

ARTIGO ORIGINAL

DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA PELA TÉCNICA DE PCR EM SANGUE PERIFÉRICO EM ASSOCIAÇÃO COM OS TESTES RIFI E ELISA EM CÃES DE PALMAS, TO.**CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS BY PCR IN PERIPHERAL BLOOD ASSOCIATED WITH RIFI AND ELISA TESTS IN DOGS FROM PALMAS CITY, TOCANTINS STATE.** **ACESSO LIVRE**

Citação: Noleto RV, Oliveira Junior WP, Bigeli JG, Teles NMM, Oliveira JDD (2017) Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pela técnica de PCR em sangue periférico em associação com os testes RIFI e ELISA em cães de Palmas, TO. Revista de Patologia do Tocantins, 4(4): 2-6.

Instituição: ¹Farmacêutica-Bioquímica, Mestre em Ciências da Saúde. Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (Lacen-TO). Palmas-TO, Brasil; ²Biólogo, Doutor em Genética e Bioquímica. Laboratório de Biotecnologia - Universidade Federal do Tocantins. Palmas-TO, Brasil; ³Biólogo (Bacharel), Mestre em Agroenergia. Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins, Núcleo Técnico das Leishmanioses. Palmas-TO, Brasil; ⁴Bióloga (Bacharel), Mestre em Genética e Bioquímica. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular e Molecular Bioagentes Patogênicos. Ribeirão Preto-SP, Brasil; ⁵Bióloga, Doutora em Genética e Bioquímica. Laboratório de Biotecnologia - Universidade Federal do Tocantins. Palmas-TO, Brasil.

Autor correspondente: Jaqueline Das Dores Dias Oliveira;
jaquelinedias@uft.edu.br

Editor: Guedes V. R. Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

Publicado: 01 de dezembro de 2017.

Direitos Autorais: © 2017 Noleto et al. Este é um artigo de acesso aberto que permite o uso, a distribuição e a reprodução sem restrições em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Tocantins, TO.

Conflito de interesses: os autores declararam que não existem conflitos de interesses.

Rosalba Valadares Noleto¹, Waldesse Piragé de Oliveira Junior², Julio Gomes Bigeli³, Natália Melquie Monteiro Teles⁴, Jaqueline Das Dores Dias Oliveira⁵.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é uma doença grave, potencialmente fatal que acomete os mamíferos. Causada por protozoário da família Trypanosomatidae, gênero Leishmania, espécie Leishmania (L.) infantum chagasi. Transmitida pelo inseto flebotomíneo Lutzomyia longipalpis popularmente conhecido por mosquito palha, birigui e cangalhinhas, é considerada endêmica em vários países tanto em áreas rurais quanto urbanas. No Brasil vem se expandindo, atualmente encontra-se distribuída nas cinco regiões. No município de Palmas está disseminada em toda a sua extensão, classificando-o como de transmissão intensa. **MÉTODOS:** Nesse contexto, foi definida e avaliada a prevalência do parasita Leishmania (L.) infantum chagasi em cães errantes, capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (Palmas – TO), utilizando diferentes metodologias diagnósticas, ELISA, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerização em cadeia (PCR). No estudo, 195 cães foram capturados em diferentes áreas do município e avaliados pelas três metodologias. **RESULTADOS:** Das 195 amostras submetidas à análise pelas três metodologias houve concordância de 85,64% entre RIFI e ELISA, 54,87% entre RIFI e PCR. **CONCLUSÕES:** A PCR mostrou ser uma potencial ferramenta auxiliar no diagnóstico da doença, associada a pelo menos uma metodologia de triagem. Quanto à regionalidade da doença, verificou-se variabilidade dos resultados entre as regiões estudadas no plano diretor, onde o maior número de casos positivos ocorreu nas regiões que correspondem ao setor sul de Palmas.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; reação em cadeia da polimerase; doenças endêmicas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral Leishmaniasis (LV) or kalazar is a potentially fatal disease that affects mammals. Caused by a Trypanosomatidae protozoan, genus Leishmania, species Leishmania (L.) infantum chagasi. Transmitted by the phlebotomine Lutzomyia longipalpis known as mosquito straw, birigui and cangalhinhas, leishmaniasis is endemic in rural and urban areas of several countries. In Palmas city it is disseminated in all its extension, classifying it as an area of intense transmission. **METHODS:** The Leishmania (L.) infantum chagasi prevalence in dogs captured by the Zoonoses Control Center (Palmas - TO) was evaluated using different diagnostic methodologies: ELISA, RIFI and polymerase chain reaction (PCR). In this study 195 dogs were captured in different areas of the city and evaluated by the three methodologies. **RESULTS:** Of the 195 samples analysed by the three techniques, there was agreement of 85.64% between RIFI and ELISA, 54.87% between RIFI and PCR. **CONCLUSIONS:** The PCR proved to be a potential auxiliary tool in the diagnosis of the disease, associated to at least one screening methodology. Regarding the regionality of the disease, the results between the regions studied in the master plan were variable and the highest number of positive cases occurred in the regions corresponding to the southern sector of Palmas.

Keywords: Visceral leishmaniosis; polymerase chain reaction; endemic diseases.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa, parasitária e sistêmica de evolução crônica causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* descrito por Ross há mais de um século^{1,2}. Também conhecida como Calazar Neotropical é amplamente distribuída na Europa, Oriente Médio, Ásia, na África e nas Américas, sendo nesta última descrita em pelo menos 12 países, onde 90% dos casos ocorridos no Brasil, principalmente na Região Nordeste³. Na região Norte do Brasil, o Tocantins é destaque; em 2016 230 novos casos foram confirmados de Leishmaniose em humanos, cinco morreram e 8.706 cães foram diagnosticados com calazar onde 3.118 casos foram encontrados em Palmas.

O Ministério da Saúde recomenda para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, o uso do Ensaio Imunoenzimático (ELISA), e a reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ambos apresentando alta sensibilidade e especificidade para amostras de soro³. Entretanto, o método de amplificação gênica por PCR tem se mostrando cada vez mais útil tanto no diagnóstico como na identificação das espécies de *Leishmania*, porque é rápido, sensível, dispensa a cultura de parasitas e pode ser realizado a partir do sangue como também de punção aspirativa de medula e linfonodos^{4,5}. Dessa forma, profissionais e pesquisadores têm dificuldades na escolha de um método apropriado, simples, sensível e específico, que possibilite o diagnóstico não apenas dos casos avançados da doença, mas também dos iniciais, quando ainda são oligossintomáticos e assintomáticos³.

Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência da *L. chagasi* em cães capturados pelo centro de Controle de Zoonoses (Palmas – TO), utilizando como metodologias diagnósticas ELISA, RIFI e PCR. Além disso, os dados também foram associados às regiões de captura dos cães amostrados, definindo os *hot-spot*. A eficácia da PCR como ferramenta diagnóstica, em comparação com os outros métodos, também foi avaliada a fim de proporcionar aos organismos e gestores envolvidos com o controle da doença subsídios para a implantação de novas abordagens diagnósticas que possam efetivamente contribuir com a prevenção e controle da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Área estudada

O estudo foi realizado na cidade de Palmas (10°12'46"S; 48°21'37"W), capital do estado do Tocantins, localizada na região Norte do Brasil no centro do estado, com área de 2.219 Km² e população de 286 mil habitantes. A área apresenta clima tropical, com duas estações bem definidas durante o ano, temperatura média de 26 a 30 °C, com umidade relativa do ar média de 76%.

Estratificação do município

Para o estudo, o município de Palmas foi dividido em 7 sub-regiões de acordo com a posição geográfica, nível de urbanização e barreiras de vegetação nativa para permitir o agrupamento dos resultados e suas respectivas análises. As regiões formadas com o agrupamento foram: R-1, composta por quadras situadas na região noroeste e nordeste de

Palmas; R-2, composta por quadras da região central do município de Palmas; R-3, composta por quadras das regiões sudeste e sudoeste da capital; R-4, composta pelo Aurenys III; R-5, composta pelos Aurenys I, II e IV, além dos setores Irmã Dulce, Santa Fé I e II, e Morada do Sol I e II; R-6, composta por Taquari, Taquaralto e setores do entorno; e R-7, composta por Taquaruçu.

Captura dos cães e coleta do material biológico

Foram avaliados 195 cães errantes capturados em várias regiões de Palmas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Palmas (CCZ – Palmas). A seleção dos cães foi aleatória e foram analisadas as características clínicas dos animais, bem como seu aspecto, buscando classificá-los em assintomáticos (sem sinais clínicos de LV) ou sintomáticos (com três ou mais sinais característicos da doença). A punção do sangue venoso foi efetuada em uma das patas dianteiras (braquial) ou traseiras dos animais com o auxílio de um torniquete, ou ainda na jugular, nos cães de menor porte. Foram coletados 3 a 4 mL de sangue total por punção venosa com auxílio de seringa de 5 mL e aliqotado em tubos estéreis tipo Falcon contendo 500 µL de EDTA (27mM) como anticoagulante destinado às análises de PCR. As amostras para as análises sorológicas foram obtidas da coleta de aproximadamente 2 mL de sangue total acondicionado em tubo de ensaio estéril sem anticoagulante e centrifugado à 385 x g por 10 minutos para obtenção do soro para as reações de ELISA e RIFI. O soro obtido foi armazenado em micro tubos com capacidade para 2 mL e levados ao freezer a – 20°C para posterior análise.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

As análises sorológicas foram realizadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Tocantins (LACEN-TO). Para isso foi utilizado o *Kit* EIE – LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (Bio-Manguinhos) e as reações foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante e como preconizadas pelo Ministério da Saúde. Inicialmente, 5 µL das amostras e dos controles positivo e negativo foram diluídos em 500 µL do diluente de amostra/conjugado, sendo este previamente preparado em quantidade suficiente para o número de reações (1:100). Foram distribuídos 100 µL da diluição em microplacas e as mesmas foram seladas com folha adesiva e incubadas a 37°C por 30 minutos em estufa. O tampão de lavagem foi diluído em água destilada em quantidade suficiente para o número de reações.

Para a lavagem dos orifícios foi utilizada lavadora automática de microplacas programada para aspirar todo conteúdo do orifício e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício) aguardando um intervalo de 30 segundos entre cada lavagem. Enquanto a lavagem era realizada, o conjugado era diluído no diluente de amostra/conjugado preparado anteriormente proporcional à quantidade de reações, o mesmo foi bem homogeneizado e distribuído 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício. Selou-se novamente a placa e incubou a 37°C por 30 minutos em estufa. Minutos antes do uso o substrato foi preparado em quantidade adequada ao número de reações e distribuído 100 µL em todos os orifícios rapidamente e foi incubado à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Logo após este período a reação foi bloqueada, adicionando

50 µL de ácido sulfúrico a 2 M em todos os orifícios. Em seguida procedeu-se a leitura.

Para leitura das reações foi utilizada leitora de ELISA (espectrofotômetro para microplacas) no modo automatizado, equipado com filtro de 450nm e sem a utilização do filtro de referência (620-630nm). Todas as reações foram realizadas em duplicata para maior segurança dos resultados.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A técnica de RIFI também foi realizada nas dependências do LACEN-TO utilizando o Kit Imunofluorescência Indireta (IFI) para Diagnóstico da Leishmaniose Canina – Bio-Manguinhos, o qual detecta a presença de anticorpos IgTotal em soros caninos contra *Leishmania*. O kit foi titulado antes do uso de acordo com recomendações do fabricante. Foi feito um protocolo para determinar o número de lâminas preparadas, de acordo com o número de amostras. Foram adicionados 10 µl do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo. Incubou-se overnight a temperatura ambiente para a secagem. As amostras foram diluídas em Tampão Fosfato (PBS) nas diluições 1/40 e 1/80 e os controles positivos e negativos na diluição 1/40 e os mesmos estiveram presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura. Posteriormente, foram adicionados 10 µl das diluições anteriores nos orifícios determinados no protocolo e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, lavados em PBS 3 vezes por 5 minutos cada vez, enxaguados rapidamente em água destilada e secos por 10 minutos a 37°C. O conjugado foi diluído na proporção adequada para as reações e conforme titulação prévia e 15 µL foram adicionados em cada orifício da lâmina, incubada por 30 minutos em câmara úmida, após este período procedeu-se a lavagem como anteriormente e depois das lâminas secas, foi adicionado uma gota de glicerina tamponada em cada orifício, cobriu-se com lamínulas, mantendo-as em abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura. A leitura foi realizada com o auxílio de um microscópio de imunofluorescência que utiliza a incidência de luz ultravioleta e objetiva de 40X para leitura, sendo considerados reagentes os soros com títulos $\geq 1/40$ comparados aos controles positivos e negativos.

Isolamento e extração do DNA total

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) da UFT. Inicialmente, as amostras de sangue foram ressuspendidas na proporção 1:1 (v/v) em solução salina 0,9% (m/v) e centrifugadas à 285 x g por 10 min. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em tampão de lise de hemácias (Sacarose 5mM; Tris-HCl 10mM, pH 7,5; MgCl₂ 5mM) também na proporção 1:1 (v/v), com centrifugações à 385 x g por 10 min. Em seguida, foram adicionado ao *pellet* tampão de lise nuclear (Tris 10mM, pH 8,0; EDTA 5mM; NaCl 10mM), e proteinase K (10mg/mL). As amostras foram incubadas em Banho-Maria à 37°C por 3 horas. Em seguida, o DNA foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio⁶, com precipitação em Etanol 100% e NaCl 5M, e ressusensão em TE + RNase 10mg/ml. Posteriormente foi realizada a qualificação por eletroforese e quantificação por espectrofotometria e então as amostras foram armazenadas em freezer a -20° C até a análise diagnóstica por PCR.

PCR primer-específica

Para a PCR foi adotado o par de iniciadores RV1 (5' – CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G – 3') e RV2 (5' – CCA CCT GGG CTA TTT TAC ACC A – 3')^{7,8} a fim de detectar a seqüência alvo de 145 pares de bases (pb) do fragmento LT1, situado no minicírculo do DNA do cinetoplasto, do complexo *L. donovani*. As reações foram realizadas contendo 2U de Taq DNA polimerase, solução tampão da Taq à 1X, MgCl₂ à 1,5 mM, desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) à 0,2 mM além de DNA de cada indivíduo e água ultra pura para um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em termociclador (PxE 0.2 ThermalCycler – Thermo Electron Corporation). Como controle negativo foi utilizada água ultra pura como amostra na reação, e na reação de controle positivo utilizou-se o DNA de *Leishmania chagasi* extraído da cepa MHOM/BR2000/MER2, FIOCRUZ/BA (*linhagem Merivaldo, IOC-LC2455, isolada de um paciente com leishmaniose visceral em uma área endêmica de Jequié-BA*)⁹. Por fim os *amplicons* foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% (m/v), corados com brometo de etídio (0,2µg/ml) e visualizados sob luz UV em câmara de transluminação. Os indivíduos foram diagnosticados como positivos por PCR, com a visualização dos *amplicons* em triplicata.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada pelo programa BioEstat 4.0. Para a comparação dos resultados, utilizou-se o teste de qui-quadrado e o coeficiente Kappa. Em todas as análises, os resultados foram considerados significativos para valores de $p \leq 0,05$. Para a classificação de co-positividade e co-negatividade dos valores obtidos no teste kappa foi utilizada a metodologia de Jodas e colaboradores¹⁰.

RESULTADOS

Caracterização dos cães

Dentre os cães em estudo, 91 (46,6%) eram fêmeas e 104 machos (53,3%). Dos 195 cães 48 (24,6%) eram assintomáticos, e, do restante sintomático, 91 (46,6%) eram oligossintomáticos e 56 (28,7%) polissintomáticos. Dos 195 cães, em 60 (30,7%) foram encontrados ectoparasitos pelo corpo e em 135 (69,2%) estes não foram encontrados.

Comparação entre ELISA e RIFI

A tabela 1 mostra os resultados dos cães para as técnicas de ELISA e RIFI e as co-positividade e co-negatividade entre as mesmas. Comparando-se os resultados concordantes nas técnicas de ELISA e RIFI, observou-se que 119 (61,0%) amostras foram positivas e 48 (24,6%) amostras apresentaram resultados negativos para ambas as técnicas, 6 (3,0%) foram negativas para RIFI e positivas para ELISA e 22 (11,2%) foram negativas para ELISA e positivas para RIFI. Admitindo o teste RIFI como padrão ouro, conforme preconiza o Ministério da Saúde, a co-positividade de ELISA/RIFI foi de 95,2% e a co-negatividade foi de 68,5% o que mostra uma concordância observada de 85,6% frente à concordância esperada de 56,2%, onde o valor do coeficiente kappa (k) foi de 0,6715 o que representa uma concordância substancial entre os resultados

negativos e positivos, considerando que o valor de p foi altamente significativo ($p < 0,0001$).

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos pela ELISA e RIFI.

ELISA	RIFI		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	119	6	125
NEGATIVO	22	48	70
TOTAL	141	54	195

Comparação entre RIFI e PCR

Das 195 amostras, 64 (32,8%) foram positivas para as duas técnicas e 44 (22,5%) foram negativas para ambas, resultando em um total de 108 amostras concordantes (Tabela 2). No entanto, 77 (87,5%) amostras apresentaram resultado positivo no RIFI e negativo na PCR e 10 (12,5%) apresentaram resultados negativo no RIFI e positivo na PCR, representando um total de 87 amostras discordantes entre as técnicas. A partir da análise dos dados foi constatada uma co-positividade de 86,48% e co-negatividade de 36,36%.

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos pela PCR RIFI.

PCR	RIFI		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	64	10	74
NEGATIVO	77	44	121
TOTAL	141	54	195

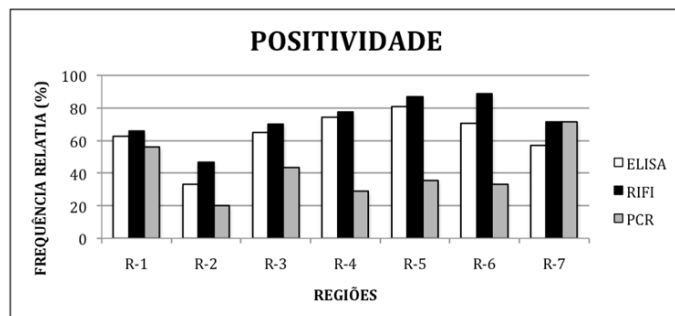


Figura 1. Frequência relativa (%) por regiões pelas técnicas de ELISA, RIFI e PCR. Os números acima de cada coluna indicam os casos positivos.

Estratificação da cidade de Palmas-TO

A análise pelo teste de qui-quadrado (χ^2) para comparação das ocorrências de LV entre as regiões estratificadas do município, considerando p igual 0,05, mostrou que em Palmas há alta ocorrência do parasitismo (Figura 1). Apesar deste fato, houve diferença significativa de positividade entre as regiões em relação à ELISA com predominância de casos na região 5 (80,6%) enquanto que a região 2 (33,3%) apresentou o menor número de casos. Para RIFI, a região 2 (46,6%) também apresentou menos casos, enquanto a região 6 (88,8%) maior número. Na PCR, também houve variação, porém a região 7 (71,4%) destacou-se com o maior número de casos e a região 2 (20,0%) a que apresentou menor número de casos positivos. Portanto, a ocorrência de leishmaniose no

grupo de animais (195) onde foram aplicadas as metodologias ELISA, RIFI e PCR, foi de 39 (20%) animais negativos para todas as técnicas, 156 (80%) positivos em pelo menos uma delas e 59 (30,2%) animais positivos nas três técnicas.

DISCUSSÃO

Távora e colaboradores¹¹ em seu trabalho no município de Campus dos Goytacazes no Rio de Janeiro em 2007 encontraram resultados similares aos descritos aqui anteriormente, com RIFI e ELISA apresentando percentuais consideravelmente altos de co-positividade e co-negatividade, refletindo uma boa concordância entre as técnicas diagnósticas, o que já era esperado. Segundo Riera e colaboradores¹², resultados positivos em métodos imunológicos não representam necessariamente uma infecção ativa, pois pode ser indício de exposição prévia ou um contato com a *Leishmania*, particularmente em áreas endêmicas, assim como um resultado negativo não afirma ausência de infecção, principalmente em quadros assintomáticos. Disso, a razão pela qual deve-se associar mais de um método diagnóstico para maior probabilidade de acerto no resultado.

As amostras positivas em RIFI e negativas na PCR indicam que foram detectados anticorpos para *Leishmania* no exame sorológico e, no entanto, não houve detecção do DNA do parasita no cão. Este fato, conforme é sugerido em outros estudos^{13,14}, pode estar associado à produção de anticorpos para outros parasitas que podem interferir na reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose. Outra possibilidade seria a permanência de anticorpos circulantes no sangue periférico mesmo após a eliminação do parasito. Outros estudos demonstraram que a sensibilidade e especificidade da PCR dependem de alguns fatores como os *primers* (iniciadores), o protocolo de extração do DNA e o tipo da amostra clínica^{5,15}. Reithinger e colaboradores¹⁶ relatam que a quantidade de parasitas no sangue periférico tende a ser menor que em medula óssea, baço ou aspirado de linfonodo. No entanto, a coleta de sangue periférico não oferece riscos ao animal, por ser menos invasiva, permite análise em amostragem de maior volume e reduz erros na obtenção das amostras.

Quanto às amostras em que foram detectados DNA da *Leishmania* por PCR e na RIFI não apresentaram reatividade, pode ser justificado pela imunodeficiência de alguns animais e a inabilidade de produzir quantidade suficiente de anticorpos, que vem de encontro com os dados obtidos por Reale e colaboradores¹⁷.

Com relação aos resultados levando-se em consideração as regiões de Palmas, os mesmos concordam com os encontrados por Gloria (2006, não publicado) onde a região sul de Palmas apresentou maior incidência de casos, assim como apresentou semelhança aos descritos por Bigeli¹⁸ em 2008 para o mesmo município.

Para melhor definir a origem da discordância entre os métodos diagnósticos e aumentar a confiabilidade dos mesmos, faz-se necessário o acompanhamento dos animais suspeitos nas metodologias por um período maior de tempo. Isto não foi possível neste trabalho devido às limitações do tratamento epidemiológico recebido pelos animais da

pesquisa junto ao CCZ, muitos dos quais foram sacrificados. Além disso, deve-se ter infraestrutura adequada para o acompanhamento clínico do desenvolvimento da doença nos animais.

CONCLUSÕES

A região avaliada no estudo é realmente endêmica com incidência superior a 80% de animais positivos para *Leishmania* em pelo menos uma das três técnicas e superior a 21,4% positivados em todas as metodologias. A maior incidência da doença concentra-se na região sul do município, onde há maior população e menos investimentos em infraestrutura urbana.

A PCR mostrou-se uma ferramenta adicional e útil ao diagnóstico convencional, pois pode esclarecer os problemas diagnósticos resultantes da baixa sensibilidade do exame ao microscópio e o baixo valor preditivo positivo e negativo da sorologia, normalmente atribuído a anticorpos persistentes ou imunossupressão, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gontijo CMF, Melo CM. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004 7: 338-349.
- 2- Bastien P, Blaineau C, Pages M. *Leishmania* sex, lies and karyotype. Parasitol. Today. 1992; 8: 174-177.
- 3- Brasil. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - Dept. de vig. E epidemiologia- 3a imp. Brasília – DF, 2006.
- 4- Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. Ciência e Cultura. 2003; 1: 34-37.
- 5- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. J Clin Microbiol. 2001 Feb; 613-617.
- 6- Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- 7- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology. 2002; 125: 197-207.
- 8- Lachaud L, Cmarchergui-hammami S, Chabbert E, et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002; 40: 210-215.
- 9- Paranhos-Silva M, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira GGS, et al. Skin Reactions to Thimerosal and *Leishmania* in Dogs from a Leishmaniasis Endemic Area: it is Better to Keep them Apart. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (5): 679-681.
- 10- Jodas CRP, Rapoport A, Souza RP, et al. Análise da concordância intra e inter-observadores na detecção das fraturas da face por meio da tomografia computadorizada. Revista Brasileira de Cirurgia Cabeça Pescoço. 2009; 38: 26-36.
- 11- Távora MPF, Pereira MAVC, Silva VL, et al. Estudo de validação comparativa entre técnicas ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacases-RJ. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2007; 40: 482-483.
- 12- Riera C, Fisa R, Udina M, et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 98: 102-110.
- 13- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 71-80.
- 14- Gontijo CMF, Melo CM. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7: 338-349.
- 15- Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, et al. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. J Clin Microbiol. 2000; 38(2): 748-751.
- 16- Reithinger R, Espinoza JC, Courtenay O, et al. Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass-Screening Tool To Detect *Leishmania (Viannia)* spp. In Domestic Dogs (*Canis familiaris*). J Clin Microbiol. 2003; 41: 1486-1493.
- 17- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. J Clin Microbiol. 1999; 37(9): 2931-2935.
- 18- Bigeli JG, Oliveira Júnior WP, Teles NMM. Diagnosis of Leishmania (*Leishmania*) chagasi infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2012 Feb; 45(1):18-23.