et al., 2010). Ademais, Ramsey et al., (2010)
 20 descreveu como lesões cutâneas a presença de dermatite esfoliativa, alopecia ao redor da
 21 órbita, onicogribose, úlceras nodulares na pele e hiperkeratose de coxim, e claudicação
 22 (Figuras 9,10 e 11).
 23

1



2

3

Figura 9: Crescimento anormal das unhas (Fonte: Brasil, 2006)



4

5

Figura 10: Lesões na face de cão (Fonte: Brasil, 2006)



Figura 11: Cão apresentando emagrecimento (Fonte: Brasil, 2006)

1

2

3 **2.1.7 Diagnóstico**

4

5 O diagnóstico dessa enfermidade pode ser realizado através dos sinais clínicos, exames
6 parasitológicos, sorológicos (Brasil, 2014; Almeida, 2009) e moleculares (Almeida, 2009).
7 Porém, devido ao grande quantitativo de casos assintomáticos, o diagnóstico clínico torna-se

8

9 O diagnóstico parasitológico pode ser realizado a partir da coloração de esfregaços de
10 amostras de tecido hepático, esplênico, da medula óssea e sangue, onde será visualizado a
11 forma amastigota do parasito (Laurenti, 2009; Brasil, 2006). Existe também a possibilidade de
12 realizar a inoculação do parasito em animais de laboratório e os cultivos do parasito *in vitro*,
13 tendo como meios para seu crescimento o *Novy, Mc Neal e Nicolle* (NNN) e *Liver Infusion*
Triptofane (LIT) (Santa-rosa e Oliveira, 1997).

14

15 Já as técnicas sorológicas utilizadas são: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
16 (ELISA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Faria e Andrade, 2012), Teste de
17 Aglutinação Direta (DAT), Fixação de Complemento (FC) (Feitosa et al., 2000), imunoblot
18 e imunocromatografia (Lira, 2005). Porém, dentre estes o Ministério da Saúde preconiza para
19 o diagnóstico a utilização de dois, o imunocromatográfico como triagem e o ELISA para a
20 confirmação (Almeida, 2009; Faria e Andrade, 2012). Na técnica molecular, é realizado a
21 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), sendo sua sensibilidade e especificidade em torno de

22

1 **2.1.8 Profilaxia**

2 No Brasil, para que tenha um efetivo controle da doença, o Ministério da Saúde
3 preconiza que seja realizado testes diagnósticos em humanos para que aqueles que sejam
4 positivos realizem o tratamento, e os cães sororreagentes devem ser eutanasiados, somando-se
5 a essas medidas, ainda é realizado o controle de flebotômico vetor e trabalhos de educação
6 em saúde com a população (Brasil, 2006). A partir de 2016 o Ministério da Agricultura
7 Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou a utilização do medicamento Milteforan para o
8 tratamento da Leishmaniose Visceral em cães, sendo assim outra medida de controle da
9 enfermidade (Brasil, 2016).

10 **2.2 Tripanossomose canina**

11 **2.2.1 Agente etiológico**

12 A Tripanossomose Americana ou Doença de Chagas é a doença causada pelo
13 protozoário *Trypanosoma cruzi* (Rey, 2010; Junqueira, 2011). Esse protozoário pertence a
14 ordem Kinetoplastida (Vickerman, 1994) e família Trypanosomatidae. Seu ciclo biológico é
15 caracterizado por apresentar várias formas (Stevens, 2008) nos vertebrados e invertebrados,
16 sendo elas a forma amastigota (intracelular) e tripomastigota (extracelular) encontradas no
17 hospedeiro vertebrado e epimastigota que se localiza no intestino médio do hospedeiro
18 invertebrado (Brener, 1997).

19 **2.2.2 Distribuição**

20 Estudos sobre a prevalência da Doença de Chagas em cães foi descrita em vários
21 estados do Brasil e observada diferentes prevalências, como no trabalho realizado por Amóra
22 et al. (2006) que constatou uma prevalência de 34% em Mossoró, no Rio Grande do Norte.
23 Outro estudo também no Nordeste, especificamente na Bahia, constatou uma prevalência de
24 0,7% (2/272) de positividade (Leça-Junior et al., 2013). Também foram desenvolvidas
25 pesquisas na região Sudeste do país, a citar uma no município de Araçatuba em São Paulo
26 com uma prevalência de 10,29% (42/408) (Viol et al., 2010). Já na região Centro-Oeste Souza
27 et al. (2007) encontrou uma prevalência de 45,33% reagentes a RIFI e 24% ao ELISA em
28 cães do estado de Mato Grosso do Sul.

29 **2.2.3 Reservatórios**

30 Inicialmente a Doença de Chagas era encontrada comumente no ambiente silvestre,
31 entretanto, com a invasão do homem nesse ambiente ela passou a ter importância em áreas

1 domésticas (Barretto, 1967; Forattini, 1980). Dentro do ciclo biológico é encontrado diversos
2 mamíferos no mundo que servem como reservatórios da doença, incluindo nesse grupo os da
3 ordem Marsupialia que tem como destaque o gênero *Didelphis* por ser o mais importante
4 reservatório da doença, ordem Xenarthra que tem como principais representantes os tatus
5 preguiças e tamanduás, ordem Rodentia representada pelos roedores, ordem Primata incluindo
6 as famílias Cabidae (micos) e Callitrichidae (saguis), ordem Carnivora sendo que o quati, a
7 irara e o cachorro do mato são as espécies que foram encontradas naturalmente infectadas e
8 ordem Chiroptera e Artiodactyla representados pelos morcegos e porcos, respectivamente
9 (Roque e Jansen, 2010).

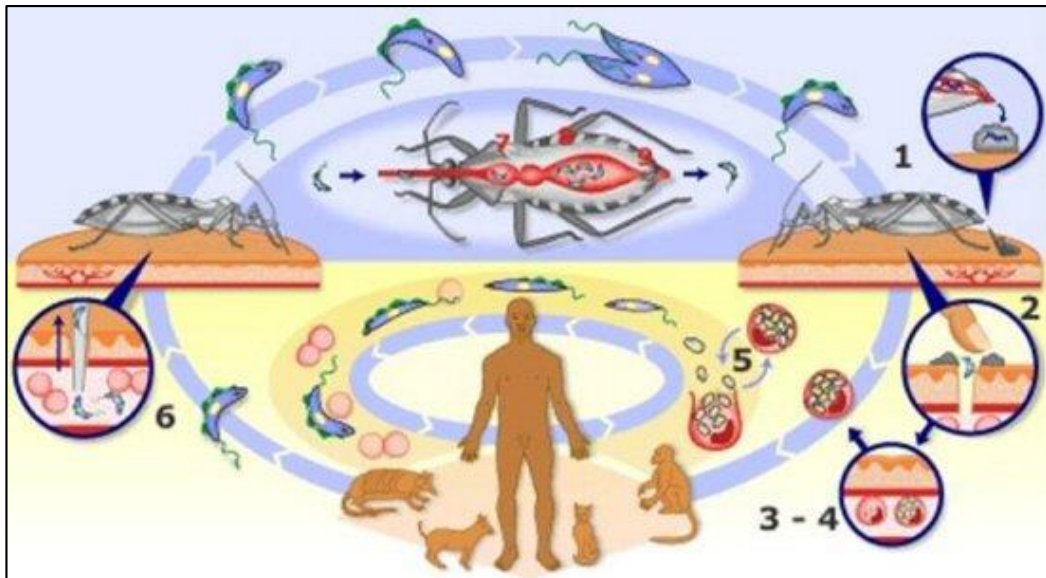
10 **2.2.4 Vetores**

11 Os vetores são insetos conhecidos como triatomíneos, também chamados de barbeiro ou
12 procotó, são hematófagos e estão incluídos na família Reduviidae e subfamília Triatominae
13 (Galvão, 2009). Dentro dessa família as principais espécies que transmitem o agente causador
14 da doença de Chagas na América Latina são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e
15 *Panstrongylus megistus* (Coura, 2015).

16 **2.2.5 Ciclo biológico**

17 A principal via de transmissão do *T. cruzi* é vetorial (Schofield, 1994), entretanto, já
18 foram relatadas outras formas de transmissão, como transplante de órgãos, transfusão de
19 sangue e transplacentária (Forés et al., 2007; Prata, 2001).

20 Para que ocorra a transmissão, o triatomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo no
21 hospedeiro vertebrado, e nesse local libera a forma tripomastigota em suas fezes. Após
22 penetrar as células sanguíneas, essa forma se transforma na forma amastigota e sofre divisão
23 celular por fissão binária, em seguida volta a sua forma tripomastigota a qual é liberada na
24 corrente sanguínea podendo contaminar outros triatomíneos durante o repasto sanguíneo,
25 iniciando assim um novo ciclo (Figura 12) (Nelson e Couto, 2006).



1
2 **Figura 12:** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (Fonte: sobiologia.com.br/)

3 **2.2.6 Sinais clínicos**

4 Nos cães é observado um quadro clínico crônico ou agudo (Barr et al., 1995). Quando o
5 animal apresenta a fase aguda, a sintomatologia observada é uma miocardite decorrente de
6 uma disfunção miocárdica, com várias formas amastigotas nas fibras do musculo cardíaco. Já
7 na fase crônica pode ser sintomática ou latente (indeterminada), na primeira o animal
8 apresentará miocardite crônica, fibrose e insuficiência cardíaca congestiva, enquanto que na
9 forma crônica latente o animal não vai desenvolver nenhum sinal clínico (TECSA, 2018).

10 **2.2.7 Diagnóstico**

11 Para realização do diagnóstico de tripanossomose pode ser utilizado testes
12 parasitológicos diretos (Portela-Lindoso e Shikanai-yasuda, 2003), bem como sorológicos e
13 moleculares (OPAS, 2009).

14 Quando se trata do exame parasitológico direto, alguns inconvenientes podem ser
15 observados nessa técnica, como a forma clínica que o animal apresenta, pois aqueles
16 cronicamente infectados por apresentarem uma parasitemia discreta levam os testes a
17 apresentarem uma baixa sensibilidade frente ao agente, podendo apresentar falsos negativos
18 (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda, 2003). Além disso, os moleculares, como a PCR
19 apresentam altos custos sendo mais aplicados em pesquisas ou como testes confirmatórios
20 (OPAS, 2009).

1 **2.2.8 Profilaxia**

2 A profilaxia da Doença de Chagas está relacionada com o controle do vetor. Dessa
3 forma o Ministério da Saúde recomenda para esse controle a utilização de agentes inseticidas
4 por pessoas treinadas, além de impedir a entrada desses insetos por frestas ou aberturas
5 através do uso de mosquiteiros ou telas metálicas (Brasil, 2018).

6 **2.3 Babesiose Canina**

7 **2.3.1 Agente etiológico**

8 O agente causador da babesiose é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa,
9 Ordem Piroplasmida, Família Babesiidae e gênero *Babesia* (Irwin, 2009). As espécies que
10 podem acometer os cães são a *Babesia canis* e a *Babesia gibsoni*. A espécie *B. canis* ainda é
11 dividida em três subespécies, sendo elas a *B. canis canis* e *B. canis vogeli* (Bowman, 2006)
12 que têm como vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, e *B. canis rossi* transmitida pelo
13 *Haemaphysalis leachi* (Lewis et al., 1996).

14 **2.3.2 Distribuição**

15 A babesiose canina tem sido descrita em todo o país com prevalências variando de
16 7,69% a 57, 9% por PCR e RIFI, respectivamente (Araújo et al., 2015; Galeno et al., 2018).
17 Por exemplo, na Bahia, frequência de 33,95% tem sido observado (Ungar de Sá et al., 2007).
18 Já na região sudeste frequências de 31,44% (61/194) no estado de Minas Gerais (Bastos et al.,
19 2004), e 10,3% em São Paulo através da RIFI têm sido observadas (Dell Porto et al., 1993).

20 **2.3.3 Vetores**

21 Para que a transmissão da *Babesia* spp. ocorra, é necessário a participação de ixodídeos.
22 O *R. sanguineus*, o carrapato marrom do cão, tem sido considerado a principal espécie vetora,
23 entretanto outras espécies podem ter participação, como a *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis*
24 *leachi* e *Hyalomma plumbeum* (Brandão e Hagiwara, 2002; Tilley e Smith, 2003). Já foi
25 demonstrada também a transmissão através de transfusão sanguínea (Stegeman et al., 2003) e
26 congenitamente (Fukumoto et al., 2005).

27 **2.3.4 Ciclo biológico**

28 Para que a transmissão ocorra é necessário que um carrapato infectado realize o repasto
29 sanguíneo em um animal susceptível, nesse momento ocorre a inoculação do agente no
30 animal (Uilenber, 2006). Depois que o carrapato faz o repasto sanguíneo o período de
31 incubação pode variar de 10 dias a 3 semanas (Lappin, 2004). O parasito adentra os

- 1 eritrócitos, onde se multiplica e consequentemente ocasiona a lise dessas células (Ettinger e
- 2 Feldman, 2004), podendo infectar outras hemácias (Irwin, 2010).

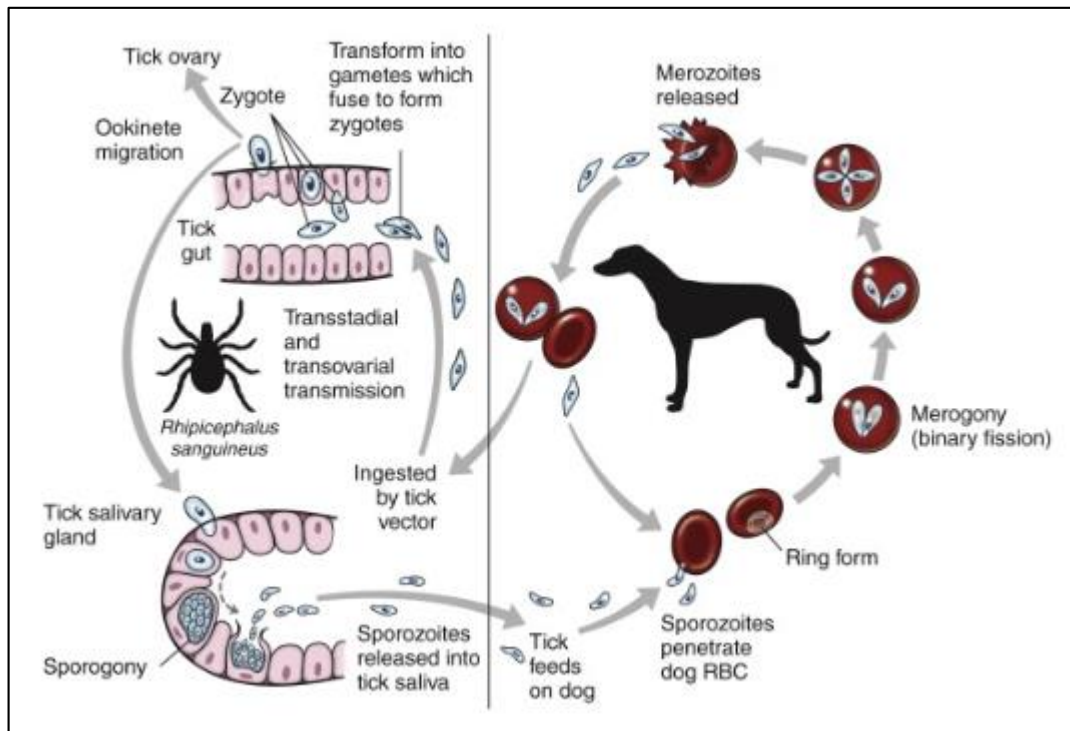


Figura 13: Ciclo biológico da *Babesia* sp. (Fonte: Birkenheuer, A. J., 2014)

2.3.5 Sinais clínicos

Clinicamente os animais podem apresentar-se na condição hiperaguda, aguda, crônica (Nelson e Couto, 2015; Lobetti, 1998) e subclínica (Lobetti, 1998). Dentre os principais sinais observados destacam-se palidez de mucosas, hipertermia, taquipneia, taquicardia, icterícia e anorexia (Taboada e Merchant, 1997; Lobetti, 1998). Em situações mais graves os animais podem apresentar até insuficiência renal aguda, distúrbios hepáticos e de coagulação, comprometimento cardíaco, sinais nervosos, hemoconcentração, anemia icterícia e choque (Lobetti, 1998; Lobetti et al., 2002) (Figuras 11 e 12).



Figura 14: Mucosa pálida (Fonte: Pinto, 2009)

1

2

3 **2.3.6 Diagnóstico**

4 O diagnóstico é realizado através de exame parasitológico (Nelson e Couto, 2015),
5 testes sorológicos como Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio
6 Imunoenzimático, Fixação de Complemento (FC), Aglutinação em capilar e
7 Imunocromatografia (Aboge et al., 2007) e também por testes moleculares a citar a Reação
8 em Cadeia de Polimerase (PCR) que é utilizado com maior frequência em levantamentos
9 epidemiológicos (Böse et al., 1995).

10 Para realização do exame parasitológico é necessário a confecção de esfregaços
11 sanguíneos com sangue periférico e posterior coloração por alguma das técnicas de
12 Romanowsky. Ao microscópio serão observados os protozoários dentro das hemácias, quando
13 se apresentam aos pares se tem a sugestão de infecção por *B. canis*, enquanto que por *B.*
14 *gibsoni* o parasitos se encontram separados (Nelson e Couto, 2015). Apesar dessa técnica
15 possuir baixo custo e especificidade elevada, quando o animal apresenta uma parasitemia
16 branda a sensibilidade torna-se baixa (Dantas-Torres e Figueredo, 2006).

17 Em relação aos testes sorológicos citados, são indicados quando o animal está na fase
18 crônica ou sem apresentar sinais clínicos (Aboge et al., 2007). A RIFI é a que tem uma maior
19 utilização para o diagnóstico, pois apresenta sensibilidade elevada e é de fácil realização
20 (Böse et al., 1995; Aboge et al., 2007). Já a técnica molecular (PCR) apresenta alta

1 sensibilidade e especificidade, e isso faz com que ela seja utilizada nos casos agudos, crônicos
2 e também naqueles animais sem sinais clínicos dando bons resultados (Macintire et al., 2002).

3 **2.3.7 Profilaxia**

4 A principal forma para prevenir a doença é realizando o controle dos vetores
5 (Vasconcelos, 2010), através do uso de acaricidas. A utilização de vacina elaborada com
6 antígeno de *B. canis* tem sido explorada na Europa, mas apresenta pouca importância no
7 Brasil (Matias, 2011).

1 3 OBJETIVOS

2 3.1 Objetivo geral

- 3 • Pesquisar protozoários em cães domésticos provenientes do município de Águas
4 Belas, Nordeste do Brasil.

5 3.2 Objetivos específicos

- 6 • Detectar a exposição de cães domésticos a *Leishmania infantum* através de teste
7 imunocromatográfico.
- 8 • Pesquisar *Babesia* sp. em cães domésticos através de microscopia sanguínea.
- 9 • Pesquisar *Trypanosoma* spp. em cães domésticos através de microscopia sanguínea.

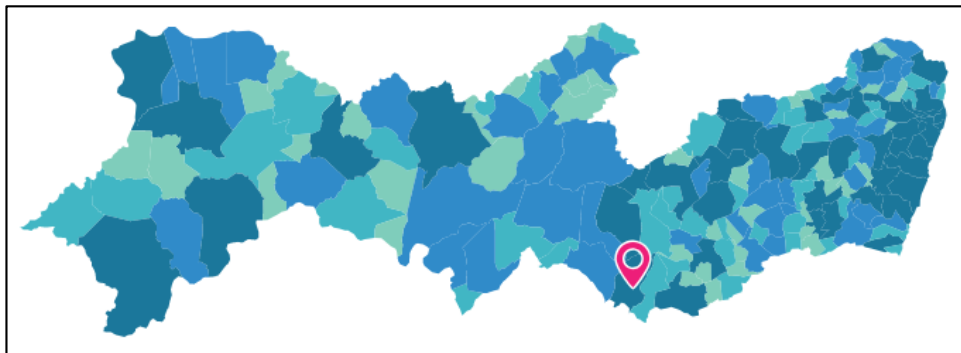
1 4 MATERIAL E MÉTODOS

2 4.1 Aspectos éticos

3 Todos os procedimentos realizados neste estudo foram autorizados pela Comissão de
4 Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (número da licença: 128/2017).

5 4.2 Área de estudo

6 O estudo foi realizado no Município de Águas Belas (Latitude: 09°06'41'' Sul e
7 Longitude: 37°07'23'' Oeste), situado na região do Agreste Meridional, estado de
8 Pernambuco (Figura 15). A cidade se encontra à 315 km da capital pernambucana, uma área
9 territorial é de 887,5 km², e população estimada de 43.195 pessoas (IBGE, 2018).



10 **Figura 15:** Município de Águas Belas, Pernambuco (Fonte: IBGE)

11

12 4.3 Obtenção de amostras

13 Amostras sanguíneas (n = 73) foram coletadas de cães de diferentes idades, sexo e raças
14 variadas (Figura 16). Inicialmente cada animal foi contido fisicamente, e a venopunção
15 cefálica realizada após assepsia do local. O material obtido foi armazenado em tubos plásticos
16 contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) e armazenados em caixas isotérmicas
17 (4 a 8°C) até o processamento laboratorial.

18 As coletas foram realizadas mediante a autorização dos tutores através do Termo de
19 Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I).



Figura 16: Coleta de sangue (Fonte – Arquivo pessoal)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

4.4 Processamento laboratorial

4.4.1 Teste imunocromatográfico para *Leishmania infantum* (TR-DPP® Leishmaniose Visceral Canina Biomanguinhos)

Para realização do diagnóstico da Leishmaniose o material utilizado foi o kit TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina da Bio-Manguinhos. O kit é composto por suporte DPP, tampão de corrida, alça coletora descartável de volume de 5 μ L e lanceta descartável. Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.2 Pesquisa de *Babesia* sp. e *T. cruzi*

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados utilizando 20 μ L de sangue total. A alíquota foi colocada sobre a lâmina, espalhada com auxílio de lamínula, em seguida o material secou a temperatura ambiente por 2 minutos. Por fim, as lâminas foram coradas pelo método panótico rápido e observadas em microscópio ótico (40 e 100X).

4.5 Análise dos dados

Os dados foram analisados através da estatística descritiva para obtenção das frequências absolutas e relativas.

1 5 RESULTADOS

2 De todas as amostras analisadas 20,55% (15/73) foram reagentes ao teste
3 imunocromatográfico para detecção de anticorpos anti-*L. infantum*. Nenhum animal resultou
4 positivo a pesquisa de *Babesia* sp. e/ou *T. cruzi*.

5

6 6 DISCUSSÃO

7 Este estudo avaliou a presença de infecções por protozoárias em cães domésticos
8 provenientes de uma região semiárida do Nordeste do Brasil.

9 Em um total de 20,55% (15/73) dos animais estudados foram detectados anticorpos
10 anti-*L. infantum*. Diversos estudos sorológicos conduzidos em todo o Brasil tem reportado
11 diferentes frequências para LVC. Por exemplo, estudos conduzidos no Maranhão reportaram
12 uma soro-frequência de 51,61% (Abreu-Silva et al., 2008), no Rio Grande do Norte de 34%
13 (Amora, et al., 2006) e em Pernambuco de 19% (Pimentel et al., 2015). As diferenças
14 observadas em regiões distintas do Brasil são decorrentes de situações epidemiológicas
15 diversas e diferença nos testes diagnósticos empregados.

16 É importante destacar que o teste aqui empregado se trata de uma técnica qualitativa,
17 indicando apenas exposição dos animais ao agente etiológico. O TR-DPP® Leishmaniose
18 Visceral Canina Biomanguinhos é recomendado pelo Ministério da Saúde como um teste de
19 triagem, sendo empregado em diversos inquéritos sorológicos no Brasil. O teste DDP® utiliza
20 a proteína recombinante K39 (rK39) específica para *L. infantum* que tem sido amplamente
21 avaliada no diagnóstico da LV canina (Burns-Jr et al., 1993). A sensibilidade e especificidade
22 dos testes imunocromatográficos, que utilizam o antígeno recombinante rK39 apresentam
23 sensibilidade que variam de 89-98% e especificidade de 97-100% (Carvalho et al., 2003;
24 Chappuis et al., 2006).

25 De um ponto de vista epidemiológico, os achados desse estudo servem como alerta para
26 a atual situação da LVC na região Nordeste do Brasil. Sabe-se que o município de Águas
27 Belas tem vivido um recente aumento no número de casos humanos, onde 12 casos foram
28 confirmados de 2006 a 2015 (SINAN, 2015). Dados sobre os casos caninos são inexistentes
29 na área de estudo, mas é sabido que os casos em cães normalmente precedem os casos em
30 humanos. Além disso, é importante destacar que a área apresenta condições sanitárias
31 deficientes com presença de lixo acumulado e animais errantes, fator importante para
32 disseminação de vetores e patógenos de importância em Saúde Pública (Pimentel et al., 2015).

33 Neste estudo, nenhum dos animais apresentou infecção por *Babesia* sp. e/ou
34 *Trypanossoma cruzi*. No entanto, o teste aqui empregado (microscopia) apresenta baixa

1 sensibilidade, sendo possível a detecção destes agentes apenas em estágios agudos da doença.
2 Na verdade, estes animais quando cronicamente infectados desenvolvem uma parasitemia
3 branda, dificultando a detecção do agente.

4 Conclui-se que cães domésticos residentes em Águas Belas estão expostos a *L. infantum*
5 e podem atuar como importantes indicadores da circulação do agente etiológico em uma
6 população animal. Os aqui obtidos são essenciais e servem de alerta para o serviço em saúde,
7 sobretudo considerando que a infecção canina precede a infecção humana.

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 Devido a presença de cães reagentes para Leishmaniose Visceral Canina, é importante
3 que as autoridades sanitárias realizem as medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde para
4 o controle desta enfermidade. Além disso, é de grande valia a realização de programas de
5 educação sanitária dentro do município para que a população tenha conhecimento de tal
6 doença. Em se tratando da tripanossomose e babesiose canina, é interessante destacar que
7 outros estudos com técnicas diagnósticas mais sensíveis devem ser conduzidas na tentativa de
8 elucidar a real situação epidemiológica no local.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 8 REFERÊNCIAS

- 2 Aboge, G.O.; Jia, H. Kuriki, K.; Zhou, J; Nishikawa, Y.; Igarashi, I; Fujisaki, K; Suzuki, H;
3 Xuan, X. Molecular characterization of a novel 32-kDa merozoite antigen of *Babesia gibsoni*
4 with a better diagnostic performance by enzyme-linked immunosorbent assay. **Parasitology**,
5 134: 1185-1194, 2007.
- 6 Abreu-Silva, A.L.; Lima, T.B.; Macedo, A.A.; Moraes-Júnior, F.J.; Dias, E.L.; Batista, Z.S.;
7 Calabrese, K.S.; Moraes, J.L.P.; Rebêlo, J.M.M.; Guerra, R.M.S.N.C. Soroprevalência,
8 aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados
9 e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil.
10 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 17(1): 197-203, 2008.
- 11 Alexandrino, A.C. **Diagnóstico e controle da leishmaniose visceral: considerações sobre**
12 **Pernambuco**. Dissertação de tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco,
13 Recife, 2001.
- 14 Almeida, A. **Inquérito soropidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por**
15 **PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso**. Dissertação de tese de mestrado. Universidade
16 Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2009.
- 17 Alves, L.C.; Faustino, M.A.G. Leishmaniose visceral canina. **Manual da Schering-Plough**,
18 São Paulo, 2005. 14 p.
- 19 Amóra, S.S.A. **Epidemiologia da Leishmaniose e Tripanossomíase Canina no Município**
20 **de Mossoró, Rio Grande do Norte**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do
21 Ceará, 2006.
- 22 Araujo, A.C.; Silveira, J.A.; Azevedo, S.S.; Nieri-Bastos, F. A.; Ribeiro, M. F.; Labruna, M.
23 B.; Horta, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of
24 Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(5): 456-461, 2015.
- 25 Arias, J.R.; Monteiro, P.S.; Zicker, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in
26 Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 2(2): 145-146, 1996.
- 27 Ashford, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International**
28 **Journal for Parasitology**, 30(12-13): 1269-1281, 2000.
- 29 Barboza, D.C.P.M.; Leal, D.C.; Souza, B.M.P.S.; Carneiro, A.J.B.; Gomes Neto, C.M.B.;
30 Alcânata, A.C.; Julião, F.S.; Moura, S.A.B.; Peralva, L.M.P.; Ferreira, F.; Franke, C.R.
31 Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do

- 1 Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 10
2 (2): 434-447, 2009.
- 3 Barr, S.C.; Van Beek, O.; Carlisle-Nowak, M.S.; Lopez, J.W.; Kirchhoff, L.V.; Allison, N.;
4 Zaac, A.; de Lahunta, A. Schlafer, D.H.; CRandall, W. T. *Trypanosoma cruzi* infection in
5 Walker hounds from Virginia. **American Journal of Veterinary Research**, 56(8): 1037-
6 1044, 1995.
- 7 Barretto, M.P. Estudos sobre reservatórios e vetores naturais do *Trypanosoma cruzi*. XVII.
8 Contribuição para o estudo dos focos naturais da Tripanosomose Americana, com especial
9 referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira**
10 **de Medicina Tropical**, 1(2): 23-36, 1967.
- 11 Bastos, C.V.; Moreira, S.M.; Passos, L.M.F. Retrospective Study (1998-2001) on canine
12 babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Annals New York Academy of**
13 **Sciences**, 1026(1): 158-160, 2004.
- 14 Bezerra, W.S.; Meneguetti, D.U.O.; Camargo, L.M.A. A busca de fármacos para tratamento
15 da tripanossomíase americana: 103 anos de negligência. **Revista Saúde**. 38(1): 9-20 2012.
- 16 Bhargava, P.; Singh, R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs.
17 **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2012(626838): 1-13, 2012.
- 18 Bowman, D.D. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 8nd ed. São Paulo: Manole, 2006.
19 422p.
- 20 Böse, R.; Jorgensen, W.K.; Dalgliesh, R.J.; Friedhoff, K.T.; de Vos, A.J. Current state and
21 future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 57(1-3):
22 61-74, 1995.
- 23 Brandão, L.; Hagiwara, M.K. Babesiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, 41(): 50-59,
24 2002.
- 25 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **NOTA TÉCNICA N°**
26 **11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA**. Disponível em: <[http://www.sbmt.org.br/portal/wp-](http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf)
27 [content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf](http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf)>. Acesso em: 09 Jan. 2018.
- 28 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância
29 Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília:**
30 **Ministério da Saúde. Brasília, 2006** Disponível em:

- 1 <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer
2 [al.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer)>. Acesso em: 22 Dez. 2018.
- 3 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância
4 Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília:**
5 **Ministério da Saúde. Brasília, 2014** Disponível em:
6 <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer
7 [al_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer)>. Acesso em: 22 Dez. 2018.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e**
9 **prevenção, 2018.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de>
10 [chagas](http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de)>. Acesso em: 18 Dez. 2018.
- 11 BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**
12 **(SINAN), 2015.** Disponível em: <<http://sinan.saude.gov.br/sinan/login/login.jsf>>. Acesso em:
13 23 Dez. 2018.
- 14 Brener Z. “*Trypanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo,*” Scielo Books, pp. 24-31,
15 1997.
- 16 Burns-Jr, J.M.; Shreffler; W.G.; Benson, D.R.; Ghalib, H.W.; Badaro, R.; Reed, S.G.
17 Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects
18 specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the**
19 **National Academy of Sciences.** 90(2): 775–779, 1993.
- 20 Carvalho, S.F.G.; Lemos, E.M.; Corey, R.; Dietze, R. Performance of recombinant K39
21 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **The American journal of**
22 **tropical medicine and hygiene,** 68(3): 321-324, 2003.
- 23 Chappuis, F.; Rijal, S.; Jha, U.K.; Desjeux, P.; Karki, B.M.S.; Koirala, S.; Loutan, L.;
24 Boelaert, M. Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral
25 leishmaniasis in rural Nepal. **Tropical Medicine & International Health,** 11(1), 31-40,
26 2006.
- 27 Coelho, A.R.B. **Tripanossomíase americana: uma revisão com ênfase na Medicina**
28 **Veterinária.** Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Agronomia e Medicina
29 Veterinária - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

- 1 Coura, J.R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral
2 transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110(3):
3 277–282, 2015.
- 4 Coutinho, M.T.Z.; Bueno, L.L.; Sterzik, A.; Fujiwara, R.T.; Botelho, J.R.; De Maria, M.;
5 Linardi, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the
6 epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 128(1-2): 149-155,
7 2005.
- 8 Dantas-Torres, F.; Figueredo, L.A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. **Veterinary**
9 **Parasitology**, 141(3-4): 197-203, 2006.
- 10 Dantas-Torres, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae)
11 transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog?.
12 **Veterinary Parasitology**, 136(3-4): 379-380, 2006.
- 13 Dantas-Torres, F.; de Brito, M.E.F.; Brandão-Filho, S.P. Seroepidemiological survey on
14 canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary**
15 **Parasitology**, 140(1-2): 54-60, 2006.
- 16 Dantas-Torres, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vector**, 1(25): 1 -17,
17 2008.
- 18 Dell'Porto, A.; Oliveira, M.R.; Miguel, O. *Babesia canis* in stray of city of São Paulo.
19 Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect
20 fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2(1): 37-40,
21 1993.
- 22 Ettinger, S.; Feldman, E. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do**
23 **gato**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 2254p.
- 24 Faria, A.R.; Andrade, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços
25 tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 3(3): 47-57, 2012.
- 26 Feitosa, M.M.; Ikeda, F.A.; Luvizotto, M.C.R.; Perri, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com
27 leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**,
28 5(28): 36-44, 2000.
- 29 Feliciangeli, M.D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and**
30 **Veterinary Entomology**, 18(1): 71- 80, 2004.

- 1 Fernandes, A.R.F.; Pimenta, C.L.R.M.; Vidal, I.F.; Oliveira, G.C.; Sartori, R.S.; Araújo, R.B.;
2 Melo, M.A.; Langoni, H.; Azevedo, S.S. Risk factors associated with seropositivity for
3 *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraíba, Brazil. *Revista*
4 **Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 25(1): 90-98, 2016.
- 5 Forattini, O P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no
6 Brasil. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 14: 265-299, 1980.
- 7 Forés, R.; Sanjuán, I.; Portero, F.; Ruiz, E.; Regidor, C.; López-Vélez, R.; Linares, M.; Gil,
8 S.; Ojeda, E.; Krsnik, I.; Bautista, G.; Vallejo, C.; García-Marco, J.; Fernández, M.N.;
9 Cabrera, J.R. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. **Bone Marrow**
10 **Transplantation**, 39(2): 127-128, 2007.
- 11 Fortes, E. **Parasitologia Veterinária**. 4nd ed. São Paulo: Ícone, 2004. 607p.
- 12 França-Silva, J.C.; Barata, R.A.; Costa, R.T.; Monteiro, E.M.; Machado-Coelho, G.L.; Vieira,
13 E.P.; Prata, A; Mayrink, W.; Nascimento, E.; Fortes-Dias, C.L.; Silva, J.C.; Dias, E.S.
14 Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral
15 leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vetinary**
16 **Parasitology**, 131(3-4): 213-220, 2005.
- 17 Fukumoto, S.; Suzuki, H.; Igarashi, I.; Xuan, X. Fatal experimental transplacental *Babesia*
18 *gibsoni* infections in dogs. **International journal for parasitology**, 35(9): 1031-1035, 2005.
- 19 Galeno, L.S.; Moreno, B.F.S.; Alves, A.M.; Fonseca, W.C.; Durães, C.C.; Abreu, D.M.;
20 Silva, I.M.R.; Ferreira, P.T.R.; Chaves, D. P. (2018). Detecção molecular de *Babesia canis*
21 *vogeli* em cães da cidade de São Luís–MA, Brasil. **PUBVET**, 12(6): 1-4, 2018.
- 22 Galvão, CR. **Estudo dos fatores associados à infecção chagásica em área endêmica do Rio**
23 **Grande do Norte**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
24 2009.
- 25 Gontijo, C.M.F.; Melo, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e
26 perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7: 338-349, 2004.
- 27 Gürtler, R.E.; Cardinal, M.V. Reservoir host competence and the role of domestic and
28 commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, 151:32–50, 2015.
- 29 Gramiccia, M.; Grandoni, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to
30 disease control. **International Journal for Parasitology**, 35(11-12): 1169-1180, 2005.

- 1 Harhay, M.O.; Olliaro, P.L.; Costa, D.L.; Carlos, C.H.N. Urban Parasitology: visceral
2 leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**. 27(9): 403-409, 2011.
- 3 Irwin, P.J. Canine Babesiosis: from molecular taxonomy to control. **Parasite & Vectors**,
4 2(1): 1-9, 2009.
- 5 Irwin, P.J. Canine Babesiosis. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. 40(6): 1141-
6 1156, 2010.
- 7 Junqueira, A.C.V. **Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para**
8 **microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública**. 2nd ed. 2011. 284p.
- 9 Lainson, R.; Ryan, L.; Shaw, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and
10 some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo**
11 **Cruz**, 82(3): 421-424, 1987.
- 12 Lappin, M.R. Infecções protozoárias e mistas. In: Ettinger, S.J; Feldman, E.C. **Tratado de**
13 **medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. Rio de Janeiro: Guanabara
14 Koogan, 2004. cap.87.
- 15 Laurenti, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose
16 visceral americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, 6(67): 13-23, 2009.
- 17 Lewis, B.D.; Penzhorn, B.L.; Lopez-Rebollar, L.M.; de Waal, D.T. Isolation of South African
18 vector-specific strain of *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, 63(1-2) 9-16, 1996.
- 19 Leça Júnior, N.F.; Almeida, V.A.; Carvalho, F.S; Albuquerque, G.R.; Silva, F.L. First report
20 of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from southern Bahia, Brazil.
21 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 22(1) 182-185, 2013.
- 22 Lira, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina: avaliação do desempenho dos kits**
23 **EIE-Leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-visceral-canina-**
24 **Bio-Manguinhos**. Dissertação de doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, 2005.
- 25 Lins, T.N.B.; Souza, I.B.D.; Barros, G.M.M.D.R.; Santos, C.V.B.D.; Alves, L.C.; Carvalho,
26 G.A.D.; Ramos, R.A.N. Seroprevalence and spatial distribution of canine leishmaniasis in an
27 endemic region in Brazil: how has the situation changed after 10 years?. **Revista da**
28 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 51(5), 680-682, 2018.
- 29 Lobetti, R.G. Canine babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the**
30 **Practicing Veterinarian**, 20, p.418–430, 1998.

- 1 Lobetti, R.; Dvir, E.; Pearson, J. Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. **Journal of**
2 **Veterinary Internal Medicine**, 16(1): 63-68, 2002.
- 3 Lutz, A.; Neiva, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus*
4 existentes no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 4(1): 84-95, 1912.
- 5 Macintire, D.K.; Boudreaux, M.K.; West, G.D.; Bourne, C.; Wright, J.C.; Conrad, P.A.
6 *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. **Journal of the**
7 **American Veterinary Medical Association**, 220(3): 325-329, 2002.
- 8 Marcondes, M.; Rossi, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of**
9 **Veterinary Research and Animal Science**, 50(5): 341-352, 2013.
- 10 Matias, L. **NOBIVAC® PIRO – Vacina inativada contra a babesiose canina**. 2011.
11 Disponível em: <[https://sites.google.com/site/saudecanina/vacinas-e-vacinacao/nobivac-piro-](https://sites.google.com/site/saudecanina/vacinas-e-vacinacao/nobivac-piro-vacina-inativada-contra-a-babesiose-canina)
12 [vacina-inativada-contra-a-babesiose-canina](https://sites.google.com/site/saudecanina/vacinas-e-vacinacao/nobivac-piro-vacina-inativada-contra-a-babesiose-canina)> Acesso em: 23 Dez. 2018.
- 13 Maroli, M.; Khoury, C.; Frusteri, L. Diffusione della zeca del cane (*Rhipicephalus sanguineus*
14 Latreille, 1806) in Italia: un problema di salute pubblica. **Annali dell’Istituto Superiore di**
15 **Sanità**, 32(3): 387-397, 1996.
- 16 Missawa, N.A.; Veloso, M.A.E.; Maciel, G.B.M.L.; Michalsky, É.M.; Dias, E.S. Evidência de
17 transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de
18 Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(1): 76-78,
19 2011.
- 20 Nelson, R.W.; Couto, C.G. **Tripanossomíase Americana. Medicina Interna de Pequenos**
21 **Animais**. 3nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- 22 Nelson, R.W.; Couto, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5nd ed. Amsterdam:
23 Elsevier Editora, 2015, 1512p.
- 24 Oliveira, C.L.; Teixeira, M.J.; Gomes, R.; Barral, A.; Brodskn, C. Animal models for
25 infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discovery Today: Disease**
26 **models**, 1(1): 81-6, 2004.
- 27 OPAS. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas**
28 **aguda transmitida por alimentos, 2009**. Disponível em:
29 <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_prevencao_doenca_chagas.pdf>.
30 Acesso em: 23 Dez. 2018.

- 1 Paltrinieri, S.; Solano-Gallego, L.; Fondati, A.; Lubas, G.; Gradoni, L.; Castagno, M.; Crotti,
2 A.; Maroli, M.; Oliva, G.; Roura, X.; Zatelli, A.; Zini, E. Guidelines for diagnosis and clinical
3 classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical**
4 **Association**, 236(11): 1184-1191, 2010.
- 5 Pimentel, D.D.S.; Ramos, R.A.N.; Santana, M.D.A.; Maia, C.S.; Carvalho, G.A.D.; Silva,
6 H.P.D.; Alves, L.C. Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area
7 of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 48(4), 491-493, 2015.
- 8 Portela-Lindoso, A.A.B.; Shikanai-Yasuda, M.A. Doença de Chagas crônica: do
9 xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde**
10 **Pública**, 37: 107-115, 2003.
- 11 Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious**
12 **Diseases**, 1(2): 92-100, 2001.
- 13 Ramsey, I.; Moore, D.G.; Shaw, S. Sistemas Hematopoiético e Linforreticular. In: Ramsey,
14 I.K.; Tennant, B.J. **Manual de Doenças Infecciosas de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca,
15 2010. p.69-94.
- 16 Rey, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
17 860p.
- 18 Roura, X.; Sanchez, A.; Ferrer, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by polymerase chain
19 reaction technique. **The Veterinary Record**, 144(10), 262-264, 1999.
- 20 Roux, E.; Venâncio, A.F.; Girres, J.F.; Romaña, C.A. Spatial patterns and eco-
21 epidemiological systems – part I: multi-scale spatial modelling of the occurrence of Chagas
22 disease insect vectors. **Geospatial Health**, 6(1): 41-51, 2011.
- 23 Souza, A.I. **Estudo clínico da infecção por *T. cruzi* em cães residentes em uma área rural**
24 **de Mato Grosso do Sul, Brasil**. Dissertação de doutorado. Universidade Estadual Paulista
25 “Julio de Mesquita Filho, 2007.
- 26 Santos, J.M.L.; Dantas-Torres, F.; Mattos, M.R.F.; Ragner, F.; Lino, L.; Andrade, L.S. S.;
27 Souza, R.C.A.; Brito, F.L.C.; Brito, M.E.F.; Brandão-Filho, S.P.; Simões-Mattos, L.
28 Prevalência de anticorpos antileishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de
29 Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(1): 41-45, 2010.
- 30 Santa Rosa, I.C.A.; Oliveira, I.D. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose
31 reemergente. **Clínica Veterinária**, 2(11): 24-28, 1997.

- 1 Schofield, C. J. **Tiatominae. Biologia y Control**, p. 5-30, 1994.
- 2 Sibley, L.D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, 304(5668): 248-253, 2004.
- 3 Stegeman, J.R.; Birkenheuer, A.J.; Kruger, J.M.; Breitschwerdt, E.B. Transfusion associated
4 *Babesia gibsoni* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical**
5 **Association**. 222(7): 959-963, 2003.
- 6 Stevens, J.R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic
7 trypanosomes. **Parasite**, 15(): 226–232, 2008.
- 8 Taboada, J.; Merchant, S.R. Infecções por protozoários e por outras causas. In: Ettinger, S.J.;
9 Feldman, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4nd ed. São Paulo: Manole, p.554-
10 572, 1997.
- 11 TECSA, Diagnóstico Pet. Tripanossomíase canina – *Trypanosoma cruzi*. Disponível em:
12 <http://www.tecsa.com.br/assets/pdfs/Tripanossomiase_canina.pdf>. Acesso em: 23 Dez.
13 2018.
- 14 Teixeira, A.R.; Gomes, C.; Lozzi, S.P.; Hecht, M.M.; Rosa, A.C.; Monteiro, P.S.; Bussacos,
15 A.C.; Nitz, N.; McManus, C. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its
16 host, and health. **Cadernos de Saúde Pública**, 25(1): 32–44, 2009.
- 17 Tilley, L.P.; Smith Jr, F.W.K. **Consulta Veterinária em 5 minutos: Espécies Canina e**
18 **Felina**. 2^a ed. Editora Manole, p. 480; 1215, 2003.
- 19 Uilenberg, G. Babesia – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 138(1-
20 2): 3–10, 2006.
- 21 Uilenberg G.; Franssen F.F.J.; Perie M.; Spanjer, A.M.M. Three groups of *Babesia canis*
22 distinguished and a proposal for nomenclature. **Veterinary Quarterly**, 11(1): 33–40, 1989.
- 23 Ungar de Sá, M.F.M.; Ungar de Sá, J.E.; Bittencourt, D.V.V.; Bispo, A.C.D.; Régis, A.M.M.;
24 Souza Filho, N.J.; Gomes Neto, C.M.B.; Souza, B.M.P.S.; Bittencourt, T.C.C; Franke, C.R.
25 Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e
26 Região Metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, 8(3): 178-
27 183, 2007.
- 28 Vasconcelos, M.F. **Estudo da infecção por *Babesia spp.* em cães da região periurbana de**
29 **Brasília, Distrito Federal**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina
30 Veterinária, Universidade de Brasília, 2010.

- 1 Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os
2 vetores. **Vetores da doença de Chagas no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010.**
- 3 Vickerman, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International**
4 **Journal for Parasitology**, 24(8): 1179–1201, 1994.
- 5 Viol, M.A. Lima, V.M.F.; Aquino, M.C.C; Gallo, G.; Alves, I.P.; Generoso, D.; Langoni, H.;
6 Nunes, C.M.; Perri, S.H.V.; Lucheis, S.B.; Brescian, K.D.S. Ocorrência de *Trypanosoma* spp.
7 em Cães no Município de Araçatuba, SP. In: Conbravet, 38, 2010. **Resumos.** 2010. p. 1-3.
- 8 World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a Meeting of the WHO
9 Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization,
10 **WHO Technical Report Series**, 2010.

1 **ANEXO I**

2 **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

3 **(DEPARTAMENTO E/OU UNIDADE ACADÊMICA)**

4 **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

5
6 Convidamos o (a) Sr (a) _____ para participar da Pesquisa
7 intitulada _____, sob a responsabilidade do pesquisador
8 _____, a qual pretende _____. Sua
9 participação com seu animal _____ é voluntária e se dará por
10 meio de (inserir a forma de participação do sujeito da pesquisa explicando claramente em que
11 consiste tal participação).

12 Os riscos decorrentes da participação dos seu (s) animal (is) na pesquisa são
13 _____. Se você aceitar participar, os resultados decorrentes do
14 estudo com seu (s) animal (is) estará contribuindo para _____.

15 Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar
16 participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da
17 pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem prejuízo a
18 sua pessoa.

19 O (a) Sr (a) não terá despesas e também não receberá remuneração. Os resultados da
20 pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e de seu (s) animal (is) não serão
21 divulgadas, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá
22 entrar em contato com o pesquisador no endereço (inserir endereço profissional), pelo
23 telefone (81)_____.

24 **Consentimento Pós-Informação**

25 Eu, _____, fui
26 informado sobre o projeto _____ que o pesquisador quer fazer e
27 porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em
28 participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

29 Data: ___/___/____

30
31 Assinatura do participante:

32 Assinatura do Pesquisador Responsável: