

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

VIVIANE MEDEIROS SILVA

**ESTUDO DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI:
IXODIDAE) COMO POTENCIAL VETOR DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL.**

BRASÍLIA
2012

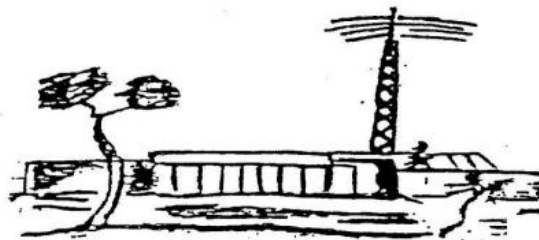
**ESTUDO DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI:
IXODIDAE) COMO POTENCIAL VETOR DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL.**

VIVIANE MEDEIROS SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves



Brasília

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1001230.

Silva, Viviane Medeiros.
SM586 Estudo de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) como potencial vetor de leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil / Viviane Medeiros Silva. -- 2012.
xix, 139 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, 2012.

Inclui bibliografia.

Orientação: Gustavo Adolfo Sierra Romero ; Co-orientação: Rodrigo Gurgel Gonçalves.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose visceral. 3. Cão. 4. Carrapato. 5. Diagnóstico molecular. 6. *Rhipicephalus sanguineus*. I. Romero, Gustavo Adolfo Sierra. II. Gonçalves, Rodrigo Gurgel. III. Título.

CDU 616.993.161

**ESTUDO DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI:
IXODIDAE) COMO POTENCIAL VETOR DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL.**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Filipe Dantas Torres – Membro titular
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz - PE

Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo – Membro titular
Universidade de Brasília

Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero - Presidente
Universidade de Brasília

Dra. Maria Imaculada Barboza Muniz Junqueira – Membro suplente
Universidade de Brasília

20 de julho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre guiando meus passos e iluminando meu caminho. Mesmo quando tudo pareceu obscuro, quando pareceu não existir solução para os problemas, Ele estava ali, mostrando-me que os obstáculos estão à nossa frente para serem superados, e que as dificuldades fazem parte de um aprendizado sem fim.

Em 2009, logo que terminei a especialização, decidi que queria cursar o mestrado em Medicina Tropical, e comecei a trabalhar para alcançar este objetivo. Foram muitos percalços, principalmente na vida profissional, mas que não me impediram de ir em busca do meu ideal, pelo contrário, só me fortaleceram e me deram mais vontade de vencer. E o ditado prevaleceu: “uma porta se fecha, mas várias janelas se abrem!”

Quando tive a ideia de escrever o projeto sobre *R. sanguineus* relacionados com a transmissão da LVC, não tinha noção do quanto seria difícil, mas ao mesmo tempo, extremamente prazeroso e gratificante.

Agradeço à doutora Maria Teresa Zanatta Coutinho, que mesmo sem me conhecer, gentilmente incentivou-me a estudar sobre o tema e colaborou com envio de vários arquivos para que eu pudesse iniciar a escrita do projeto.

O agradecimento especial é ao professor Gustavo Adolfo Sierra Romero, que em 2010 aceitou me orientar, mas principalmente, acreditou no meu potencial como estudante. Foram pouco mais de dois anos de convivência, mas que renderam ensinamentos valiosos e eternos. Sou grata por toda a colaboração, aprendizado e confiança em mim depositada, espero ter correspondido.

Ao professor Rodrigo Gurgel Gonçalves, meu co-orientador, sempre atencioso e disposto a ajudar. Obrigada pela colaboração intelectual e financeira.

Ao professor Filipe Dantas-Torres que colaborou no envio de vários arquivos, principalmente o de dissecação dos carrapatos, o qual garantiu que eu realmente aprendesse a técnica.

À professora Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo pela simpatia, gentileza e colaboração durante a fase final dos experimentos.

À Universidade de Brasília pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários da DIVAL pela receptividade e extrema colaboração, em especial à Lucia Emilia d'Andurain Morales, que foi um anjo da guarda durante o

período em que realizei as coletas dos carrapatos. Agradeço também à Isabele Gonçalves Sobral, Laurício Monteiro Cruz, Ivanildo de Oliveira Santos, Maria Isabel Rao Bofill, e todos os técnicos e veterinários que se envolveram direta e indiretamente neste trabalho.

A todos os funcionários do NMT/UnB que acompanharam minha rotina e colaboraram para que o ambiente fosse o mais agradável e descontraído possível, em especial à Myssula Fernandes, Adriana Carvalho, Mariângela Sousa, Nelson Pelet, Shigueru Ofugi, Leandro Nascimento, Olean Oliveira e José Barbosa Bezerra. Agradeço também à Renata Ribeiro de Sousa, técnica do laboratório de leishmanioses do NMT/UnB, pela colaboração nos experimentos iniciais.

Às minhas queridas amigas Leny Nunes e Joyce Mendes pela parceria durante estes anos, e principalmente pela amizade verdadeira que vem se fortalecendo cada vez mais.

À Marthina Gomes de Miranda, minha ouvinte e confidente, amiga-irmã de todas as horas.

Ao Edvar Schubach pela prestatividade e pelo fornecimento dos kits para realização dos testes rápidos utilizados neste trabalho.

Aos meus pais Lúcia Maria de Medeiros Silva e José Ribeiro da Silva por me darem o que eu tenho de mais valioso: “Educação”. Vocês são meu espelho de sabedoria e maturidade.

Ao meu irmão José Ribeiro Júnior, irmão de formação e profissão, pelo companheirismo, amizade e colaboração na realização dos testes rápidos.

Ao meu esposo Rômulo Miranda de Oliveira, pela paciência, compreensão, colaboração, e pelo amor que demonstra todos os dias quando simplesmente diz: “Eu acredito em você!”.

À minha vó Antônia da Conceição Medeiros, presença constante em minha vida, que mesmo “lá de cima” está sempre enchendo minha vida de luz e alegria.

***Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem
tão pequeno que não possa ensinar.***

Píndaro.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características comparativas entre as três famílias de carrapatos (Acari: Ixodida). Fonte: Barros-Battesti, 2006.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações na mistura utilizada no processo de amplificação de 120pb de kDNA de *Leishmania* spp.

Tabela 2. Etapas do processo de amplificação de 120pb da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp.

Tabela 3. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações na mistura utilizada no processo de amplificação de 234pb do gene hsp70 de *Leishmania* spp.

Tabela 4. Etapas do processo de amplificação de 234pb do gene hsp70 de *Leishmania* spp.

Tabela 5. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações na mistura utilizada no processo de amplificação de 330pb da região conservada de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 6. Etapas do processo de amplificação de 330pb da região conservada de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 7. Resultados da morfometria comparativa entre os estágios de desenvolvimento das formas do tripanossomatídeo encontrado em um carrapato macho coletado em cão proveniente de área endêmica de leishmaniose visceral no Distrito Federal, Brasil, 2011.

Tabela 8. Resultados da detecção de DNA pela PCR em *pools* de glândulas salivares e intestinos de *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães provenientes de área endêmica de leishmaniose visceral no Distrito Federal, Brasil, 2011.

Tabela 9. Resultados de todos os métodos aplicados às amostras obtidas de cães e carrapatos onde houve crescimento em cultura de *Leishmania* a partir do material obtido dos carrapatos. Distrito Federal, Brasil. 2011.

Tabela 10 - Características dos cães que apresentaram crescimento de *Leishmania* em cultura a partir do material obtido dos carrapatos. Distrito Federal, Brasil. 2011.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Rhipicephalus sanguineus*. **a.** macho com vista ventral, detalhe das placas adanais (pada) e apêndice caudal (ac); **b.** fêmea ingurgitada.

Figura 2. Fluxo de processamento das amostras coletadas para o estudo. As áreas pontilhadas representam o processamento de apenas algumas amostras. GS: glândula salivar; Int.: intestino; Seq.: sequenciamento; Ø: ninfa.

Figura 3. Cães com sinais clínicos sugestivos de leishmaniose; onicogribose (**A**) e úlceras cutâneas (**B**).

Figura 4. Formas flageladas de tripanossomatídeos em esfregaço do material obtido durante a dissecação de um exemplar macho de *Rhipicephalus sanguineus*. **A.** detalhe da forma epimastigota (a) e esferomastigota (b). **B.** formas epimastigotas, as setas contínuas indicam flagelados com dois cinetoplastos e a seta tracejada um flagelado com dois núcleos, evidenciando processos de reprodução assexuada por bipartição. Aumento 1000X.

Figura 5. Resultados das inoculações em meios de cultura. Os números dentro dos quadrados e círculos representam a quantidade de carrapatos machos e fêmeas, respectivamente coletados em cada cão. As áreas sombreadas representam os *pools* que apresentaram crescimento de formas flageladas compatíveis com tripanossomatídeos.

Figura 6. Formas flageladas sugestivas de *Leishmania* spp. (promastigotas) observadas no meio de cultura inoculado com o *pool* de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* observado em microscópio óptico com aumento 1000X.

Figura 7. Produtos amplificados de kDNA 120pb em amostras de sangue de cães e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), *L. chagasi* (3); sangue do cão IV (4), sangue do cão III (5), sangue do cão II (6), sangue do cão I (7); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão IV (8), cão III (9), cão II (10) e cão I (11); e controle negativo (12). MP: marcador de peso molecular.

Figura 8. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue de cães e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), *L. chagasi* (3); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão I (4), cão III (5), cão IV (6); sangue do cão I (7), sangue do cão II (8), sangue do cão III (9), sangue do cão IV (10); MP: marcador de peso molecular.

Figura 9. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue canino e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Cultura do material obtido dos carrapatos do cão I (1); sangue do cão I (2); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (3), *L. braziliensis* (4), *L. amazonensis* (5); MP: marcador de peso molecular.

Figura 10. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue canino e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Cultura do material obtido dos carrapatos do cão III (1); sangue do cão III (2); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (3), *L. braziliensis* (4), *L. amazonensis* (5); MP: marcador de peso molecular.

Figura 11. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue canino e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Cultura do material obtido dos carrapatos do cão IV (1); sangue do cão IV (2); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (3), *L. braziliensis* (4), *L. amazonensis* (5); MP: marcador de peso molecular.

Figura 12. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima BstUI em amostras de sangue de cães e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Sangue do cão IV (1), sangue do cão III (2), sangue do cão II (3), sangue do cão I (4); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão IV (5), cão III (6), cão I (7); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (8), *L. braziliensis* (9), *L. amazonensis* (10); MP: marcador de peso molecular.

Figura 13. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima BstUI em amostras de sangue de cães e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Sangue do cão II (1), sangue do cão I (2); cultura do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão I (3); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (4), *L. braziliensis* (5), *L. amazonensis* (6); MP: marcador de peso molecular.

Figura 14. Produtos amplificados de kDNA 120pb em amostras de sangue canino (2), culturas de *Rhipicephalus sanguineus* machos (3) e fêmeas (4), intestino de *R. sanguineus* machos (5) e glândulas salivares (6), intestino de fêmeas (7) e glândulas salivares (8), culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (9), *L. braziliensis* (10), *L. chagasi* (11) e controle negativo (12).

Figura 15. Amplificação de alvo de 234pb do gene hsp70 de amostras de glândulas salivares de *R. sanguineus* fêmeas (3) e machos (4), intestinos de fêmeas (5) e machos (6), culturas de fêmeas (7) e machos (8), sangue canino (9), culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (10), *L. braziliensis* (11), *L. chagasi* (12) e controle negativo (2).

Figura 16. Produtos amplificados de hsp70 234pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de glândulas salivares de *R. sanguineus* fêmeas (2) e machos (3), intestinos de fêmeas (4) e machos (5), culturas de fêmeas (6) e machos (7), sangue canino (8), culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (9), *L. braziliensis* (10), *L. chagasi* (11).

Figura 17. Produtos amplificados de 330pb de kDNA de *T. cruzi* em amostras de sangue de cães e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), *L. chagasi* (3), *T. cruzi* (4); sangue do cão IV (5), sangue do cão III (6), sangue do cão II (7), sangue do cão I (8); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão IV (9), cão III (10), cão II (11) e cão I (12); MP: marcador de peso molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| CEUA | Comitê de Ética no Uso Animal |
| DF | Distrito Federal |
| DIVAL | Diretoria de Vigilância Ambiental |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico) |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| hsp | <i>heat shock proteins</i> (proteína de choque térmico) |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| LVC | Leishmaniose Visceral Canina |
| NMT | Núcleo de Medicina Tropical |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| pb | pares de base |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação de polimerização em cadeia) |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato) |
| RAPD | <i>Random Amplication of Polymorphic DNA</i> (amplificação aleatória de DNA polimórfico) |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i> (polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição) |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência Indireta |
| rpm | rotações por minuto |
| SLU | Serviço de Limpeza Urbana |
| SRD | Sem Raça Definida |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TR DPP | Teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso |
| UNESCO | Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 1.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> : características gerais..... | 27 |
| 1.1.2 <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e a transmissão da LVC..... | 32 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 36 |
| 3. OBJETIVOS..... | 37 |
| 3.1 Geral..... | 37 |
| 3.2 Específicos..... | 37 |
| 4. MÉTODOS..... | 38 |
| 4.1 População e amostra..... | 38 |
| 4.1.1 Critérios de inclusão..... | 38 |
| 4.1.2 Critérios de exclusão..... | 38 |
| 4.2 Local e período de estudo..... | 39 |
| 4.3 Método de coleta..... | 39 |
| 4.4 Coleta de amostra sanguínea dos cães..... | 40 |
| 4.5 Identificação dos ectoparasitos..... | 40 |
| 4.6 Dissecção dos carrapatos..... | 41 |
| 4.6.1 Fixação do carrapato..... | 41 |
| 4.6.2 Isolamento do intestino e glândulas salivares..... | 41 |
| 4.7 Preparo de culturas..... | 42 |
| 4.8 Preparo dos esfregaços..... | 42 |
| 4.9 Morfometria dos tripanossomatídeos..... | 43 |
| 4.10 Extração do DNA das amostras sanguíneas..... | 43 |
| 4.11 Extração do DNA das glândulas salivares e intestinos dos carrapatos..... | 45 |
| 4.12 Extração do DNA dos parasitos isolados em meio de cultura..... | 46 |
| 4.13 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) | 47 |
| 4.13.1 Amplificação de região conservada de kDNA de <i>Leishmania</i> spp... .. | 47 |
| 4.13.2 Amplificação de fragmento do gen hsp70..... | 48 |
| 4.13.3 Amplificação da região conservada de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 50 |
| 4.13.4 Purificação dos produtos da PCR..... | 51 |
| 4.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 51 |
| 4.15 Digestão enzimática com endonucleases..... | 52 |
| 4.16 RIFI e ELISA..... | 52 |
| 4.17 Teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso – TR DPP..... | 53 |
| 4.18 Sequenciamento do DNA..... | 54 |
| 4.19 Análise por isoenzimas (MLEE – <i>Multi-Locus Enzyme Electrophoresis</i>)..... | 54 |
| 4.20 Aspectos éticos..... | 54 |
| 5. RESULTADOS..... | 56 |
| 5.1 Características da amostra de cães..... | 56 |
| 5.2 Ectoparasitismo..... | 57 |

| | |
|---|------------|
| 5.3 Avaliação sorológica dos cães..... | 58 |
| 5.4 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> spp. pela PCR em sangue canino..... | 58 |
| 5.5 Resultados da pesquisa direta de flagelados no conteúdo dos carrapatos..... | 58 |
| 5.6 Isolamento em cultura..... | 60 |
| 5.7 Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> spp. nos carrapatos..... | 62 |
| 5.8 Resultados do sequenciamento..... | 73 |
| 5.9 Resultado da análise por isoenzimas..... | 73 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 74 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 87 |
| 8. AGÊNCIA DE FOMENTO..... | 88 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 89 |
| ANEXOS..... | 103 |
| APÊNDICES..... | 129 |

RESUMO

No Brasil, a leishmaniose visceral canina (LVC) é causada pelo parasito *Leishmania chagasi*, (sin. *L. infantum*). Considera-se que a principal via de transmissão da LV é por meio da picada de flebotomíneos infectados. Entretanto, formas alternativas têm sido investigadas e a picada ou ingestão de carrapatos infectados poderia ter relevância epidemiológica. A presença de *L. chagasi* em *Rhipicephalus sanguineus* poderia explicar a transmissão do parasito na população canina em locais onde há baixa frequência de flebotomíneos. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de *Leishmania* spp. em *R. sanguineus* coletados em cães naturalmente infectados no Distrito Federal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Os carrapatos foram obtidos de uma amostra de conveniência composta por 48 cães entregues por seus donos à Diretoria de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde do Distrito Federal com diagnóstico suspeito ou confirmado de LVC, por meio de testes sorológicos, ou cães recolhidos por ocasião da realização do inquérito rotineiro do programa de controle de LVC no DF. Foi coletado sangue venoso dos 48 cães para avaliação sorológica da infecção por *Leishmania* spp por meio das técnicas imunoenzimática e imunofluorescência indireta, ambas com antígeno bruto de *L. major*; do teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso com antígeno recombinante K28 e aplicação da técnica de PCR para amplificação de alvos de DNA gênero-específicos. Após a identificação dos espécimes de *R. sanguineus*, os carrapatos foram armazenados em *pools* de até 10 espécimes, separando-os em grupos de machos, fêmeas e ninfas. Os carrapatos foram dissecados para retirar o intestino e glândulas salivares para extração de DNA e posterior amplificação da região conservada de 120pb de kDNA e 234pb do gene *hsp70* de *Leishmania* spp. por meio da PCR e para cultura em meio NNN modificado. Os produtos amplificados de kDNA foram ainda submetidos à digestão com as endonucleases Hae III e BstUI e ao sequenciamento genético para identificação das espécie do parasito. Foram realizados esfregaços em lâminas coradas com *Giemsa* para observação direta de formas de *Leishmania* spp. A positividade das técnicas sorológicas aplicadas ao sangue canino foi de 66,6% pelo ELISA, destes, 81,2% pela RIFI e 56,2% do total pelo DPP, e ainda, 70,8% dos cães apresentaram pelo menos um dos três testes com resultados reagentes ou positivos. Foram coletados 130 espécimes de *R. sanguineus* dos 27 cães que se apresentaram ectoparasitados. Houve sucesso no isolamento em cultura de *Leishmania* spp. de cinco *pools* de glândulas salivares e intestinos de carrapatos coletados em quatro cães. O sequenciamento do kDNA amplificado pela PCR a partir destas amostras demonstrou homologia com sequências de *Leishmania* spp. Os produtos amplificados de kDNA a partir de amostra sanguínea de um dos cães apresentou homologia com sequência de *L. braziliensis*, no entanto, a homologia do material amplificado a partir dos carrapatos coletados desse cão foi com uma

sequência de *L. infantum*. A cultura analisada por eletroforese de isoenzimas foi identificada como *L. infantum*. A infecção por *Leishmania* nos cães, dos quais foram coletados os *pools* de carrapatos positivos na cultura, foi confirmada pela PCR. A lâmina do *pool* de machos de um dos cães foi a única a apresentar formas flageladas de tripanossomatídeos, cuja identificação não foi possível pela morfometria. Os resultados obtidos indicam que *R. sanguineus* que se alimentam naturalmente em cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam DNA do parasito no intestino e glândulas salivares, confirmam a presença de *L. infantum* viável nestes ectoparasitos, e a possibilidade de isolar *L. infantum* em meio de cultura.

Palavras-chave: 1. *Leishmania infantum* 2. Leishmaniose visceral 3. Cães 4. *Rhipicephalus sanguineus* 5. Carrapatos 6. Diagnóstico molecular 7. *Canis familiaris*

ABSTRACT

In Brazil, canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by the parasite *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*). It is considered that the principal route of transmission of the VL is through the bite of infected sand flies. However, alternative methods have been investigated and bites or ingestion of infected ticks could have epidemiological relevance. The presence of *L. chagasi* in *Rhipicephalus sanguineus* could explain the transmission of the parasite in the canine population in areas where there are low frequency of sand flies. The objective of this study was to detect the presence of *Leishmania* spp. in *R. sanguineus* collected from dogs naturally infected in the District Federal. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UNB Faculty of Medicine. Ticks were obtained from a convenience sample consisting of 48 dogs delivered by their owners to the Environmental Surveillance Directory of Health Department of the District Federal with suspected or confirmed diagnosis of CVL, through tests, or dogs collected during the day routine investigation of the control program LVC in DF. Venous blood was collected from 48 dogs for serologic evaluation of infection by *Leishmania* spp. by means of ELISA and indirect immunofluorescence techniques, both with crude antigen of *L. major*, the immunochromatographic dual path assays with recombinant K28 and amplification of genus specific DNA targets by PCR. After identification of specimens of *R. sanguineus* ticks were stored in pools of up to 10 specimens, separating them into groups of males, females and nymphs. Ticks were dissected to remove the gut and salivary glands for DNA extraction and subsequent amplification of 120pb of the conserved region of kDNA and 234pb of the hsp70 gene of *Leishmania* spp. by PCR. Ticks sample were also cultured in modified NNN culture medium. The amplified products of kDNA were further subjected to digestion with restriction endonucleases Hae III and BstUI and gene sequencing to identify the parasite species. Smears were prepared on slides stained with Giemsa for observation of *Leishmania* spp. forms. The positivity of serological techniques applied to canine blood was 66.6% by ELISA. Among positive samples, 81.2% were also positive by IFA and 56.2% by DPP, then, 70.8% of dogs had at least one of the three tests with positive results. We collected 130 specimens of *R. sanguineus* of the 27 dogs that had ectoparasites. Isolation of *Leishmania* spp. was successful in five pools of salivary glands and intestines of ticks collected from four dogs. Sequencing kDNA amplified by PCR from these samples revealed homology with sequences of *Leishmania* spp. The amplified products of kDNA in a blood sample from one of the dogs showed sequence homology to *L. braziliensis*, however, the amplified material from ticks collected from this dog had homology with *L. infantum* sequence. The isolate analyzed by multilocus enzyme electrophoresis was identified as *L. infantum*. The *Leishmania* infection in dogs where we collected the pools of ticks which had successful parasite isolation in culture was confirmed by PCR. The smear of the pool of male

ticks collected from one dog was the only positive for flagellated trypanosomatidae whose identification was not possible by morphometry. Our results indicate that *R. sanguineus* feeding naturally in dogs naturally infected by *L. infantum* had parasite DNA present in the intestine and salivary glands, confirm the presence of viable *L. infantum* in these ectoparasites, and the possibility of isolation of *L. infantum* in culture medium.

Keywords: 1. *Leishmania infantum* 2. Visceral leishmaniasis 3. Dogs 4. *Rhipicephalus sanguineus* 5. Ticks 6. Molecular diagnosis 7. *Canis familiaris*.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses com grande impacto em saúde pública e representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis doenças infecciosas mais importantes que acometem populações negligenciadas, devido à elevada incidência da infecção, a elevada letalidade da forma visceral quando não tratadas e à capacidade de produzir deformidades. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a infecção com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (WHO, 2010).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (LV) são as duas principais manifestações dessa doença, sendo que esta última é a forma mais grave (Brasil, 2007; Brasil, 2009; Brasil, 2011).

O gênero *Leishmania* inclui parasitos com duas formas principais: uma amastigota, observada dentro das células do sistema fagocítico mononuclear nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, e outra, promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Lainson & Shaw, 1987; Killick-Kendrick, 1990).

A LV é caracterizada pela visceralização do parasito, acometendo os órgãos com alta densidade de células do sistema fagocítico-mononuclear tais como baço, fígado e linfonodos. A expressão clínica da doença depende de fatores como a espécie e o tipo de resposta do sistema imunitário, características individuais, genéticas e do meio ambiente em que o indivíduo está inserido (Cardoso, 2007). A LV é uma doença crônica grave, caracterizada por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e citopenias, geralmente fatal para o homem, quando não se institui tratamento adequado. A letalidade da LV sob tratamento específico é variável, mas, pode atingir valores entre 10 e 20% (Romero & Boelaert, 2010).

A LV é considerada endêmica em regiões de clima tropical e subtropical, aparecendo desde as florestas das Américas aos desertos do oeste da Ásia e das zonas rurais até as áreas periurbanas (Malla & Mahajan, 2006). A diversidade de agentes, reservatórios, vetores e situações epidemiológicas, aliada ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários desses aspectos, tornam complexo o controle desta doença. O propósito das medidas de prevenção, praticadas atualmente no Brasil, é a redução do contato homem-vetor, a partir de medidas de proteção individual, controle de reservatórios e aplicação do inseticida, quando indicados (Brasil, 2005).

No Brasil, a LV tem ocorrido frequentemente em médios e grandes centros urbanos (Werneck, 2008). A primeira epidemia urbana ocorreu há 25 anos na cidade de Teresina, Estado do Piauí, e desde então, vários surtos têm sido relatados na periferia de outras cidades, como São Luís, Estado do Maranhão, Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, Palmas, Estado de Tocantins (da Luz et al., 2001; Silva et al., 1997).

Na Índia e no leste da África a espécie do parasito associada à LV é *Leishmania donovani* e na Europa e norte da África, *L. infantum* (Lukes et al., 2007). No Novo Mundo, *L. chagasi* é a espécie descrita como agente etiológico da LV (Kuhls et al., 2005), embora tenham sido relatados casos associados com a infecção por *L. amazonensis* (Barral et al., 1991). Estudos sugerem que outras espécies de *Leishmania* podem estar causando manifestações clínicas compatíveis com a LV. Estudo publicado em 1986 relatou o caso de um paciente com manifestações clínicas clássicas de LV sem a presença do protozoário no baço e fígado apesar destes estarem com as dimensões aumentadas, porém, foram detectadas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na medula óssea (Barral et al., 1986). Outro estudo mostrou que de 46 casos de LV, 11 tiveram como agente causal a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Barral et al., 1991). Outros trabalhos mostraram resultados semelhantes que detectaram *Leishmania (Leishmania) braziliensis* na medula óssea (Hernández et al., 1993) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em linfonodo (Aleixo et al.,

2006). Cepas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença mostraram-se geneticamente diversas, e esta divergência estende-se a variações em termos de tamanho de cromossomos. Uma vez que *L. amazonensis* pode estar associada com leishmaniose cutânea difusa (LCD) ou LV, deve-se pesquisar marcadores genéticos que podem estar associados com estas manifestações clínicas (de Oliveira et al., 2007).

Lainson e Rangel (2003) e Lainson e Shaw (2005) passaram a utilizar as nomenclaturas *L. infantum infantum* e *L. infantum chagasi* em consideração a existência de diferenças entre os dois organismos, com base nos padrões de fragmentos de kDNA utilizando a técnica de digestão com enzimas de restrição (Jackson et al., 1984), comparação de proteínas de superfície das formas promastigotas e anticorpos monoclonais (Santoro et al., 1986), e ainda, estudos comparativos de radiorrespirometria (Decker-Jackson & Tang, 1982).

A classificação do complexo *Leishmania donovani* (composto por *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*) foi contestada devido a relações genotípicas dentro do complexo que foram avaliados em diferentes níveis, afirmando que tal complexo tem uma origem monofilética. Todas as espécies de *Leishmania* do Velho Mundo foram reconhecidas por uma sonda Lmet9, o que sugere uma origem genética comum. Após a análise da sequência de *mspC3* h, *L. infantum* e *L. chagasi* foram consideradas indistinguíveis e embora tenha sido encontrada uma variabilidade da cepa por análise de RAPD, não foi possível discriminar *L. infantum* de *L. chagasi*. Sendo assim, *Leishmania chagasi* pertence ao complexo *L. donovani*, mas por ser indistinguível da *L. infantum*, sugere-se que sua introdução tenha sido recente no Novo Mundo e efetivamente se trata da mesma espécie. A estreita relação entre *L. Infantum* e *L. chagasi* contrasta com um nível mais elevado de variabilidade de *L. donovani* (Maurício et al., 1999). A impossibilidade de distinguir cepas de *L. infantum* e *L. chagasi*, com variabilidade intraespecífica semelhante, reforça a hipótese de que estas espécies são sinônimos (Momen et al., 1987). A

Leishmania infantum/L. chagasi foi identificada como um grupo monofilético dentro do complexo *L. donovani*, que pode ser considerado parafilético. Comparativamente, a diversidade dentro do complexo *L. donovani* é substancial e demonstra padrões de associação filogeográficos (Maurício et al., 1999).

O ciclo biológico do parasitismo por *Leishmania* se inicia quando fêmeas de flebotomíneos se alimentam de sangue de algum hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo formas amastigotas presentes no interior das células do sistema fagocítico mononuclear. No intestino do inseto, ocorre a ruptura das células liberando as formas amastigotas, que se transformam em promastigotas. Após 48 a 72 horas do repasto alimentar as formas promastigotas migram para a porção torácica do intestino médio. Esta migração é acompanhada pela transformação dos parasitos em (1) formas promastigotas curtas e largas livres na luz intestinal, (2) formas paramastigotas arredondadas, fixadas pelo flagelo ao epitélio intestinal a partir de hemidesmossomos e (3) formas promastigotas metacíclicas, as quais invadem a faringe, cibário e probóscide do inseto, tornando-se aptas para infectar outro hospedeiro, assim que esses insetos fizerem o seu próximo repasto sanguíneo. Os flebotomíneos têm um aparelho bucal curto e adaptado para dilacerar o tecido do hospedeiro, fornecendo condições para obter a alimentação eficiente. No momento da picada, o inseto infectado regurgita parte do material do seu intestino e, desta forma, inocula o protozoário no novo hospedeiro. A saliva do inseto também é inoculada neste ambiente, favorecendo o fluxo sanguíneo e a transmissão do protozoário ao novo hospedeiro. Nos tecidos dos vertebrados os macrófagos fagocitam as formas inoculadas que se transformam em amastigotas no ambiente intracelular, multiplicando-se por divisão binária. O ciclo se completa quando outro inseto vem se alimentar de sangue neste hospedeiro infectado (Bray & Alexander, 1987; Killick-Kendrick, 1990; Lainson & Shaw, 1987; Michalick, 2005).

Diversos mamíferos podem se infectar por *Leishmania* spp., entretanto, não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem.

No Novo Mundo, a LV é considerada uma doença zoonótica, envolvendo diferentes espécies caninas, especialmente o cão doméstico *Canis familiaris* (Lainson, 1983). No Brasil, os reservatórios de *L. chagasi* ainda não estão bem definidos. Vários animais silvestres, como raposas das espécies *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous* e marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* têm sido encontrados naturalmente infectados por *L. chagasi* (Reis, 2001).

A possível participação dos cães no ciclo epidemiológico da LV começou a ser discutida na Tunísia, a partir da detecção, nos animais, do agente etiológico da doença (Nicolle & Comte, 1908).

Na Europa e na América Latina, o agente causador da leishmaniose visceral humana e canina mantém-se principalmente em populações de cães domésticos. No Brasil, os cães são os reservatórios mais importantes do parasito, em área urbana, tendo em vista a sua relação de proximidade com o homem e a expressão do parasitismo nesses animais (Deane & Deane, 1955, Vieira & Coelho, 1998; Courtney et al., 2002).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) se caracteriza por perda de peso progressiva, anemia, lesões cutâneas acompanhadas principalmente por alopecia generalizada ou local, descamação ou eczema, particularmente no focinho e orelhas, pelos opacos, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. A pele dos cães é a região do corpo que mais manifesta os sinais clínicos, é o local onde acontece a primeira interação entre o parasita e o sistema imune do cão, além de ser o local onde se encontram grandes quantidades de formas amastigotas (Ciaramella et al., 1997).

Com o avanço da doença observa-se também aumento do volume dos linfonodos, onicogribose, ceratoconjuntivite, apatia e edema das patas. Na fase final ocorre paresia das patas posteriores e caqueixa (Genaro, 1993; Koutinas et al., 1999; Mozos et al., 1999; Feitosa et al., 2000)

Apesar dos sintomas descritos, a maioria dos cães infectados não apresenta sinais clínicos (Cabral et al., 1998) e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver a presença de parasitos, o que alerta para a importância

desses animais no ciclo de transmissão da doença (Solano-Gallego et al., 2004).

O diagnóstico clínico da LVC é complexo, pois os sinais clínicos da doença são variáveis e inespecíficos, comuns a outras enfermidades que acometem o cão. A imunossupressão causada por *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LVC (Silva, 2007).

No Brasil, as estratégias de controle da doença baseiam-se no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos flebotomíneos por meio do uso de inseticidas e na detecção e eliminação dos cães infectados (Brasil, 2005).

Modelos matemáticos sugerem que o controle da LV humana e canina poderia ser mais efetivo com medidas dirigidas ao combate ao vetor ou vacinação de indivíduos suscetíveis comparadas com aquelas direcionadas à eliminação de cães infectados (Quinnell et al., 1997). O emprego do controle vetorial e de reservatórios como estratégias de intervenção sobre a LV é sustentado baseando-se na hipótese de que a incidência da infecção em humanos está diretamente relacionada ao número de cães infectantes e a fatores entomológicos, tais como a capacidade da população de flebotomíneos de transmitir infecção do cão para o homem (Burattini et al., 1998; Dye, 1996). No entanto, a LV continua avançando e a inefetividade das estratégias de controle pode ser explicada pela necessidade de um sistema de vigilância permanente, e outros fatores, como a possibilidade de transmissão por cães assintomáticos, a má-qualidade dos procedimentos diagnósticos, e a própria dinâmica populacional canina, com a rápida infecção pelos novos cães introduzidos em substituição aos cães eliminados, influenciando na inefetividade da eliminação (Costa & Vieira, 2001; Courteney et al., 2002; Dye, 1996).

O diagnóstico da LVC é usualmente realizado por meio de análises parasitológicas e sorológicas, tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) o ensaio imunoenzimático (ELISA) e mais recentemente por meio de testes imunocromatográficos rápidos (Badaró et al., 1983; Iniesta et

al., 2002). O teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (TR DPP), aplicado em amostras de sangue total ou de soro, submetidas à leitura visual, ou aplicado em amostras de soro, submetidas à leitura eletrônica, demonstrou sensibilidade de 88% e especificidade em torno de 73% para o diagnóstico de LVC, o que demonstra que o uso de dispositivos eletrônicos de leitura poderia ser dispensado em condições de campo (Schubach, 2011). Especificidade mais elevada (96%) e sensibilidade mais baixa (47%) foram identificadas em cães sem sinais de LVC. No entanto, a sensibilidade do teste foi significativamente mais elevada (98%) nos casos em que os cães eram considerados doentes. Os resultados obtidos com a utilização do kit DPP[®]LVC mostraram que é improvável que o teste seja sensível o suficiente para detecção de cães assintomáticos portadores de *L. infantum*, porém, pode ser útil para confirmar os casos clinicamente suspeitos devido a sua elevada especificidade em cães sintomáticos (Grimaldi et al., 2012).

Os métodos parasitológicos são considerados mais específicos que os testes sorológicos, porém, mais invasivos, porque requerem punção de linfonodo periférico ou medula óssea. Outra desvantagem é que os testes sorológicos apresentam mais resultados falso-positivos por causa das reações cruzadas com outros patógenos (Badaró et al., 1983; Iniesta et al., 2002).

Os métodos moleculares são valiosos no diagnóstico da LVC (Ikonopoulou et al., 2003; Xavier et al., 2006) em função da rapidez, sensibilidade e especificidade, particularmente para a detecção de cães assintomáticos. O diagnóstico da LV por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR – *Polymerase chain reaction*) tem acurácia elevada para detectar sequências específicas do DNA do parasito em diferentes amostras clínicas, no entanto, a reprodutibilidade deste método não tem sido extensamente provada (Fisa et al., 2001; Leônidas et al., 2002; Ikonopoulou et al., 2003).

1.1 *Rhipicephalus sanguineus*: características gerais

Existem 898 espécies de carrapatos descritas no mundo, todas agrupadas na subordem Ixodida (sin. Metastigmata), dividindo-se em três famílias (Quadro 1). A família Ixodidae é a que possui o maior número de representantes dos carrapatos, com 703 espécies descritas, e compreende os carrapatos popularmente conhecidos como carrapatos duros (Barros-Battesti, 2006; Dantas-Torres et al., 2012; Guglielmone et al., 2010).

Quadro 1. Características comparativas entre as três famílias de carrapatos (Acari: Ixodida). **Fonte:** Barros-Battesti, 2006.

| | Argasidae | Nuttalliellidae | Ixodidae |
|---------------------------|--|---|--|
| GNATOSSOMA | | | |
| Localização | Subterminal, não visível dorsalmente (na larva é terminal) | Terminal e anterior | Terminal anterior, visível sob o aspecto dorsal em todos os estágios. |
| Base | Ventralmente é quadrangular | Dorsalmente apresenta uma fenda transversal que a subdivide em região anterior e posterior | Dorsal e ventralmente muito variável, mas sem divisões |
| Palpos | Os quatro artículos são subiguais com exceção de <i>Nothoaspis</i> (artículo I diferenciado dos demais) | Três artículos. O primeiro (basal) muito curto, o segundo alargado e quadrangular, e o último reduzido e encaixado no artigo II | Formação do artigo IV que se aloja numa cavidade do artigo III |
| Áreas porosas | Ausentes | Ausentes | Presentes |
| IDIOSSOMA | | | |
| Tegumento | Coriáceo, mamilonado, tuberculado, granulado e rugoso | Coriáceo, apresentando inúmeros espaços retorcidos com aspectos de rosetas | Liso ou superficialmente estriado, com muitos poros |
| Escudo dorsal | Ausente na maioria, exceto nas larvas (presença de pseudoescudo em <i>Nothoaspis</i>) | Pseudoescudo coriáceo com textura diferenciada do restante do idiossoma | Presente. No macho é completo; na larva, ninfa e fêmea é restrito à porção anterior do idiossoma |
| Festões | Ausentes | Ausentes | Presentes na maioria das espécies |
| Olhos | Quando presentes localizam-se nas dobras supracoxais | Ausentes | Quando presentes localizam-se nas margens anterolaterais do escudo |
| Glândulas coxais | Presentes em adultos e ninfas | Ausentes | Ausentes |
| Placas espiculares | Pequenas, situadas na prega supra-coxal, entre as coxas III e IV; mácula e diminutos aerófilos presentes | Pequenas, situadas posteriormente às coxas IV, de superfície fendida, mácula presente, aerófilos ausentes | Grandes, situadas posteriormente às coxas IV, mácula e aerófilos presentes |
| PERNAS | | | |
| Coxas | Sem espinhos | Espinhas nas coxas I e II | Com espinhos internos e externos na maioria |
| Pulvilos | Ausentes ou rudimentares (presentes nas larvas) | Ausentes | Presentes em todos os estágios |

O *Rhipicephalus sanguineus* pertence à subfamília Rhipicephalinae, sendo vulgarmente conhecido como carrapato vermelho do cão e também como carrapato de canis (Dantas-Torres, 2008a, b; Pegram et al., 1987). *R. sanguineus* foi descrito pela primeira vez em 1806 por Latreille, na ocasião era denominado como *Ixodes sanguineus*, sendo posteriormente transferido para o gênero *Rhipicephalus* (Guglielmone et al., 2010).

O gênero *Rhipicephalus*, de origem afrotropical, compreende 82 espécies reconhecidas no mundo e foi introduzido nas Américas provavelmente com a colonização. Atualmente, ocorre em toda a Região Neotropical predominando nas áreas urbanas e acometendo aproximadamente 30% dos cães (Barros-Battesti, 2006, Guglielmone et al., 2010).

R. sanguineus apresenta tamanho variado, de pequeno a médio. Em ambos os sexos o idiossoma tem coloração marrom escura, escudo sem ornamentação e olhos ligeiramente convexos. Nos machos, o escudo apresenta três sulcos na porção posterior e ventralmente há duas placas adanais internas desenvolvidas e mais largas posteriormente, e duas placas externas rudimentares. Tanto em machos, quanto em fêmeas, os espinhos das coxas são similares, exceto o espinho da coxa IV do macho que é maior; a base dorsal do gnatossoma é hexagonal e tanto os palpos como o hipostômio são curtos (Barros-Battesti, 2006).

Esse carrapato tem hábito nidícola, vivendo em ninhos, tocas ou abrigos dos hospedeiros. Quando não estão parasitando o hospedeiro, ocorrem preferencialmente no chão ou frestas e buracos das tocas (Labruna & Pereira, 2001; Labruna, 2004). *R. sanguineus* tem como hospedeiro preferencial o cão doméstico e canídeos silvestres, possuindo ampla distribuição por todo o território brasileiro (Linardi & Nagem, 1973).

R. sanguineus, além de se alimentar do seu hospedeiro principal, o cão, pode fazer hematofagia no homem e em outros mamíferos, além de aves e répteis (Fernandes, 2000). Na América do Norte (Goddard, 1989), no Brasil, e em vários países do mundo, o parasitismo humano por *R. sanguineus* tem sido relado, embora não seja muito comum (Dantas-Torres;

Brandão-Filho, 2006a; Dantas-Torres et al., 2006c). Infestações de *R. sanguineus* em humanos foram notificadas nos seguintes municípios do Brasil: Goiânia/GO, Recife/PE, Olinda/PE, Pedreira/SP e Cachoeira do Sul/RS (Guglielmone et al., 2006).

R. sanguineus é uma espécie trifásica, ou seja, em cada estágio ativo de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) se alimenta apenas uma vez e a muda (ecdise) ocorre no ambiente em que vive e mantém relação com seu hospedeiro (Barros-Battesti, 2006; Dantas-Torres, 2008a). No processo de alimentação primeiramente os carrapatos caminham sobre a pele do hospedeiro, tocando-a com a extremidade dos palpos maxilares, onde localizam-se estruturas sensoriais. Assim que é encontrado o ponto adequado, prendem-se firmemente e forçam o hipostômio, que possui fileiras de dentes quitinosos dirigidos para trás contra a pele do hospedeiro, penetrando-a lentamente e funcionando como um órgão de fixação ao animal durante todo o repasto sanguíneo. As quelíceras também penetram na pele e com movimentos cortantes dilaceram-na (Rey, 1973).

As fêmeas adultas podem se alimentar por períodos de 5 a 21 dias (Koshy et al., 1983; Pegram et al., 1987; Petrova-Piontkovskaya, 1947) e o ingurgitamento pode modificar a compreensão de alguns caracteres. Em *R. sanguineus*, os espinhos da coxa I, que normalmente alcançam a coxa II nas fêmeas não ingurgitadas podem não fazê-lo nos espécimes ingurgitados. Isto porque a cutícula entre as coxas I e II se expande durante o ingurgitamento, separando-as. Quando ingurgitadas, podem pesar até 250mg, se desprendem do hospedeiro para realizar a digestão sanguínea, maturação e postura (16-18 dias) dos ovos, esta que é precedida por um período de pré-postura que pode variar de 3 a 14 dias (Barros-Battesti, 2006; Jittapalapong et al., 2000; Koch, 1982a; Pegram et al., 1987; Sweatman, 1967). O período de incubação dos ovos varia de 17-27 dias (Barros-Battesti, 2006). As fêmeas chegam a ovipor cerca de 4.000 ovos, mas, estes números podem alcançar 7.273 ovos. Após a postura dos ovos, a fêmea morre (Jittapalapong et al., 2000; Koch, 1982a; Pegram et al., 1987).

Após a eclosão dos ovos surgem as larvas, que são extremamente pequenas, medindo 0,54mm de comprimento e 0,39mm de largura, possuem apenas três pares de pernas e, quando não alimentadas podem sobreviver por até 8 meses (Goddard, 1987). Sob condições favoráveis, as larvas e ninfas alimentam-se por 3 a 5 dias e por 5 a 7 dias, respectivamente. Quando não estão parasitando o hospedeiro, as larvas alimentadas mudam para ninfas em 8 a 11 dias, estas por sua vez sofrem ecdise entre 11 e 23 dias tornando-se adultos. As ninfas possuem quatro pares de pernas e se assemelham aos adultos, exceto por serem menores e não possuir abertura genital, medindo de 1,14mm a 1,3mm de comprimento e 0,57mm a 0,66mm de largura, podendo pesar 0,29mg após período de quatro dias de alimentação (Sartor, 1994). Geralmente, o tempo estimado para que as ninfas se tornem adultas é de até 47 dias (Pegram et al., 1987; Petrova-Piontkovskaya, 1947). O número de gerações anuais de *R. sanguineus* é incerto, pois, em períodos frios pode haver prolongamento nos tempos requeridos para muda, oviposição e incubação (Barros-Battesti, 2006).

Em relação ao tamanho, machos e fêmeas são semelhantes, sendo que as fêmeas medem de 2,4 a 2,7mm de comprimento; de 1,44 a 1,68mm de largura; e os machos medem em média de 2,28 a 3,18mm de comprimento; de 1,11 a 1,1,68mm de largura. Ambos têm formas alongadas e cor marrom-avermelhados com pequenas pontuações espalhadas ao longo do escudo dorsal, exceto quando as fêmeas estão ingurgitadas (Figura 1b), quando aumentam a porção do corpo tornando-se mais largas, de cor esverdeada e podendo atingir o peso de 115mg após sete dias de repasto sanguíneo (Cooley, 1946; Dantas-Torres, 2008a; Sartor, 1994).

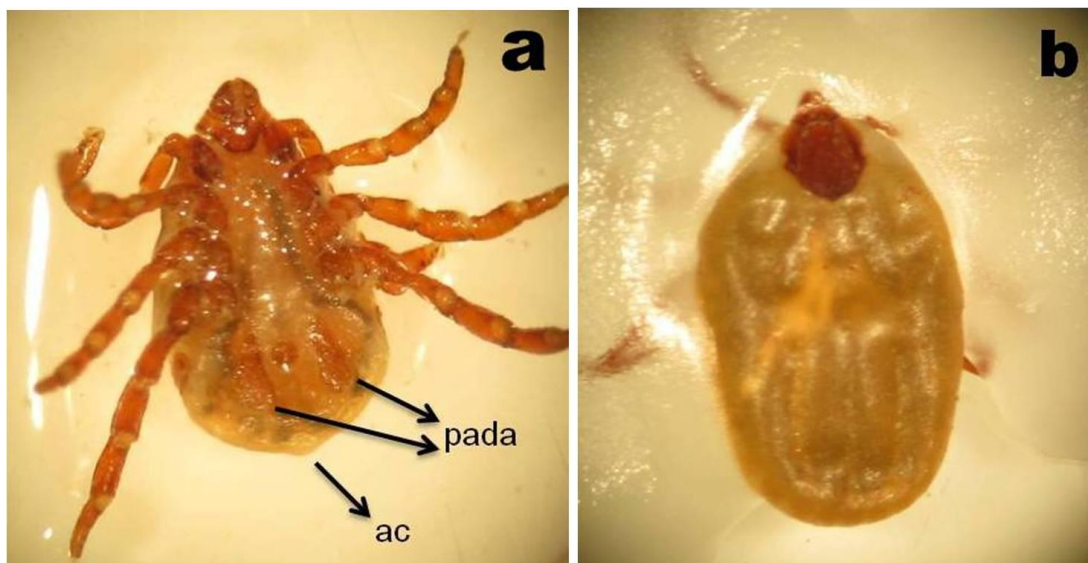


Figura 1. *Rhipicephalus sanguineus*. **a.** macho com vista ventral, detalhe das placas adanais (pada) e apêndice caudal (ac); **b.** fêmea ingurgitada.

As condições climáticas e a latitude são os principais fatores reguladores do ciclo biológico dos carrapatos. A temperatura exerce um papel dominante, regulando a duração de cada fase de desenvolvimento passada fora do hospedeiro (oviposição e incubação dos ovos), incluindo os períodos de ingurgitamento e ecdise. Aparentemente existe uma forte relação entre a temperatura e o tamanho da população de *R. sanguineus*, tendo em vista que estes ixodídeos são mais abundantes em número de espécies em locais mais úmidos, sendo que algumas espécies podem sobreviver em jejum por pouco mais de 1 ano (Barros-Battesti, 2006; Dantas-Torres et al., 2012; Mumcuoglu et al., 1993).

Atualmente, diante de mudanças no estilo de vida, o cão tem um contato cada vez maior com o homem, expondo-o aos agentes comuns entre as duas espécies. Vale ressaltar que o *R. sanguineus* é o vetor de *Rickettsia conorii* para humanos na Europa, agente da febre botonosa e também vetor da *Rickettsia rickettsii*, agente da febre maculosa no Brasil (Louly et al., 2006). *R. sanguineus* desenvolve-se bem com altas densidades e tem alta prevalência em algumas cidades do Brasil, podendo causar aumento da incidência de outras enfermidades tais como a babesiose e a febre maculosa que são zoonoses emergentes (Fernandes, 2000). Estudos

afirmam que pessoas que vivem em ambientes com cães muito parasitados por *R. sanguineus* podem ser incluídas no grupo de risco para o parasitismo pelo ixodídeo (Dantas-Torres et al., 2006b,c).

Com o aquecimento global, estudos sugerem sua influência no comportamento dos carrapatos, favorecendo o aumento de parasitismo em hospedeiros vertebrados, e principalmente, a ocorrência de casos de parasitismo humano e, conseqüentemente, a transmissão de patógenos (Parola et al., 2008). No Brasil, foram descritos casos de carrapatos parasitando humanos (Ferreira et al., 2008), sendo identificados *R. sanguineus* (Dantas-Torres et al., 2005), *R. (B.) microplus* (Labruna et al., 2005), além de espécies pertencentes ao gênero *Amblyomma* (Ferreira et al., 2008). Algumas espécies de carrapatos, exceto *R. (B.) microplus*, possuem baixa especificidade parasitária, principalmente nos estágios de larva e ninfa, o que faz com que parasitem diferentes hospedeiros, como humanos e animais (Ramos et al., 2010).

1.1.2 *Rhipicephalus sanguineus* e a transmissão da LVC

Alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina por meio da ingestão de carrapatos infectados e mesmo por meio de mordeduras, cópula, ingestão de vísceras contaminadas, porém ainda não existem evidências sobre a importância epidemiológica destes mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia.

Mesmo que o processo natural de transmissão da LVC seja principalmente pela picada do díptero infectado *Lutzomyia longipalpis*, outros mecanismos de transmissão têm sido investigados, pois esses insetos, apesar de abundantes nas áreas endêmicas, são encontrados com baixas taxas de infecção (Lainson, 1983; Coutinho & Linardi, 2007).

Os carrapatos, potenciais transmissores de doenças para os vertebrados, são largamente distribuídos e abundantes, possuem alta longevidade, grande sucesso reprodutivo, altas densidades populacionais, e

ainda, não são efetivamente controlados pela predação, parasitismo ou mecanismos de imunidade do hospedeiro (Friedhoff, 1990).

O carrapato da espécie *R. sanguineus*, além de ser um dos principais problemas parasitários enfrentados por proprietários de canis, vem se destacando cada vez mais no ambiente domiciliar e peridomiciliar do homem que convive com o principal hospedeiro urbano deste ectoparasito, o cão doméstico (Paz et al., 2008a, b).

A capacidade vetorial do carrapato *R. sanguineus* poderia ser favorecida pelas características epidemiológicas da LVC que permitem a estreita associação dos ectoparasitos com os cães infectados (Coutinho, 2003), reafirmando a teoria de Sherlock (1964), a qual indica que a transmissão poderia ser feita provavelmente por outros artrópodes, na ausência de flebotomíneos.

A hipótese de transmissão da LVC por carrapatos foi estudada ainda no início do século XX. Na França, Blanc e Caminopteros (1930) demonstraram a capacidade de *R. sanguineus* em se infectar experimentalmente e conservar as diferentes formas de vida de *Leishmania*, além de transmitir a infecção, por meio de inoculação dos triturados, no roedor *Citellus citellus*. Posteriormente, Wenyon (1932) e Adler & Theodor (1957), ao revisarem as teorias sobre transmissão das leishmanioses, não reforçaram a hipótese de transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* por outros artrópodes como carrapatos, percevejos, pulgas e moscas. Mais recentemente, alguns trabalhos têm sugerido a possibilidade de transmissão do agente causador da LVC por *R. sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis* (Coutinho et al., 2005; Coutinho e Linardi, 2007; Paz et al., 2010a,b; Dantas-Torres et al., 2010).

Estudo realizado por Mckenzie (1984) na Universidade do estado de Oklahoma (EUA) demonstrou que em condições experimentais carrapatos *R. sanguineus* podem ingerir *L. infantum* alimentando-se normalmente em um cão infectado, e as formas amastigotas ingeridas durante a alimentação podem desenvolver-se para formas promastigotas, e ainda, que podem sobreviver durante várias semanas no intestino deste ectoparasito. Até o

momento esta é a única evidência da possibilidade de transmissão de *L. infantum* por picadas de carrapatos.

Estudo realizado por Coutinho (2003) em que 20 hamsters apresentaram-se positivos pela infecção dos macerados de carrapatos alimentados em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e 16 evidenciados pela infecção por macerados de pulgas, resultou em positividade de 56,2% do total (36) de animais positivos. Esses dados confirmam a presença de *Leishmania* em *R. sanguineus* e *C. felis felis* e sugerem sua viabilidade, na forma infectante no momento da inoculação. Todos os carrapatos que se alimentaram em cães positivos (diagnosticados por vários títulos de RIFI) produziram infecções após inoculação de seus macerados em hamsters, exceto aqueles cujo repasto foram realizados em cães com título de 1:40, resultando em uma variação entre 50% e 75% nas taxas de infecção. Além disso, é possível que a infecção produzida nos hamsters esteja relacionada com o número de carrapatos macerados e posteriormente inoculados (macerados contendo entre 10 e 20 carrapatos produziram 50% de infecção nos hamsters; macerados com 21 a 31 carrapatos infectaram 60% dos animais; macerados com mais de 32 carrapatos infectaram 75% dos animais inoculados).

A capacidade vetorial do *R. sanguineus* na transmissão da LVC foi investigada por meio de experimentos controlados em laboratório. Formas de *Leishmania* não foram encontradas em nenhum dos 433 esfregaços preparados a partir de colônias de carrapatos ingurgitados e em nenhum dos 118 esfregaços realizados a partir de colônias em jejum. Os testes de PCR revelaram que pools de *R. sanguineus* que se alimentavam de cães infectados, foram positivos para DNA de *Leishmania*. Também foram utilizados meios de cultura NNN LIT, porém, não foi observado crescimento de *Leishmania* em nenhum deles (Paz et al., 2010a)

De acordo com o Ministério da Saúde, Brasília registrou casos de LV desde 2000. Porém, no Hospital Universitário de Brasília, foram encontrados registros da doença que datam de 1983, onde todos os pacientes eram provenientes de estados vizinhos, principalmente Bahia, Minas Gerais e

Goiás. O Distrito Federal está cercado por municípios com relatos de transmissão autóctone de LV e todos os pacientes notificados com a doença antes de 2005 vieram de municípios fora do Distrito Federal (Carranza-Tamayo et al., 2010).

De acordo com a literatura, Brasília tem sido cenário de surtos de LTA (Porto, 2004; Brasil, 2007), e atualmente apresenta casos autóctones de LV, o primeiro dos quais foi notificado em julho de 2005 (Carranza-Tamayo et al., 2010). A avaliação sorológica de cães que residem em áreas com casos humanos de LV, mostrou a presença de cães soropositivos infectados por *L. infantum* nas regiões administrativas do Lago Norte e Sobradinho no Distrito Federal (Carranza-Tamayo et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Alguns estudos afirmam que carrapatos podem ser vetores alternativos para a transmissão de *L. infantum* entre cães. O Distrito Federal tornou-se recentemente uma região endêmica para LV tanto humana como canina com elevada prevalência de cães infectados em áreas onde a infecção de *Lutzomyia longipalpis* pelo parasito *L. infantum* tem sido raramente detectada, confirmando o padrão observado em outras regiões do Brasil.

Os estudos realizados em outros estados brasileiros e outros países apontam para o potencial de *Rhipicephalus sanguineus* como vetor de *L. infantum*, no entanto, um dos problemas que permanece sem ser resolvido é o significado da presença de DNA em carrapatos que se alimentam em animais infectados, sem que até o momento tenha sido possível isolar parasitos viáveis dos carrapatos que se alimentaram naturalmente em cães naturalmente infectados.

Até o momento, os aspectos relacionados ao possível papel de *R. sanguineus* na transmissão de LV não têm sido estudados na população de cães no Distrito Federal, principalmente, quanto à presença do ectoparasitismo em cães infectados por *Leishmania* spp., que rotineiramente são eutanasiados no canil da Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL).

Este cenário representa uma oportunidade para investigar as características específicas dos carrapatos que ectoparasitam os cães infectados pelo protozoário quanto à presença de parasitos viáveis e a sua localização no intestino e glândulas salivares do carrapato, utilizando métodos moleculares que permitem ainda a identificação da espécie de *Leishmania* a ser detectada.

Portanto, considerou-se pertinente a realização de um estudo que permitisse contribuir para aumentar o conhecimento sobre aspectos relevantes do ectoparasitismo de *R. sanguineus* na população canina do Distrito Federal relacionados com o potencial desse carrapato como vetor de LVC.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o papel de *R. sanguineus* como possível vetor de leishmaniose visceral canina no Distrito Federal.

3.2 Específicos

- Detectar a presença de *Leishmania* spp. em carrapatos da espécie *R. sanguineus* coletados de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp.
- Identificar a espécie de *Leishmania* encontrada nos carrapatos da espécie *R. sanguineus*;
- Identificar a localização do protozoário no intestino e/ou glândulas salivares dos parasitos.

4. MÉTODOS

4.1 População e amostra

A população estudada foi composta por cães que foram objeto de acompanhamento pela Diretoria de Vigilância Ambiental no Distrito Federal (DIVAL) no período de 04 de julho a 30 de setembro de 2011.

Segundo dados de técnicos da DIVAL (comunicação pessoal) semanalmente até 20 cães são avaliados pelas equipes dessa diretoria, dentre os quais, pelo menos cinco cães apresentam sintomatologia sugestiva de leishmaniose visceral, ou são provenientes de área de risco.

A amostra foi constituída por conveniência definida pelo período disponível para realizar a coleta dos ectoparasitos e das amostras dos cães compreendido entre julho e setembro de 2011.

4.1.1 Critérios de inclusão

- Cão recolhido pela DIVAL por ocasião da realização do inquérito amostral ou censitário canino como parte da rotina do programa de controle de LVC no DF;
- Cães entregues voluntariamente pelos seus donos à DIVAL por suspeita de LVC;
- Cães errantes recolhidos pela DIVAL no DF.
- Cães com resultado positivo em pelo menos um dos três testes sorológicos aplicados para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp.

4.1.2 Critérios de exclusão

- Cães vacinados contra leishmaniose;
- Cães suspeitos e/ou confirmados com raiva;
- Cães que utilizavam coleira impregnada com inseticidas

4.2 Local e período de estudo

A coleta dos ectoparasitos e das amostras dos cães foi realizada na Diretoria de Vigilância Ambiental do Distrito Federal de julho a setembro de 2011.

O trabalho experimental foi executado no Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília e em parceria com o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina da mesma instituição.

4.3 Método de coleta

Todas as amostras foram coletadas e processadas de acordo com o fluxograma abaixo:

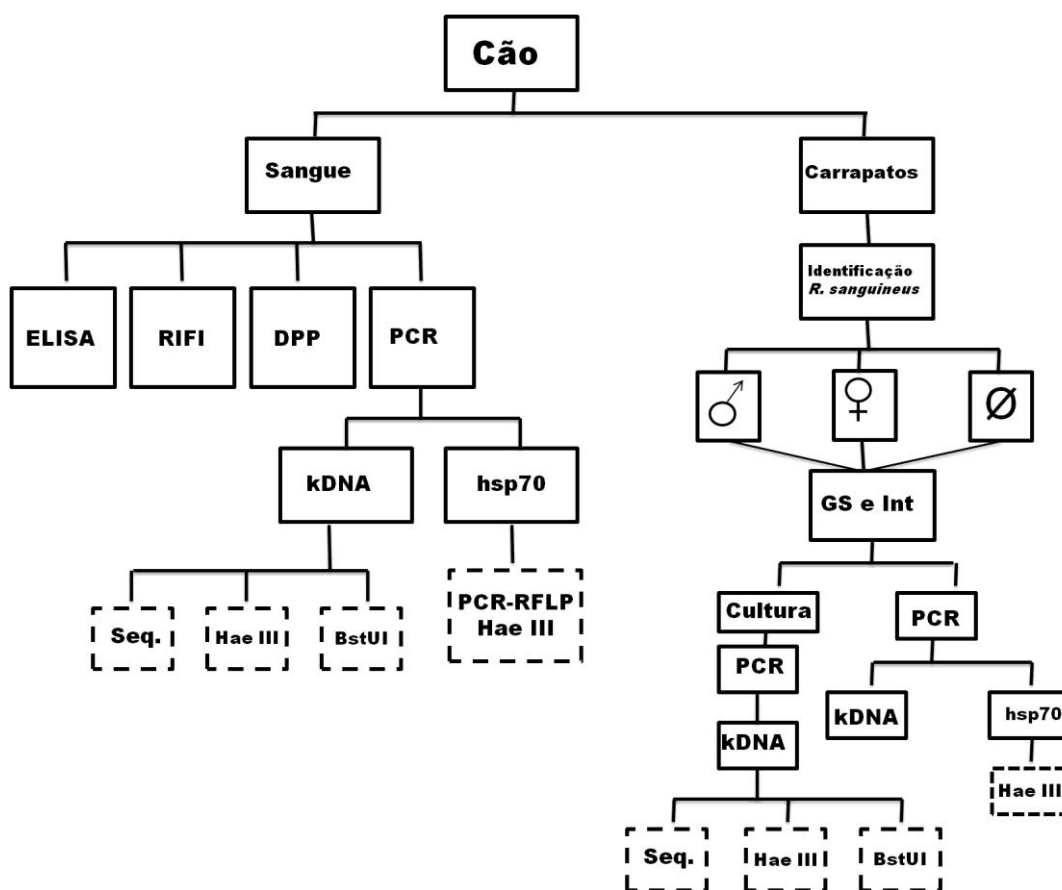


Figura 2. Fluxo de processamento das amostras coletadas para o estudo. As áreas pontilhadas representam o processamento de apenas algumas amostras. GS: glândula salivar; Int: intestino; Seq.: sequenciamento; ∅: ninfa.

As coletas foram autorizadas pela DIVAL (Apêndice 1) e os ectoparasitos foram coletados pela pesquisadora responsável com a colaboração de veterinários que compõem a equipe da DIVAL. Para capturar os ectoparasitos, os cães foram imobilizados com auxílio de um cambão e focinheira, e em seguida deitados em uma mesa para que fossem anestesiados. Em seguida, foi realizado um exame ectoscópico clínico por toda a extensão de seus corpos, isto com auxílio de pinças, procurando explorar os locais preferenciais dos ectoparasitos, como orelhas, espaços interdigitais, e áreas ao redor das órbitas. Os ectoparasitos coletados foram armazenados em tubos de ensaio devidamente identificados com o número de registro do cão, para posterior identificação da espécie. Os ectoparasitos permaneceram a temperatura ambiente por cerca de 2 horas até o procedimento de identificação e dissecação.

4.4 Coleta de amostra sanguínea dos cães

Foram coletadas amostras de sangue total de cada cão, aproximadamente 3mL, por punção venosa da veia cefálica, femoral ou jugular, e transferidas para tubos com anticoagulante (Vacuette® K3E K₃EDTA). De cada cão foram coletados dois tubos, um para a realização do inquérito sorológico, feito pela DIVAL, e outro tubo para realização da extração de DNA e do teste imunocromatográfico rápido. As amostras foram centrifugadas a 4.500rpm por 10 minutos, e os plasmas obtidos foram congelados a -20°C até o processamento do teste.

4.5 Identificação dos ectoparasitos

Todos os ectoparasitos coletados foram identificados antes da sua dissecação baseando-se em Aragão (1936), Aragão & Fonseca (1961), Guimarães et al., (2001) e Barros-Battesti (2006), e separados por sexo (Anexo 1 e 2).

4.6 Dissecção dos carrapatos

4.6.1 Fixação do carrapato

A dissecção foi realizada conforme protocolo descrito por Edwards e colaboradores (2009) (Anexo 3) adaptado pela pesquisadora. Os carrapatos foram dissecados ainda vivos. Cada ectoparasito era colocado em uma placa de petri, permitindo que caminhasse expondo suas patas. A imobilização foi feita com uma vela, aquecida previamente e com chama alta. Uma gota da parafina foi cuidadosamente colocada diretamente no gnatossoma do artrópode. Nesse momento, as patas se retraíam, mas logo em seguida, na tentativa de se livrar da parafina, expunham as patas novamente, sendo cobertas também com a parafina. Apenas o escudo do carrapato permanecia intacto.

Com o auxílio de dois tipos de lâminas de bisturi (nº11 e nº12), foi realizada uma inserção por toda a margem do corpo, permitindo separar a parte dorsal da parte ventral. Todos os procedimentos foram realizados sobre placa de petri estéril, e quando necessário, adicionado uma gota de solução salina a 0,9% e 5-fluorocitosina (100mg/mL), para que o material não sofresse ressecamento pelo calor da lâmpada do microscópio estereoscópico e não fosse contaminado com fungos.

4.6.2 Isolamento do intestino e glândulas salivares

Após a exposição do conteúdo interno dos ectoparasitos, primeiro foram retiradas as glândulas salivares cuidadosamente, com auxílio de pinças metálicas histológicas com pontas finas. Esse processo foi realizado antes da retirada do intestino para evitar possível contaminação. As glândulas foram colocadas em um eppendorf contendo 0,2mL de solução salina a 0,9% e 5-fluorocitosina (100µg/mL) e armazenadas a -20°C para posterior extração do DNA.

Em seguida, o intestino foi retirado e armazenado em outro tubo eppendorf de 2mL como descrito nas glândulas salivares.

4.7 Preparo das culturas

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Romero e colaboradores em 1999. Foi utilizado ágar sangue base nº 2 (DIFCO cod. 0696-17), sangue de coelho desfibrinado a 15%, o qual foi adicionado após a fusão do ágar a 50°C. Também foram adicionados ao meio, gentamicina (100 µg/mL) e 5-fluorocitosina (100 µg/mL) e a mistura foi distribuída em tubos de vidro de 10 ml (Vacutainer®). Os tubos foram fechados com tampas de borracha e armazenados a 8°C.

Após o isolamento das glândulas salivares e do intestino de cada carrapato, o restante do conteúdo extravasado, foi transferido para um eppendorf contendo 0,2mL de salina a 0,9% e 5-fluorocitosina (100µg/mL) e mantido sob refrigeração a 8°C por aproximadamente 30 minutos a uma hora. Em seguida, com auxílio de uma seringa de 1mL e agulha de calibre 22 (0,70x25), após prévia desinfecção das tampas dos tubos com álcool a 70%, o material foi inoculado nos meios de cultura. Estes foram avaliados a cada 2 dias, até o 30º dia.

4.8 Preparo dos esfregaços

Depois da retirada do material para isolamento das glândulas, intestino e material para meio de cultura, o artrópode aparentemente ficou sem conteúdo interno, restando apenas resquícios do extravasamento do material retirado, que foram umedecidos com a solução de salina a 0,9% e 5-fluorocitosina (100µg/mL), quando necessário.

Cautelosamente o exoesqueleto e restos teciduais do carrapato foram utilizados para fazer *imprints* em lâminas de microscopia. O “esfregaço” foi fixado com álcool metílico e, após secagem, corado com *Giemsa*, para posterior exame ao microscópio óptico em objetiva de imersão com aumento de 1000x.

4.9 Morfometria dos tripanossomatídeos

Tendo em vista os resultados de Madeira e colaboradores (2009), foi realizada análise morfométrica dos tripanossomatídeos encontrados no esfregaço produzido com o conteúdo interno dos carrapatos. Aproximadamente 100 tripanossomatídeos foram examinados por microscopia de luz em 1000x usando uma ocular micrométrica. Os seguintes parâmetros foram escolhidos para a morfometria: (i) de comprimento total dos epimastigotas, incluindo o flagelo (CT), (ii) largura ao nível do núcleo dos epimastigotas (L), (iii) comprimento dos eixos perpendiculares dos esferomastigotas (L-1 e L-2) e (iv) comprimento do eixo longitudinal do cinetoplasto (C). Essas medidas foram comparadas com as descritas para outras espécies de tripanossomatídeos (*T. cruzi*, *T. rangeli* e *T. caninum*) por Madeira e colaboradores (2009).

4.10 Extração do DNA das amostras sanguíneas

As amostras de sangue (sem plasma) dos cães foram mantidas congeladas a -20°C até o processamento. O protocolo empregado para as extrações foi o utilizado rotineiramente pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da UnB, utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América)

Para cada amostra foi preparado um tubo eppendorf (1,5mL) com 900µL de solução de lise celular. Com a amostra descongelada e homogeneizada, foram adicionados 300µL desta no tubo com a solução de lise celular. O material foi ressuspendido com a pipeta. O tubo foi misturado por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000rpm por 30 segundos, o sobrenadante foi desprezado, restando apenas um pellet de mais ou menos 20µL do líquido. Adicionou-se 300µL de solução de lise celular ao pellet, ressuspendo-o com a pipeta. Novamente o material foi misturado por inversão, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 13.000rpm por 30 segundos. Mais uma vez o sobrenadante foi

desprezado, restando um pellet de aproximadamente 30 μ L do líquido. Adicionou-se 300 μ L de solução de lise nuclear ao pellet, ressuspendendo-o várias vezes com a pipeta. O material foi misturado no vórtex por 30 segundos e incubado a 37°C por 15 minutos, até a lise das hemácias e outras células se completar. Em seguida, foram adicionados 1,5 μ L de RNase A e o material incubado novamente por 15 minutos a 37°C.

Após a incubação, foram adicionados 100 μ L de solução de precipitação de proteínas, o material foi misturado no vórtex por 30 segundos e em seguida centrifugado a 13.000rpm por 3 minutos. Nesta fase é possível verificar a presença de um pellet grosso avermelhado, contendo as proteínas lisadas.

Um tubo eppendorf (1,5mL) foi preparado para cada amostra, contendo 300 μ L de isopropanol 100%. Foram retirados 400 μ L do sobrenadante que estavam no tubo com o pellet avermelhado, e transferidos para o tubo contendo isopropanol. O tubo com o pellet foi descartado. Cada amostra foi misturada por inversão aproximadamente 50 vezes para que fosse possível a visualização de fios brancos de DNA. O material foi centrifugado a 13.000rpm por 1 minuto, o sobrenadante desprezado, e o tubo invertido em papel de filtro. O pellet que restou no tubo foi lavado com 300 μ L de etanol a 70%. Novamente o material foi centrifugado por 1 minuto, o etanol foi descartado com a pipeta, restando apenas um precipitado branco. O tubo foi invertido sobre papel de filtro por 15 minutos para secagem do pellet.

Foram adicionados em cada tubo, 100 μ L de solução de hidratação de DNA, agitando o tubo levemente para desprender o pellet do fundo. As amostras foram aquecidas em um termobloco a 65°C por uma hora para que finalmente fossem submetidas ao processo de amplificação.

4.11 Extração do DNA das glândulas salivares e intestinos dos carrapatos

As amostras dos *pools* de intestinos e glândulas salivares foram mantidas congeladas a -20°C até o processamento. O protocolo empregado para as extrações foi padronizado pelo Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical da UnB, utilizando o kit *illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, New York, Estados Unidos da América).

As extrações dos intestinos foram feitas em uma etapa e das glândulas salivares em outro momento, cada extração utilizou apenas um tipo de material.

As amostras foram transferidas (300µL) para tubos eppendorf de 2mL com tampa, lavados com 1 mL de PBS estéril, centrifugadas a 14.500rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O material foi triturado com 50µL de PBS estéril e centrifugado a 4.700rpm por 10 segundos. Esta etapa foi necessária para homogeneização do material.

Foram adicionados 50µL da solução de nº1 e 10µL de proteinase K no material. As amostras foram misturadas no vórtex por 15 segundos e incubadas a 56°C por uma hora. Após o período de incubação, os tubos com as amostras foram agitados manualmente e centrifugados a 4.700rpm por 10 segundos para obtenção de um pellet. Foram adicionados 5µL de RNase A de 20mg/mL nas amostras, em seguida os tubos foram invertidos aproximadamente 25 vezes para homogeneizar o material, que foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, foram adicionados 500µL da solução de lise nº2, o material misturado no vórtex por 15 segundos e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, as amostras foram transferidas para a coluna já encaixada no tubo sem tampa, centrifugadas por 10.900 rpm por 1 minuto, e o líquido filtrado que migrou para o tubo foi descartado.

Foram adicionados 500µL da solução de lise nº2 à coluna, o material centrifugado a 11.000rpm por 1 minuto e o líquido filtrado no tubo foi descartado. Em seguida, foram adicionados 500µL de tampão de lavagem à coluna, o material centrifugado a 10.900rpm por 3 minutos, e o tubo com o líquido filtrado foi descartado.

A coluna com as amostras foi transferida para um novo tubo eppendorf de 2mL com tampa. Foram adicionados à coluna 200µL de solução de eluição aquecida a 70°C e os tubos incubados por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.900rpm por 1 minuto para coletar o DNA no tubo com tampa. O material filtrado foi armazenado entre 4°C e 6°C até o momento da amplificação.

4.12 Extração do DNA dos parasitos isolados em meios de cultura

Os meios de cultura que apresentaram crescimento de formas flageladas foram submetidos à extração de DNA para tentar identificar a espécie do parasito.

Para realização da extração do DNA das culturas foi necessário centrifugá-las a 5.000rpm por dois minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e adicionado ao tubo 800µL de solução de lise celular.

O material foi incubado por 15 minutos a 100°C. Após o período de incubação, foram retirados 700µL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo de 1,5mL. Ao novo tubo, foram adicionados 700µL de uma mistura de 350µL de fenol + 350µL de clorofórmio-álcool isoamílico. O material foi homogeneizado por 5 minutos e centrifugado por 13.000rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação, a fase superior foi transferida novamente para um novo tubo, adicionado a mistura de fenol e clorofórmio, homogeneizado e centrifugado. Mais uma vez, a fase superior foi transferida para um novo tubo e, adicionados 700µL de clorofórmio para a precipitação de proteínas. O material foi homogeneizado até formar uma emulsão, centrifugado por 10 minutos a 13.000rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

Foram adicionados ao novo tubo 700µL de isopropanol + 70µL de acetato de sódio 3M, e centrifugado por 30 segundos a 13.000rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionados 500µL de álcool etílico 70%. Novamente o material foi centrifugado por 30 segundos a 13.000rpm, o sobrenadante descartado, e o DNA ressuspendido em 50µL de Tris-EDTA (TE). O DNA foi hidratado por uma hora a 65°C para que pudesse ser amplificado.

4.13 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Os controles positivos utilizados nas reações da PCR foram obtidos a partir do isolamento do DNA de culturas em crescimento exponencial de *L. (L.) chagasi* (MCER/BR/79/M6445), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).

4.13.1 Amplificação de região conservada de kDNA de *Leishmania* spp.

Os iniciadores (*primers*) utilizados foram desenhados para amplificar 120 pares de bases da região conservada do kDNA, de *Leishmania* spp. As sequências específicas dos iniciadores foram BW-B: 5' CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC 3'; FW: 5' GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3'; BW-CA: 5' GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC 3' (Carranza-Tamayo, 2010).

O procedimento de amplificação dos 120pb da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp. foi realizado com um volume final de 10µL com a seguinte mistura padrão:

Tabela 1. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações na mistura utilizada no processo de amplificação do alvo de 120pb de kDNA de *Leishmania* spp.

| Reagente | Concentração | Volume por reação |
|--------------------------|--------------|-------------------|
| Buffer | 5X | 1µL |
| dNTPs | 2mM | 1µL |
| MgCl₂ | 25mM | 1µL |
| Primer F | 1,2µM | 1µL |
| Primer BW-B/BW-CA | 0,6µM | 1µL |
| TaqDNA polimerase | 5u/µL | 0,1µL |
| H₂O | — | 3,9µL |
| DNA | — | 1 µL |

Esta amplificação foi realizada em um termociclador *Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400* (The Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA) com as etapas descritas na Tabela 2:

Tabela 2. Etapas do processo de amplificação de 120pb da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp.

| Etapa | Temperatura | Duração |
|--|-------------|-------------|
| Etapa 1 - desnaturação | 95°C | 5 minutos |
| Etapa 2 - 39 ciclos | 95°C | 30 segundos |
| (desnaturação, anelamento e extensão) | 66°C | |
| | 72°C | |
| Etapa 3 – extensão final | 72°C | 5 minutos |
| Etapa 4 | 4°C | ∞ |

4.13.2 Amplificação de fragmento do gene de hsp70

Outros iniciadores também foram utilizados e digeridos para amplificar alvos de 243pb de hsp70 de *Leishmania* spp. As sequências dos iniciadores

foram FW 5' GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT 3'; BW 5' TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG 3'.

A amplificação dos alvos de 234pb de hsp70 foi realizada com um volume final de 25µL (glândulas salivares, intestinos, sangues caninos e culturas) e a mistura padrão foi:

Tabela 3. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações na mistura utilizada no processo de amplificação do alvo de 234 pb do gene de hsp70 de *Leishmania* spp.

| Reagente | Concentração | Volume por reação |
|--------------------------|--------------|-------------------|
| Buffer | 5X | 5,0 µL |
| dNTPs | 2,5mM | 2,0 µL |
| MgCl₂ | 25mM | 1,5 µL |
| Primer FW | 20pM | 0,25 µL |
| Primer BW | 20pM | 0,25 µL |
| TaqDNA polimerase | 5u/µL | 0,15 µL |
| H₂O | — | 14,85 µL |
| DNA | — | 1 µL |

Esta amplificação foi realizada em um termociclador *TC-Plus* (Techne, Inglaterra, UK) com a seguinte programação:

Tabela 4. Etapas do processo de amplificação dos 234pb do gene hsp70 de *Leishmania* spp.

| Etapa | Temperatura | Duração |
|--|-------------|-------------|
| Etapa 1 - desnaturação | 94°C | 5 minutos |
| Etapa 2 - 30 ciclos | 94°C | 30 segundos |
| (desnaturação, anelamento e extensão) | 63°C | 1minuto |
| | 72°C | 1minuto |
| Etapa 3 - extensão final | 72°C | 10 minutos |
| Etapa 4 | 4°C | ∞ |

4.13.3 Amplificação da região conservada de kDNA de *Trypanosoma cruzi*

Os iniciadores utilizados foram desenhados para amplificar 330 pares de bases da região conservada e variável do kDNA de *Trypanosoma cruzi*. As sequências específicas dos iniciadores foram S35: ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC; S36: GGT TCG ATT GGG GTT GGT G.

O procedimento de amplificação dos 330pb da região conservada do kDNA de *Trypanosoma cruzi* foi realizado com um volume final de 25µL para 14 amostras com a seguinte mistura padrão:

Tabela 5. Relação dos reagentes e suas respectivas quantidades necessárias para o máster mix utilizado no processo de amplificação do alvo de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.

| Reagente | Concentração | Volume |
|-------------------|--------------|----------|
| Buffer | 5X | 2,5 µL |
| dNTPs | 2mM | 2,5 µL |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,5 µL |
| Primer S35 | 10µM | 1,25 µL |
| Primer S36 | 10µM | 1,25 µL |
| TaqDNA polimerase | 5u/µL | 0,3 µL |
| H ₂ O | — | 12,45 µL |
| DNA | — | 3 µL |

Esta amplificação foi realizada em um termociclador *TC-Plus* (Techne, Inglaterra, UK) com a seguinte programação:

Tabela 6. Programação utilizada no processo de amplificação do alvo de 330pb de kDNA de *T. cruzi*.

| Etapa | Temperatura | Duração |
|--|----------------------|-------------|
| Etapa 1 - desnaturação | 95°C | 5 minutos |
| Etapa 2 - 35 ciclos (desnaturação, anelamento e extensão) | 95°C 63°C 72°C | 30 segundos |
| Etapa 3 - extensão final | 72°C | 5 minutos |
| Etapa 4 | 4°C | ∞ |

Todos os produtos amplificados foram armazenados a 4°C até a corrida eletroforética.

4.13.4 Purificação dos produtos da PCR

O protocolo empregado para as extrações foi o descrito pelo kit Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, New York, Estados Unidos da América).

O volume total das amostras amplificadas foi transferido para tubos eppendorf de 2mL com tampa, e em seguida adicionados de 500µL do tampão 3 em cada tubo. O material foi misturado por inversão.

As amostras foram transferidas para a coluna já encaixada no tubo sem tampa, e centrifugadas por 16.000g durante 30 segundos. O líquido obtido no tubo de coleta foi descartado e a coluna colocada novamente dentro do tubo.

Foram adicionados 500µL de tampão de lavagem tipo 1 na coluna, e o material centrifugado por 16.000g durante 30 segundos. Após a centrifugação, o tubo de coleta foi descartado e a coluna (seca) transferida para um novo tubo de coleta de 1,5mL.

Foram adicionados 50µL de tampão de eluição tipo 6 à coluna (encaixada no tubo). O material permaneceu incubado por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi centrifugada por 16.000g por 1 minuto para coletar o DNA purificado.

4.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da PCR foram examinados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, 150 volts, 75Amp, por 90 minutos. Em seguida, o gel foi fixado com 100mL de solução fixadora (5mL ácido acético glacial e água bidestilada q.s.p. 1000mL) a 10% por 5 minutos, corado com 100mL de solução de prata a 0,2% por 5 minutos, lavado com água bidestilada delicadamente, e por último, foram acrescentados 100mL de solução de

hidróxido de sódio a 3% com 800µL de formaldeído PA por 15 minutos para finalização da revelação.

O marcador de peso molecular utilizado em todos os géis foi o *DNA Molecular Weight Marker V* (Roche Applied Science – Alemanha), capaz de identificar fragmentos entre 8 e 587pb.

4.15 Digestão enzimática com endonucleases

A PCR-RFLP foi realizada de acordo com protocolos usualmente utilizados no laboratório de leishmanioses/NMT e com produtos de PCR sabidamente positivos.

A PCR-RFLP que utilizou a enzima HaeIII foi realizada da seguinte maneira: os tubos foram previamente identificados e incubados em banho Maria a 37° (máximo de variação de 2°C). Foram adicionados 5µL de amostra em seus respectivos tubos, e em seguida, adicionado 5µL de mix (10 unidades da enzima HaeIII, 10µL de tampão 10X e 39 µL de água ultrapura, suficientes para 10 amostras). As amostras permaneceram incubadas por 1 hora e em seguida submetidas à corrida eletroforética.

A PCR-RFLP que utilizou a enzima BstUI foi realizada da seguinte maneira: os tubos foram previamente identificados e incubados em banho Maria a 60° (máximo de variação de 2°C). Foram adicionados 10µL de amostra em seus respectivos tubos, e em seguida, adicionado 10µL de mix (0,3 unidades da enzima BstUI, 10µL de tampão 1X e 77 µL de água ultrapura, suficientes para 10 amostras). Estas amostras também permaneceram incubadas por 1 hora e em seguida submetidas à corrida eletroforética.

4.16 RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Os tubos com as amostras sanguíneas coletadas dos cães, destinados aos testes de ELISA (kit EIE-LVC BioManguinhos/FIOCRUZ) e RIFI (kit IFI-LVC Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), foram armazenados e processados pela

DIVAL, utilizando protocolos padronizados por sua equipe técnica. Apenas as amostras com resultados reagentes no teste ELISA foram submetidas à RIFI para confirmação da positividade. Os resultados destes testes foram registrados nos livros específicos para registro de resultados do laboratório da DIVAL (Brasil, 2011).

4.17 Teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso – TR DPP (Dual Path Platform)

O Kit utilizado foi o TR DPP[®] Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos, Brasil.

O ensaio emprega uma combinação de proteína A conjugada com partículas de ouro coloidal e antígenos recombinantes para *Leishmania* K28 (fragmentos K26, K39 e K9). São ligados à fase sólida de uma membrana de nitrocelulose para detectar anticorpos específicos para *Leishmania* em sangue total, soro ou plasma (Schubach, 2011).

As amostras de plasma armazenadas a -20°C foram deixadas a temperatura ambiente até que se descongelassem por completo. Encostando a alça coletora diretamente na amostra, foi possível coletar 5µL e transferir para o poço #1 (amostra+tampão) do suporte de teste. Em seguida, foram adicionadas duas gotas de tampão no mesmo poço. Após 5 minutos, quando a linha azul (teste) e verde (controle) da janela havia desaparecido, foram adicionadas quatro gotas de tampão no poço #2 (tampão). O teste correu por 10 minutos a temperatura ambiente.

O suporte foi colocado sobre uma superfície plana e em local iluminado, e dois observadores independentes avaliaram o resultado, posicionando-se a uma distância de 30cm a 50cm entre o suporte de teste e seus olhos no momento da leitura. Foi prevista a avaliação por um terceiro observador para dirimir o resultado. A interpretação do resultado seguiu rigorosamente as recomendações do fabricante.

4.18 Sequenciamento do DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas pela empresa Genomic Engenharia Molecular utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Applied Biosystems. Os produtos de sequenciamento foram submetidos à eletroforese em um sequenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems. Normalmente, as reações de sequenciamento realizadas por esta empresa alcançam 650 bases, com uma fidelidade de análise de 99%. As sequências obtidas foram editadas usando o programa DNAMAN (Lynnon Corporation, Canada). Posteriormente, as sequências foram comparadas com sequências de espécies de *Leishmania* depositadas no GenBank usando o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos da América (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.19 Análise por isoenzimas (MLEE - *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*)

A cultura de *Leishmania* foi mantida em meio semi-sólido e depositada para análise por isoenzimas no Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ conforme descrito por Cupolillo et al. (1994). Foram aferidas as enzimas G6PDH, 6PGDH e IDH-NADP.

4.20 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina da UnB e seguiu com rigor os princípios éticos na experimentação animal (Anexo 4) . Foram levados em consideração os Aspectos Éticos da Experimentação Animal e Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO) e a Lei Arouca (Lei Federal nº 11.794/2008).

Segundo normas do Ministério da Saúde, todos os cães positivos para leishmaniose devem ser eutanasiados. A solução utilizada pela equipe de

veterinários da DIVAL para eutanásia continha drogas que minimizaram o estresse dos cães soropositivos e foi composta por 32mg de Etomidato, 3mg de Cloridrato de Midazolam e 50mg de Quetamina (Cloridrato de cetamina). A coleta dos carrapatos não produziu dor para os cães.

Após a eutanásia, os cães foram levados para o incinerador do Serviço de Limpeza Urbana do Distrito Federal (SLU).

5. RESULTADOS

5.1 Características da amostra de cães

Foram incluídos no presente estudo 48 cães, dos quais, 23 (48%) eram machos e 25 (52%) fêmeas. Do total de cães, 14 (29,2%) possuíam idade desconhecida, 6 (12,5%) tinham entre 5 meses e 1 ano, 19 (39,6%) tinham entre 1 e 7 anos e 9 (18,7%) tinham entre 8 e 14 anos.

Dos 48 cães, 30 (62,5%) foram descritos como sendo sem raça definida (SRD), 3 (6,2%) cães eram da raça Pit Bull, 2 (4,2%) eram Rottweiler, 2 (4,2%) Pastor Alemão, 2 (4,2%) Pastor Belga branco, 2 (4,2%) Boxer, e 7 (14,6%) cães eram de outras raças.

Em relação ao tipo de pelagem, 28 (58,3%) cães tinham pelagem curta, 18 (37,5%) pelagem média e 2 (4,2%) cães pelagem longa. No quesito porte, 11 (23%) cães eram pequenos, 21 (44%) tinham tamanho médio e 16 (33%) eram grandes. A cor preta foi encontrada em 12 (25%) cães, a marrom em 10 (21%) cães, e as cores cinza, bege, branca, amarela e preta/marrom foram descritas em 4 (8,3%) cães cada uma, restando 6 (12,5%) cães com outras cores.

A maior parte dos cães foi proveniente da região administrativa de Sobradinho I, 21 (43,7%) cães. Os demais eram provenientes das regiões: Lago Norte 9 (18,7%), Lago Sul 5 (10,4%), Sobradinho II 4 (8,4%), Varjão 4 (8,4%), Fercal 3 (6,2%) e Itapoã 2 (4,2%).

Dos 48 cães, 12 (25%) apresentaram algum tipo de sinal clínico sugestivo de leishmaniose, incluindo emagrecimento extremo, secreção ocular, onicogribose (Figura 3A) e úlceras cutâneas (Figura 3B); 36 (75%) cães eram assintomáticos, porém, todos provenientes de área de risco.

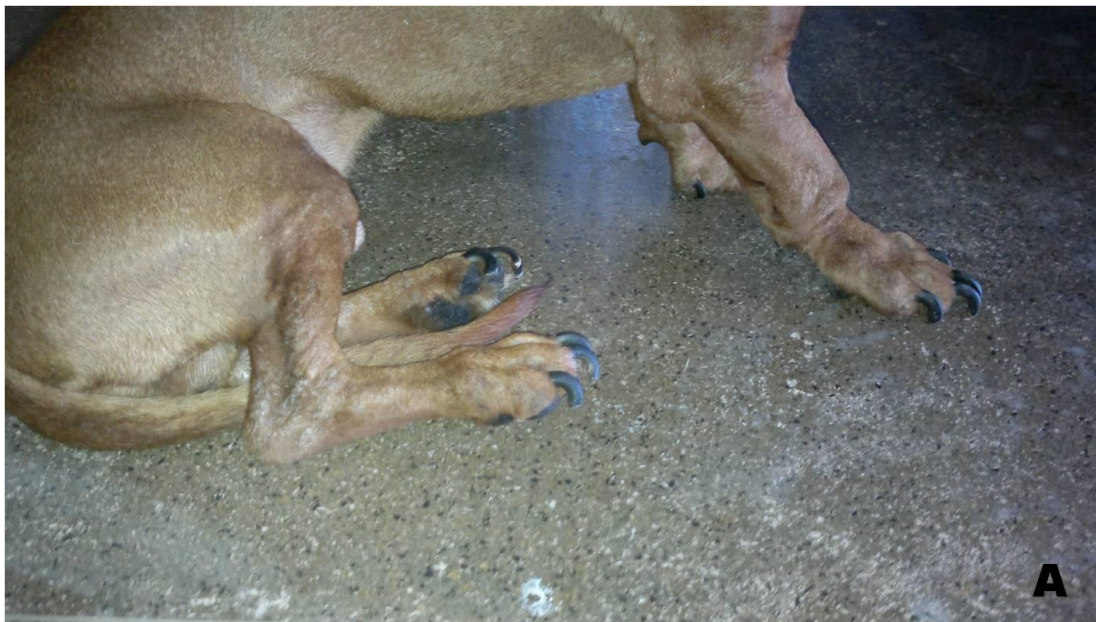


Figura 3. Cães com sinais clínicos sugestivos de leishmaniose; onicogribose (A) e úlceras cutâneas (B).

5.2 Ectoparasitismo

Dos 48 cães, 27 (56,25%) estavam ectoparasitados, sendo 13 (48,15%) machos e 14 (51,85%) fêmeas. Dos 21 (43,75%) cães que não estavam ectoparasitados, 10 (47,6%) eram machos e 11 (52,4%) eram fêmeas.

Nos cães ectoparasitados foram encontrados 130 carrapatos, todos identificados como *R. sanguineus*, sendo 61 (47%) machos, 62 (47,7%) fêmeas e 7 (5,3%) ninfas. Das 62 fêmeas, 37 (59,6%) estavam ingurgitadas.

5.3 Avaliação sorológica dos cães

Os 48 cães foram submetidos ao teste de ELISA, e 32 (66,6%) apresentaram resultados positivos para leishmaniose. Estas amostras foram submetidas à RIFI, resultando em 26/32 (81,2%) cães com resultados positivos. No DPP, 27/48 (56,2%) cães apresentaram positividade. Dos 48 cães, 34 (70,8%) apresentaram pelo menos um dos três testes com resultado reagente ou positivo (Apêndice 2).

5.4 Detecção de DNA pela PCR em sangue canino

A amplificação do alvo de 120 pb da região conservada de kDNA foi positiva em 26 (54,2%) cães (Apêndice 2).

5.5 Resultados da pesquisa direta de flagelados no conteúdo dos carrapatos

Das 130 lâminas confeccionadas, foram encontradas formas flageladas sugestivas de tripanossomatídeos não identificados (Figura 4) em apenas 1 lâmina obtida de um carrapato macho que foi retirado de um cão que apresentou teste de ELISA reagente, RIFI com titulação igual a 1/80, DPP positivo, PCR kDNA positivo, PCR kDNA do *pool* de glândulas salivares e intestinos também positivos, assim como isolamento em cultura positivo.

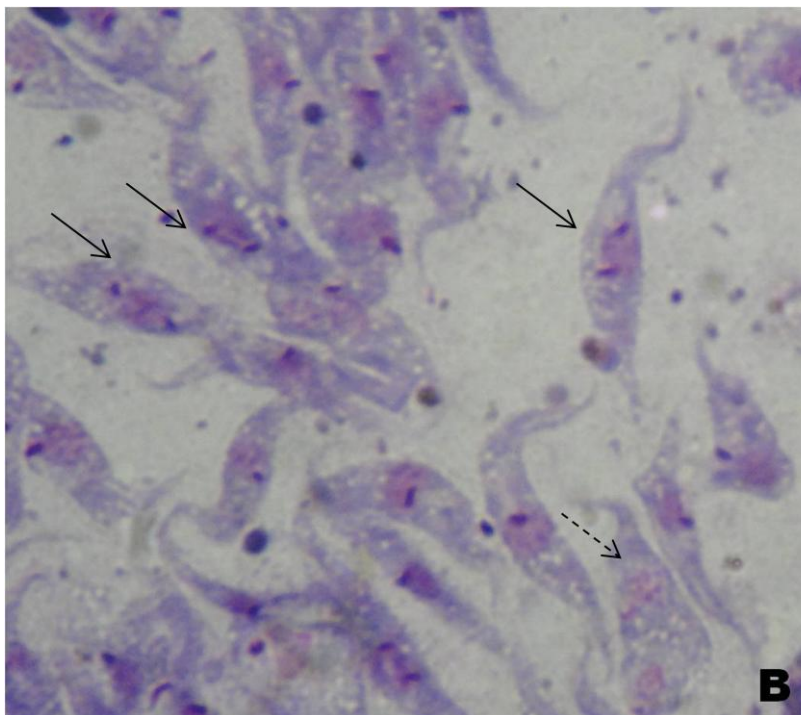
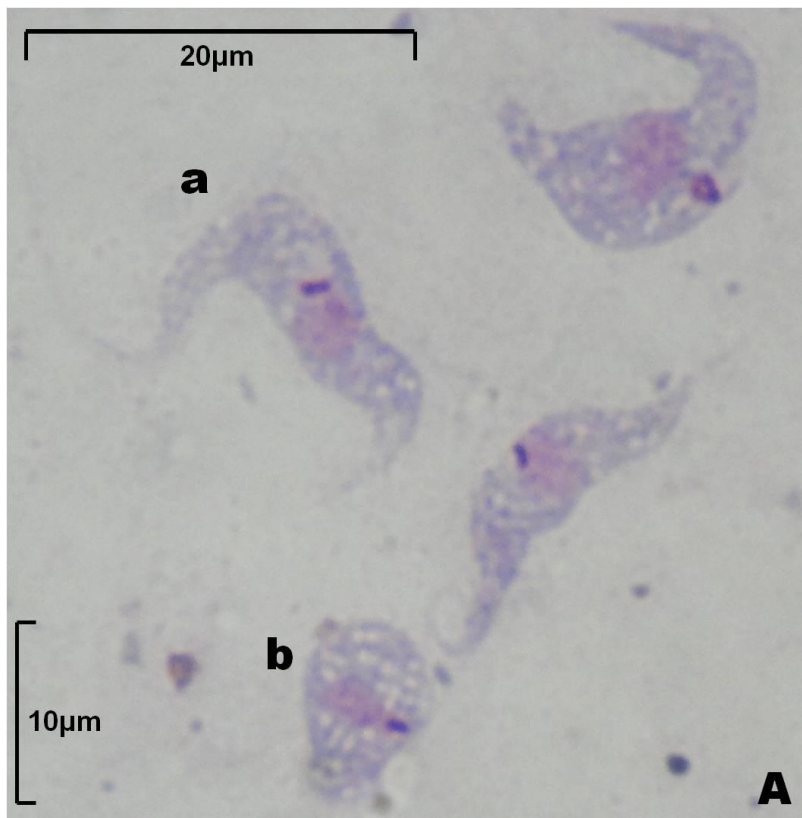


Figura 4. . Formas flageladas de tripanossomatídeos em esfregaço do material obtido durante a dissecação de um exemplar macho de *Rhipicephalus sanguineus*. A. detalhe da forma epimastigota (a) e esferomastigota (b). B. formas epimastigotas, as setas contínuas indicam flagelados com dois cinetoplastos e a seta tracejada um flagelado com dois núcleos, evidenciando processos de reprodução assexuada por bipartição. Aumento 1000X.

A análise da morfometria comparativa entre as formas destes tripanossomatídeos com formas epimastigotas e esferomastigotas de *Trypanosoma caninum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* mostrou que o tripanossomatídeo em questão é menor que *T. caninum* é maior que *T. cruzi*. Apesar de comprimento total dos epimastigotas ser mais similar aos de *T. rangeli*, a largura é maior. Além disso, os esferomastigotas do tripanossomatídeo apresentaram maior largura que os de *T. rangeli* (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados da morfometria comparativa entre os estágios de desenvolvimento das formas do tripanossomatídeo encontrado em um carrapato macho coletado em cão proveniente de área endêmica de leishmaniose visceral no Distrito Federal, Brasil, 2011.

| Espécies | Epimastigotas | | Esferomastigotas | | |
|-----------------------------------|---------------|---------|------------------|----------|---------|
| | CT | L | C | L-1 | L-2 |
| Trypanosomatidae sp. | 26.0±5.3 | 4.0±0.7 | 1.0±0 | 10.2±1.5 | 9.3±1.1 |
| <i>Trypanosoma caninum</i> | 43.0±6.9 | 2.2±0.5 | 1.3±0.4 | 5.9±1.3 | 4.9±0.9 |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19.0±2.4 | 1.0±0.2 | 1.8±0.3 | ND | ND |
| <i>Trypanosoma rangeli</i> | 29.4±6.3 | 1.3±0.2 | 1.1±0.2 | 4.8±1.0 | 3.9±0.5 |

CT: comprimento total; L: largura ao nível do núcleo; C: eixo longitudinal do cinetoplasto; L-1 e L-2: largura dos eixos perpendiculares; ND: não determinado. As medidas de *T. caninum*, *T. cruzi* e *T. rangeli* foram obtidas em Madeira et al. (2009).

5.6 Isolamento em cultura

Foram realizadas 44 inoculações em meios de cultura, tendo em vista que os carrapatos de cada cão foram separados em *pools* (até 10 carrapatos) de machos, fêmeas e ninfas. Do total, 11,4% (5/44) das culturas apresentaram fungos e foram descartadas.

Cinco tubos com meio de cultura inoculados com material de *pools* de carrapatos coletados de quatro cães apresentaram crescimento de formas flageladas compatíveis com tripanossomatídeos, sendo dois *pools* de carrapatos machos e três *pools* de carrapatos fêmeas (Figura 5).

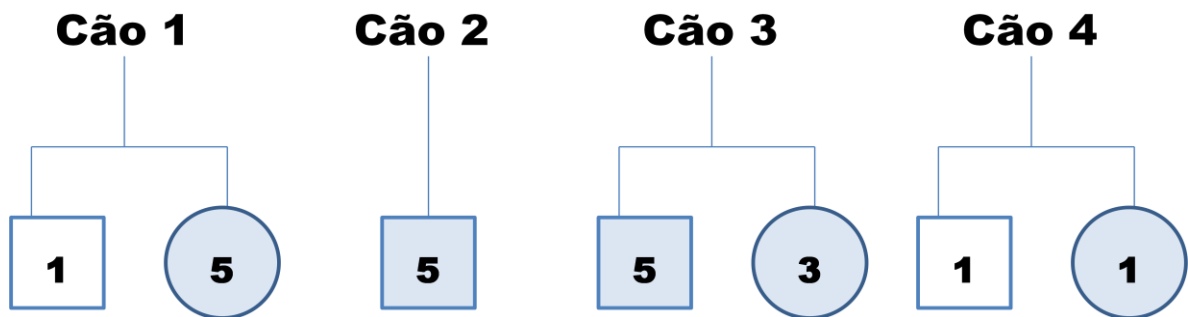


Figura 5. Resultados das inoculações em meios de cultura. Os números dentro dos quadrados e círculos representam a quantidade de carrapatos machos e fêmeas, respectivamente coletados em cada cão. As áreas sombreadas representam os *pools* que apresentaram crescimento de formas flageladas compatíveis com tripanossomatídeos.

As culturas referentes aos carrapatos coletados nos cães 1 e 2 apresentaram positividade porém, não houve crescimento suficiente para que as mesmas fossem criopreservadas. Estas culturas foram congeladas a -80°C para posterior análise pelas técnicas de PCR.

As culturas do *pool* de machos referentes ao cão 3 apresentaram crescimento de fungos após 8 dias de inoculação e imediatamente foram congeladas para extração de DNA de *Leishmania* spp. As culturas do *pool* de fêmeas referentes ao mesmo cão foram as que mais se desenvolveram e puderam ser criopreservadas. As formas flageladas encontradas neste meio de cultura são semelhantes às formas flageladas de *Leishmania* spp. (Figura 6). O material referente aos carrapatos coletados no cão 4 também pôde ser criopreservado.

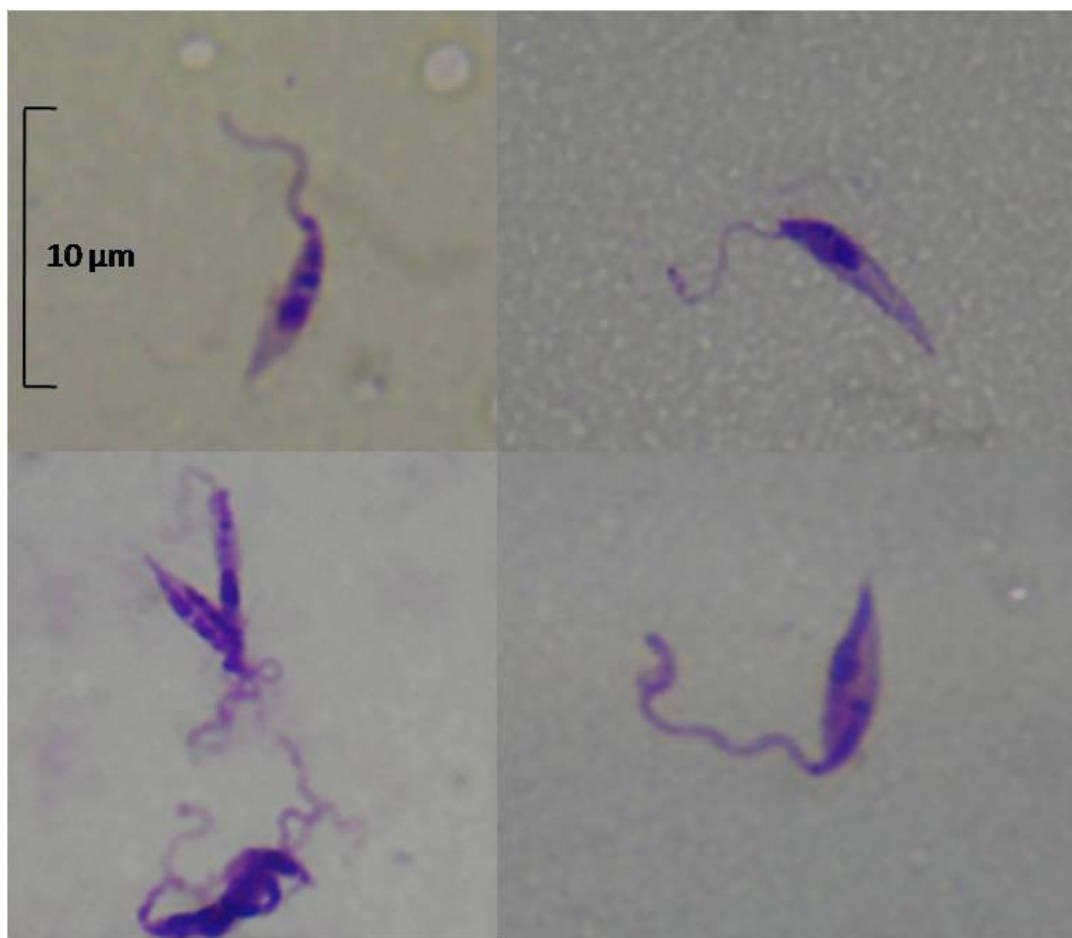


Figura 6. Formas flageladas sugestivas de *Leishmania* spp. (promastigotas) observadas no meio de cultura inoculado com o *pool* de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* observado em microscópio óptico com aumento 1000X.

5.7 Detecção de DNA de *Leishmania* spp. nos carrapatos

A tabela 8 apresenta os dados da positividade dos *pools* de glândulas salivares e intestinos submetidos à amplificação dos alvos 120pb de kDNA estudados.

Tabela 8. Resultados da detecção de DNA pela PCR em *pools* de glândulas salivares e intestinos de *Rhipicephalus sanguineus* coletados em cães provenientes de área endêmica de leishmaniose visceral no Distrito Federal, Brasil, 2011.

| Amplificação de 120pb de kDNA | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|------|
| Material estudado | Nº de pools positivos/ Nº avaliado | % |
| Glândula salivar | | |
| Fêmeas | 7/44 | 15,9 |
| Machos | 5/44 | 11,3 |
| Ninfas | 1/44 | 2,3 |
| Subtotal | 13/44 | 29,5 |
| Intestinos | | |
| Fêmeas | 6/44 | 13,7 |
| Machos | 5/44 | 11,3 |
| Ninfas | 1/44 | 2,3 |
| Subtotal | 12/44 | 27,3 |
| Total de pools | 25/44 | 56,8 |

Os resultados de todos os métodos aplicados às amostras caninas e de *Rhipicephalus sanguineus* coletados nos cães que apresentaram crescimento de *Leishmania* spp. em meios de cultura são apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados de todos os métodos aplicados às amostras obtidas de cães e carrapatos onde houve crescimento em cultura de *Leishmania* a partir do material obtido dos carrapatos. Distrito Federal, Brasil. 2011.

| Cão | ELISA | RIFI | DPP | PCR Sangue canino (kDNA) | PCR Sangue canino (hsp70) | Carrapatos Coletados | Sexo dos Carrapatos | PCR (kDNA) Pool G.Salivar | PCR (kDNA) Pool Intestinos | Meios de Cultura (NNN) | PCR (kDNA) Cultura | PCR (hsp70) Cultura |
|------------|--------------|-------------|------------|---|--|---------------------------------|--------------------------------|--|---|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | Negativo | 6 | 1 macho 5 fêmeas | Positivo Positivo | Negativo Positivo | Negativo Positivo | NR Positivo | NR Positivo |
| 2 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | Negativo | 5 | 5 machos | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 3 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | Positivo | 8 | 5 machos 3 fêmeas | Positivo Positivo | Positivo Positivo | Positivo Positivo | Positivo Positivo | Positivo Positivo |
| 4 | Reagente | 1/40 | Positivo | Positivo | Positivo | 2 | 1 macho 1 fêmea | Negativo Positivo | Negativo Positivo | Negativo Positivo | NR Positivo | NR Positivo |

NR: não realizado.

Tabela 10. Características dos cães que apresentaram crescimento em cultura de *Leishmania* a partir do material obtido dos carrapatos. Distrito Federal, Brasil. 2011.

| Cão | Sexo | Idade | Raça | Pelagem (Cor) | Pelagem (Tipo) | Porte | Região | Sintomatologia |
|------------|-------------|-----------------|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------|---------------|---|
| 1 | Macho | 11 meses | Rottweiler | Preto | Curta | Grande | Lago Norte | Secreção nos olhos e lesões cutâneas nas orelhas. |
| 2 | Macho | Desconhecida | SRD* | Marrom | Curta | Médio | Sobradinho II | Secreção nos olhos, lesões cutâneas nas orelhas e onicogribose. |
| 3 | Fêmea | 7 meses | Boxer | Marrom | Curta | Pequeno | Varjão | Assintomático. |
| 4 | Macho | 1 ano e 6 meses | SRD* | Marrom | Média | Grande | Itapoã | Assintomático. |

*SRD = Sem raça definida.

Todas as amostras de sangue e culturas referentes aos quatro cães foram analisadas pela PCR com amplificação de 120 pares de bases da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp. (Figura 7). Nesta reação apenas o DNA extraído da cultura do cão 2 não apresentou banda compatível com nenhuma das cepas de referência.

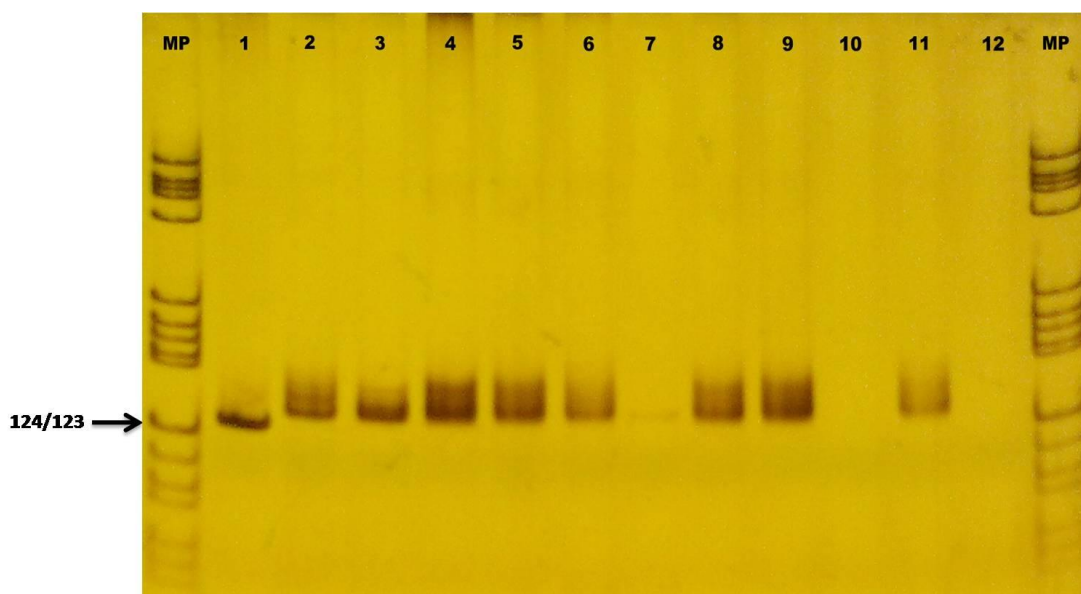


Figura 7. Produtos amplificados de kDNA 120pb em amostras de sangue de cães e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), *L. chagasi* (3); sangue do cão IV (4), sangue do cão III (5), sangue do cão II (6), sangue do cão I (7); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão IV (8), cão III (9), cão II (10) e cão I (11); e controle negativo (12). MP: marcador de peso molecular.

As amostras citadas anteriormente (amplificação de 120 pares de bases da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp.) foram utilizadas na PCR-RFLP e seu DNA digerido pela enzima HaeIII (Figura 8). A amostra de cultura do cão 2 não foi incluída por não apresentar resultado satisfatório na reação anterior, apenas o produto de PCR amplificado do sangue deste cão foi incluído na digestão pela enzima.

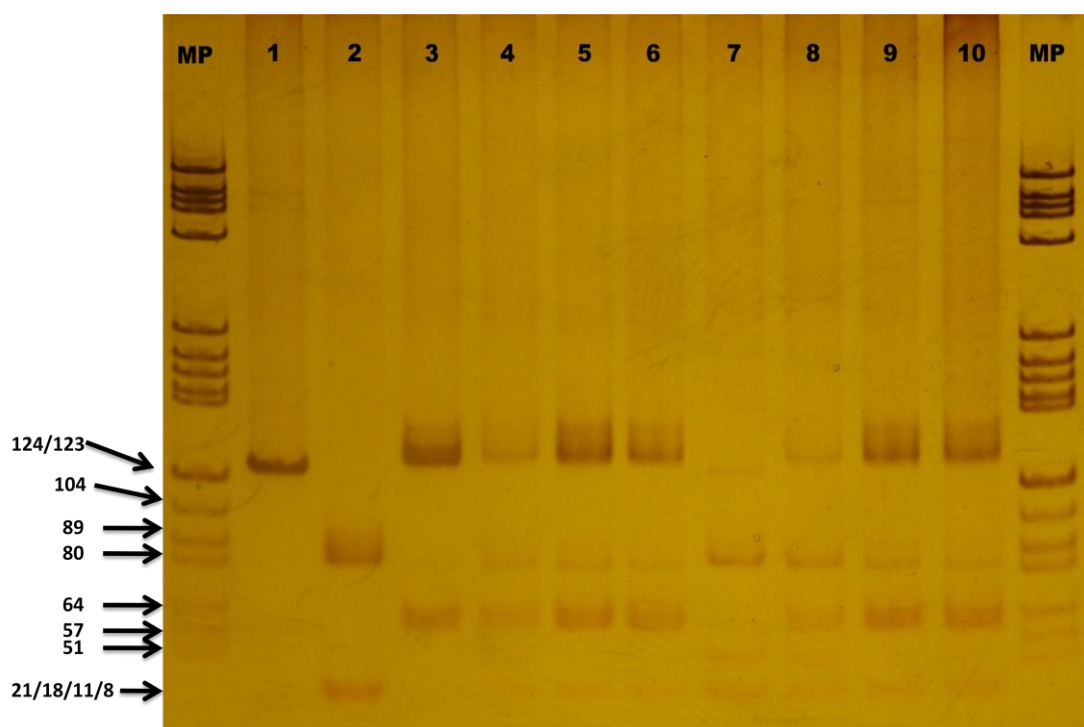


Figura 8. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangues caninos e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), *L. chagasi* (3); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão I (4), cão III (5), cão IV (6); sangue do cão I (7), sangue do cão II (8), sangue do cão III (9), sangue do cão IV (10); MP: marcador de peso molecular.

As amostras de DNA extraídas do sangue de cada cão e das suas referentes culturas, obtidas dos carrapatos, foram processadas em diferentes géis para que pudessem ser comparadas com as cepas de referência (Figuras 9, 10 e 11).

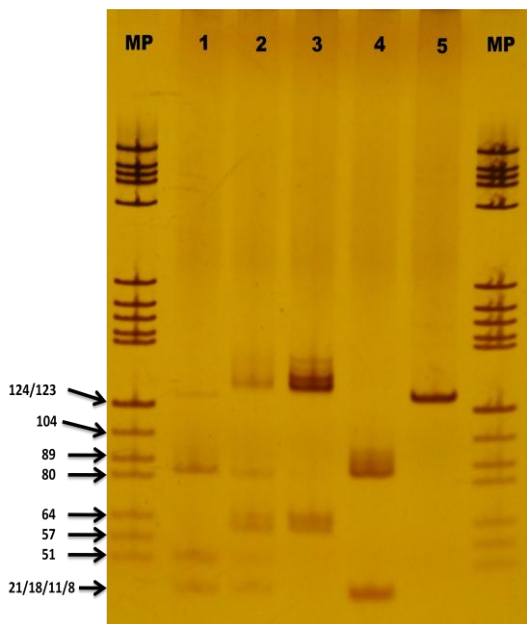


Figura 9. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue canino e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Cultura do material obtido dos carrapatos do cão I (1); sangue do cão I (2); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (3), *L. braziliensis* (4), *L. amazonensis* (5); MP: marcador de peso molecular.

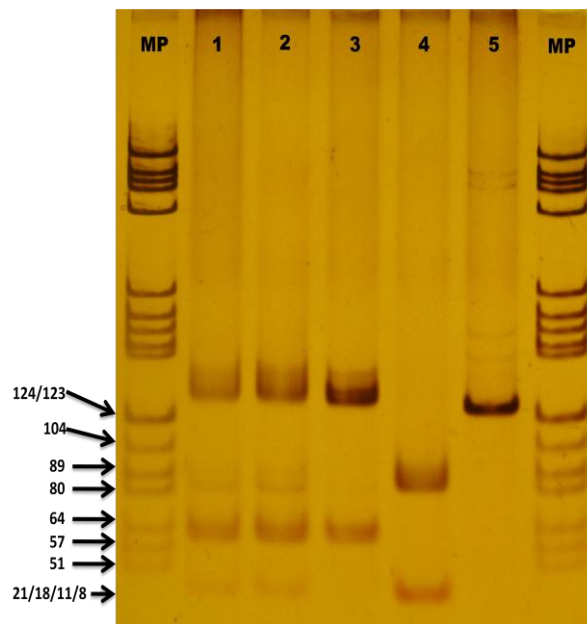


Figura 10. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue canino e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Cultura do material obtido dos carrapatos do cão III (1); sangue do cão III (2); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (3), *L. braziliensis* (4), *L. amazonensis* (5); MP: marcador de peso molecular.

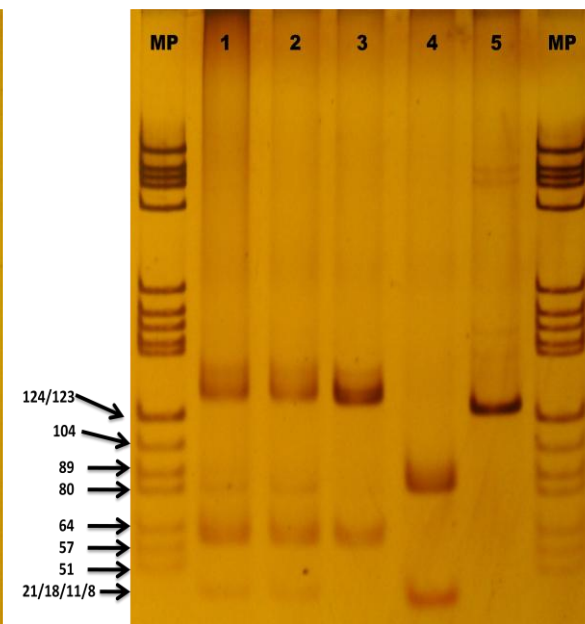


Figura 11. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de sangue canino e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Cultura do material obtido dos carrapatos do cão IV (1); sangue do cão IV (2); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (3), *L. braziliensis* (4), *L. amazonensis* (5); MP: marcador de peso molecular.

As amostras amplificadas de 120 pares de bases da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp. também foram digeridas pela enzima BstUI (Figura 12). A amostra de cultura do cão 2 não foi incluída por não apresentar resultado satisfatório na reação anterior, apenas o DNA extraído do sangue deste cão foi incluído na digestão pela enzima.

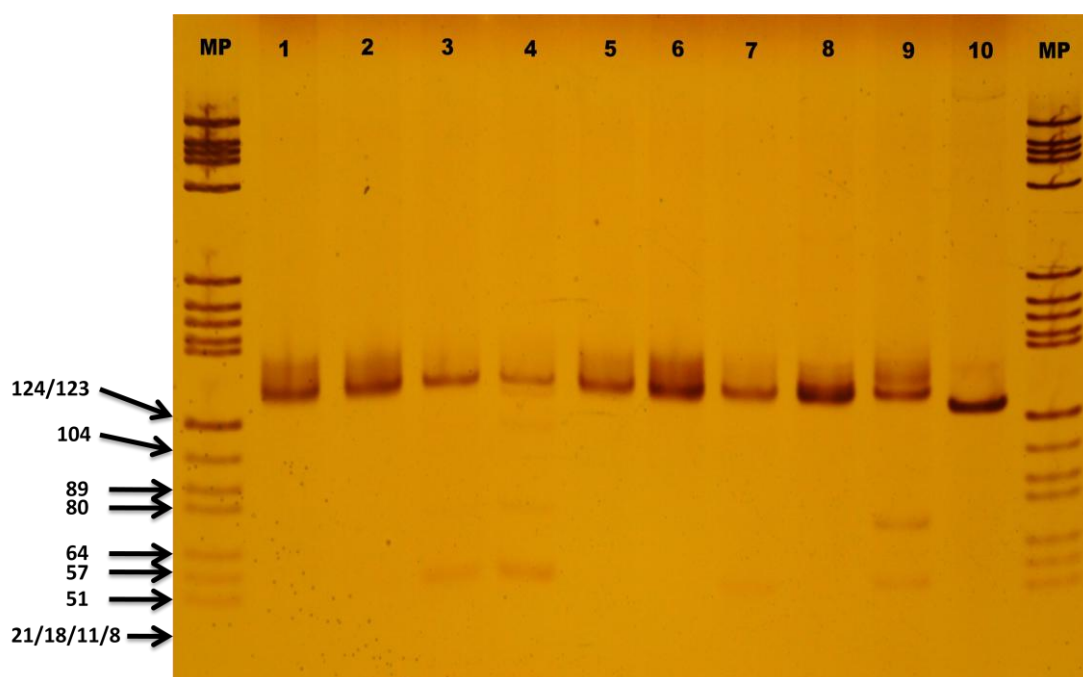


Figura 12. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima BstUI em amostras de sangues caninos e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Sangue do cão IV (1), sangue do cão III (2), sangue do cão II (3), sangue do cão I (4); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão IV (5), cão III (6), cão I (7); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (8), *L. braziliensis* (9), *L. amazonensis* (10); MP: marcador de peso molecular.

O DNA extraído das amostras de sangue do cão I e sua referente cultura, e do sangue do cão II, foi digerido pela enzima BstUI e as amostras processadas em outro gel para que pudessem ser comparadas com as cepas de referência (Figura 13).

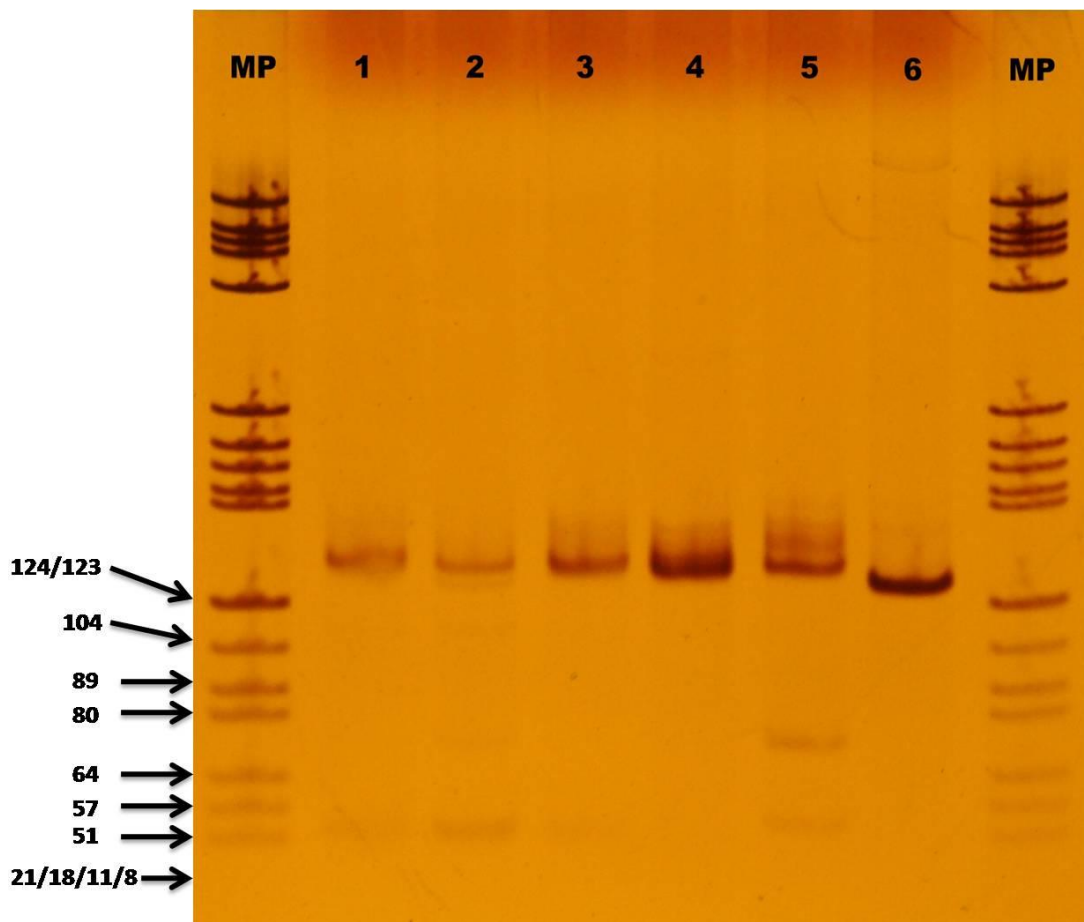


Figura 13. Produtos amplificados de kDNA 120pb e digeridos pela enzima BstUI em amostras de sangues caninos e cultura obtida do conteúdo dos carrapatos. Sangue do cão II (1), sangue do cão I (2); cultura do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão I (3); culturas de isolados de referência de *L. chagasi* (4), *L. braziliensis* (5), *L. amazonensis* (6); MP: marcador de peso molecular.

Todas as amostras referentes ao cão 3 foram analisadas pela PCR com amplificação de 120 pares bases da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp. (Figura 14), amplificação de alvos de 234pb de hsp70 de *Leishmania* spp. (Figura 15), sendo que o último método foi realizado com os produtos amplificados e digeridos pela enzima HaeIII (Figura 16).

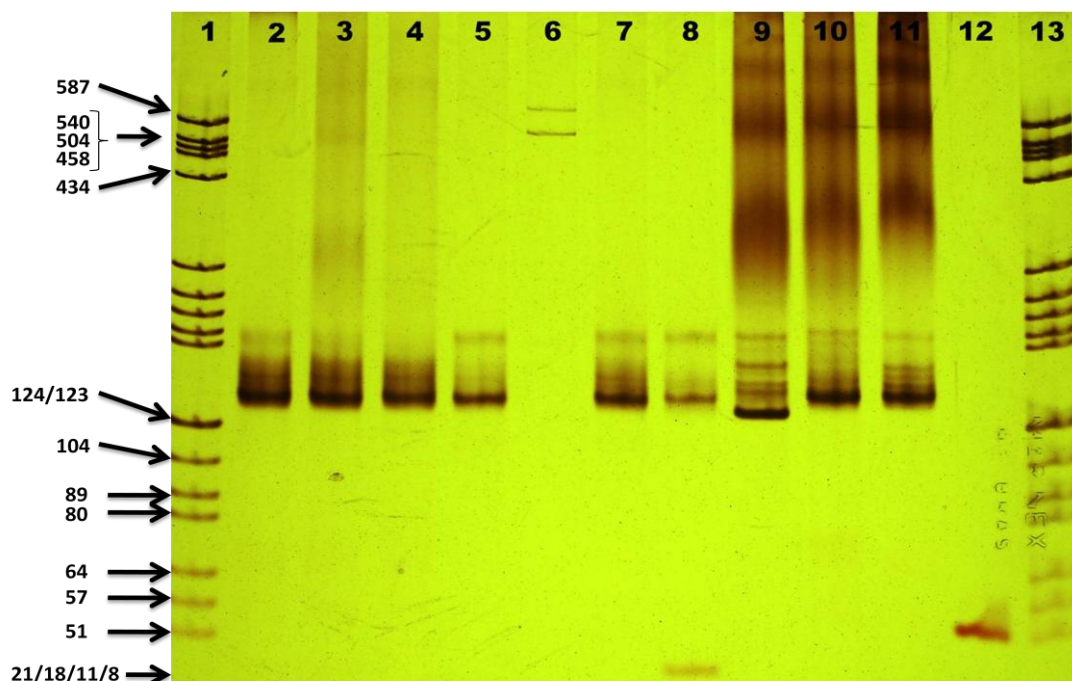


Figura 14. Produtos amplificados de kDNA 120pb em amostras de sangue canino (2), culturas de *Rhipicephalus sanguineus* machos (3) e fêmeas (4), intestino de *R. sanguineus* machos (5) e glândulas salivares (6), intestino de fêmeas (7) e glândulas salivares (8), culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (9), *L. braziliensis* (10), *L. chagasi* (11) e controle negativo (12).

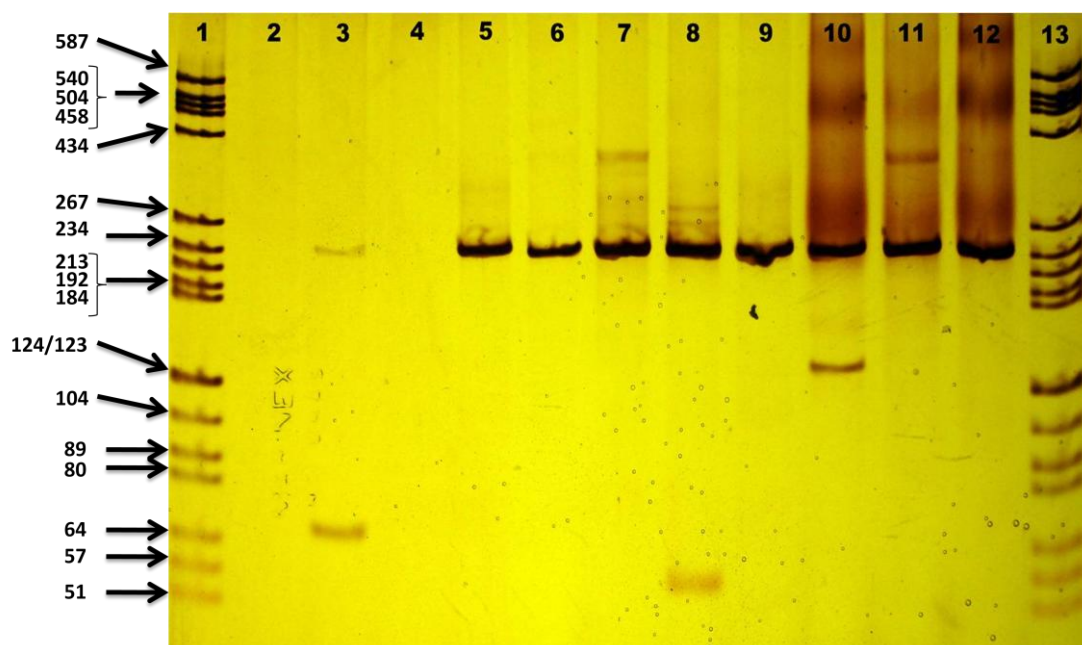


Figura 15. Amplificação de alvos de 234pb de hsp70 de amostras de glândulas salivares de *R. sanguineus* fêmeas (3) e machos (4), intestinos de fêmeas (5) e machos (6), culturas de fêmeas (7) e machos (8), sangue canino (9), culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (10), *L. braziliensis* (11), *L. chagasi* (12) e controle negativo (2).

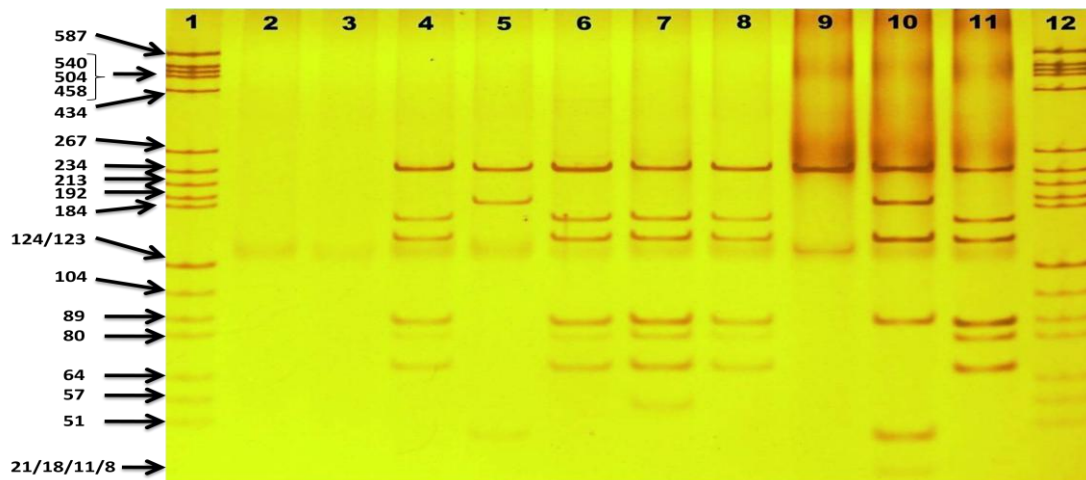


Figura 16. Produtos amplificados de hsp70 234 pb e digeridos pela enzima Hae III em amostras de glândulas salivares de *R. sanguineus* fêmeas (2) e machos (3), intestinos de fêmeas (4) e machos (5), culturas de fêmeas (6) e machos (7), sangue canino (8), culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (9), *L. braziliensis* (10), *L. chagasi* (11).

Tendo em vista o achado de um tripanossomatídeo (Figura 4 A e B) morfologicamente diferente das formas de desenvolvimento de *Leishmania* sp, e o fato do DNA extraído da cultura do conteúdo dos carrapatos retirados do cão 2 não ter sido amplificado com alvos de 120 pb de kDNA de *Leishmania* sp, todas as amostras referentes aos quatro cães foram analisadas pela PCR com amplificação de 330 pares bases da região conservada e variável do kDNA de *Trypanosoma cruzi* (Figura 17).

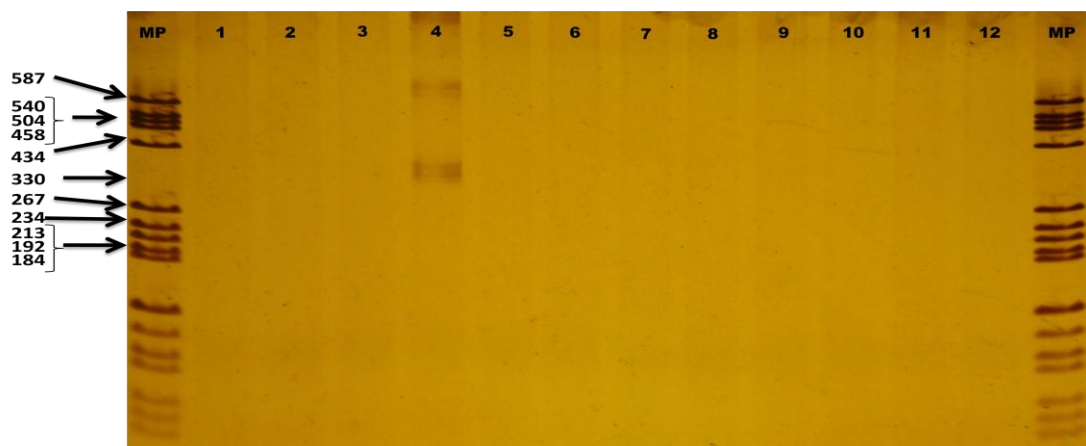


Figura 17. Produtos amplificados de kDNA 330pb em amostras de sangue de cães e culturas obtidas do conteúdo dos carrapatos. Culturas de isolados de referência de *L. amazonensis* (1), *L. braziliensis* (2), *L. chagasi* (3), *T. cruzi* (4); sangue do cão IV (5), sangue do cão III (6), sangue do cão II (7), sangue do cão I (8); culturas do conteúdo de *Rhipicephalus sanguineus* obtidos do cão IV (9), cão III (10), cão II (11) e cão I (12); MP: marcador de peso molecular.

5.8 Resultados do sequenciamento

Os produtos das PCRs das amostras de sangue dos cães e culturas do conteúdo interno dos carrapatos foram sequenciados para identificação definitiva dos protozoários. O tamanho das sequências variou de 87 a 128 pb (Apêndice 3).

A sequência do produto de PCR amplificado a partir do DNA extraído do sangue do cão 1 apresentou 94% de identidade com uma sequência de *L. braziliensis guyanensis* (X54472.1). A sequência do produto proveniente da cultura do conteúdo dos carrapatos coletados deste cão foi identificado como *Leishmania infantum*.

As sequências dos produtos amplificados de sangue dos cães 2, 3 e 4 apresentaram 90 a 97% de identidade com sequências de *Leishmania infantum* (EU437406.1 e EU370885.1), assim como nas culturas do conteúdo dos carrapatos coletados nos cães 3 e 4.

5.9 Resultado da análise por isoenzimas

A cepa isolada (ARHI/BR/2011/NMT-DF-2595) do conteúdo dos carrapatos coletados no cão 3 foi analisada com as isoenzimas G6PDH, 6PGDH e IDH-NADP (Cupolillo et al., 1994), apresentando compatibilidade com *Leishmania infantum* (Anexo 5).

6. DISCUSSÃO

Estudos sobre LV humana realizados no Brasil, avaliando a presença do cão como fator de risco individual para os moradores do mesmo domicílio, apontaram que existe maior probabilidade de apresentar doença ou infecção humana nos domicílios com presença de cães, e que quanto maior o número de cães na residência maior é o risco de ocorrência da doença em humanos (Borges et al., 2008; Gouvea et al., 2007).

Apesar da ausência de sintomas, os cães apresentam parasitismo tanto na pele aparentemente sadia, quanto nas vísceras (Marzochi et al., 1985), motivo pelo qual as medidas de controle não devem ser dirigidas apenas aos cães sintomáticos, já que cães de aparência saudável podem ser mantidos nos domicílios por mais tempo e durante a evolução natural da LV alguns cães podem melhorar clinicamente de forma espontânea (Travi et al., 2001). Até o presente momento, no Brasil, todos os surtos de LV descritos na literatura estão associados com a presença de cães soropositivos. Em várias regiões geográficas a epidemia canina precedeu a epidemia humana (Camargo-Neves et al., 2001; Oliveira et al., 2001).

No presente estudo a maior parte dos cães não apresentou qualquer tipo de sintoma característico de LV, mantendo-se de acordo com a literatura, onde alta proporção de cães soropositivos provenientes de áreas endêmicas do Brasil e da Europa, não apresenta sinais clínicos de leishmaniose (Abranches et al., 1991; Brandonisio et al., 1992; Dantas-Torres et al., 2006b; Mancianti et al., 1996; Rondon et al., 2008).

Na amostra estudada foi possível observar soroprevalência de 66% de anticorpos anti-*Leishmania* entre os cães analisados. Adicionalmente, os resultados do presente estudo confirmaram a presença de cães infectados em áreas como Lago Sul, Fercal, Sobradinho II, Varjão e Itapoã, regiões mais afetadas pela LV no Distrito Federal.

No Brasil, especificamente no estado de Pernambuco, a soroprevalência pode ser de até 51% em focos hiperendêmicos (Dantas-Torres et al., 2006b), e em áreas altamente endêmicas do Mato Grosso do Sul, a soroprevalência chega a 75% (Cortada et al., 2004).

A comparação entre resultados de soroprevalência de LVC nas diversas regiões estudadas deve ser realizada com cautela já que existe diversidade de técnicas sorológicas utilizadas e também heterogeneidade na composição da amostra de cães avaliada. No presente estudo a amostra de conveniência utilizada impede a sua comparação formal e rigorosa com os resultados de amostras de outros estudos que utilizaram abordagens de amostragem aleatórias.

A amostra de conveniência estudada, cães encaminhados ao centro de zoonoses para realização de eutanásia, poderia hiperdimensionar o fenômeno da possível infecção dos carrapatos, que seria muito menor na população canina em geral. Apesar disso, os resultados obtidos dos quarenta e oito cães analisados foram satisfatórios, demonstrando, por exemplo, que a prevalência de infecção canina foi semelhante à encontrada em amostras de conveniência estudadas em outras cidades brasileiras.

Além dos métodos sorológicos convencionais de ELISA e RIFI, também foi aplicado o teste rápido (DPP) que utiliza o antígeno recombinante rk28 que combina fragmentos de vários antígenos (k26, k39 e k9), tendo em vista os resultados obtidos por Schubach (2011). Este autor avaliou o desempenho do DPP para o diagnóstico da LVC em cães domiciliados em área endêmica de LV, sugerindo uma concordância quase perfeita observada em amostras de soro obtidas por meio da leitura visual e por meio de dispositivo eletrônico, indicando que a última metodologia pode ser dispensada em condições de campo. No presente estudo, 56,2% dos cães apresentaram-se positivos quando avaliados pelo DPP,

soroprevalência menor do que a detectada pela sorologia convencional. Como a maioria dos cães era assintomática, estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Grimaldi e colaboradores (2012), que mostraram que a sensibilidade do teste é menor em cães assintomáticos. Por outro lado, a especificidade do teste DPP, considerando que se trata de um método com tecnologia recombinante, aponta para a presença real de infecção por *L. infantum* nos cães estudados já que reações cruzadas com os agentes da leishmaniose tegumentar, notadamente, *L. braziliensis*, constituem fenômeno raro, pelo menos nas populações humanas com leishmaniose tegumentar nas quais foi estudada a especificidade da sorologia baseada em rK39.

A proporção de cães detectados como infectados por meio da técnica de PCR aplicada sangue periférico foi 54,2%, abaixo dos valores encontrados na análise sorológica, o que poderia ser explicado pela dinâmica da circulação do DNA parasitário no sangue em diversos estádios da infecção/doença nos animais. Deve-se considerar também que a PCR não tem sido validada definitivamente para a detecção da infecção por *Leishmania* considerando as dificuldades inerentes à ausência de padrão-ouro para os procedimentos de validação. Os maiores valores da análise sorológica em comparação com a PCR também poderiam ser explicados pela possibilidade de detecção de falsos positivos, considerando que outros tripanossomatídeos podem infectar cães, como *Trypanosoma caninum* (Madeira et al., 2009), *T. cruzi* e *T. rangeli* (Pineda et al., 2011).

Em síntese, a amostra canina estudada foi suficientemente caracterizada para poder afirmar que mais da metade dos indivíduos estudados apresentava elevada probabilidade de infecção por *L. infantum*, constituindo, assim, cenário adequado para explorar as características do ectoparasitismo por *R. sanguineus* em relação à possibilidade de detectar a presença do parasito no intestino e glândulas salivares e avançar na

caracterização dos parasitos detectados pelos métodos parasitológicos convencionais e moleculares.

As atividades de vigilância epidemiológica da LV realizadas no Distrito Federal confirmaram a infecção por *Leishmania infantum* na população canina em diversas regiões e a presença concomitante ou não de *Lutzomyia longipalpis* (CRMV-DF, 2006). Posteriormente, inquéritos entomológicos tem demonstrado que a cada ano aumentam as áreas com presença do vetor da LV (Carranza-Tamayo, 2010; Carvalho et al. 2010), o que torna o DF uma região com risco crescente de aparecimento de casos de LV humana e canina.

Por outro lado, o monitoramento de flebotomíneos em áreas de ocorrência de LTA no DF entre maio de 2006 e abril de 2008 permitiu conhecer os aspectos bio-ecológicos e comportamentais dos vetores das leishmanioses e identificar as áreas de risco, oferecendo subsídios para atuar no controle. Os resultados demonstram que no DF *Lutzomyia whitmani* predominou nas capturas, o que mostra a importância desta espécie como possível transmissor da *Leishmania braziliensis* no DF. Outra espécie coletada foi o *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LV, que vem aumentando sua distribuição geográfica e a frequência na qual é observada a cada ano. A dispersão do *Lutzomyia longipalpis* no DF tem ocorrido simultaneamente à transmissão da LV canina e humana. Sobradinho foi a região de maior ocorrência do vetor com 9,4% de espécimes coletados e também a de maior incidência de LV humana. A predominância de *Lutzomyia longipalpis* em ambientes domiciliares (96,3%) e em abrigos de animais e intradomicílio (2,2%) indica o poder de adaptação da espécie ao ambiente antrópico (Carvalho et al., 2010).

Os dados do monitoramento entomológico relatados por Carranza-Tamayo e colaboradores (2010) revelaram que a colonização por *L. longipalpis* acomete a faixa central de Brasília, deslocando-se desde o norte

(Sobradinho) até o Sul (São Sebastião), destacando-se o fato de que não haviam sido detectados cães infectados fora de Sobradinho e Lago Norte (Carranza-Tamayo, 2010).

Apesar dos dados acima, continua chamando a atenção a magnitude do esforço de captura de flebotomíneos em áreas onde a prevalência de infecção canina pode ultrapassar 15% para detectar efetivamente a presença de *Lutzomyia longipalpis*. Portanto, o cenário caracterizado pelos dados da vigilância entomológica também foi suficiente para abordar o possível papel de *R. sanguineus* como vetor de LVC por meio de técnicas parasitológicas e sorológicas convencionais e técnicas moleculares para identificação das espécies de *Leishmania* observadas nos carrapatos e nos cães dos quais foram obtidos os ectoparasitos. Vale ressaltar que a alta prevalência de cães infectados em áreas onde a infecção de *Lutzomyia longipalpis* pelo parasito *L. infantum* tem sido raramente detectada é semelhante ao padrão observado em outras regiões do Brasil (Lainson, 1983; Coutinho & Linardi, 2007).

A presença de tripanossomatídeos compatíveis com *Leishmania infantum* em *R. sanguineus* possui especial relevância para entender melhor o comportamento da LVC em ambientes com baixa densidade ou ausência de flebotomíneos. Apesar de extremamente trabalhosa e delicada, a dissecação dos carrapatos é um processo que possibilita a avaliação do conteúdo interno (glândulas salivares e intestino) destes ectoparasitos, permitindo avaliações moleculares específicas. Alguns trabalhos que adotaram esta metodologia, detectando DNA de *L. infantum* em glândulas salivares de carrapatos coletados a partir de cães naturalmente infectados (Dantas-Torres et al., 2010a,b; Dantas-Torres et al., 2011b), ou apenas a utilização dos macerados dos carrapatos para realização da PCR (Coutinho et al., 2005;), também tiveram sucesso na detecção de DNA de *L. infantum*,

o que não foi suficiente para comprovar a viabilidade do parasito no interior dos carrapatos.

Na literatura revisada há relatos de isolamento de *Leishmania* apenas em carrapatos que se alimentaram experimentalmente em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (McKenzie, 1980; Dantas-Torres, 2011a) e, até o momento, a maioria das evidências se limitam apenas à detecção de DNA parasitário nos espécimes estudados.

Pesquisa realizada em área endêmica de LVC no Estado de São Paulo investigou a viabilidade de *L. infantum* em carrapatos coletados de cães naturalmente infectados, por meio da expressão de um gene. O estudo sugere que a detecção de RNA de *L. (L.) infantum* indica que os parasitos permanecem vivos dentro dos carrapatos, sugerindo que durante a alimentação, os carrapatos poderiam liberar parasitos vivos, uma vez que excretam grande quantidade de líquido neste processo (Colombo et al., 2011).

Estudo recente que utilizou a técnica de PCR em tempo real demonstrou a presença de kDNA de *L. infantum* em larvas de *R. sanguineus* quase quatro meses após a infecção experimental de fêmeas (Dantas-Torres et al., 2010a). Os achados sugerem que a possibilidade de passagem transovariana (Dantas-Torres et al., 2010a,b; Dantas-Torres et al., 2011b) de *L. infantum* em *R. sanguineus* anteriormente abordada em outros estudos, deve ser reavaliada (Dantas-Torres, 2011a). Esse contexto é relevante tendo em vista o sucesso no isolamento dos parasitos obtidos no presente estudo.

Apesar de não haver provas definitivas de que *R. sanguineus* transmite *L. infantum*, os dados disponíveis sugerem que esta suposição merece maior atenção. Estudos detectaram forte associação entre a prevalência de infestação por *R. sanguineus* e a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em cães de algumas áreas (Paz et al., 2010b).

O meio de cultura adotado para o isolamento de *Leishmania* foi o mesmo utilizado pelo laboratório de leishmanioses do NMT/UnB para crescimento de cepas de isolados de referência em trabalhos de rotina e de pesquisa, já comprovado por outros estudos possuir baixa taxa de contaminação de 2,9% (Romero et al., 1999) em comparação com 28,6% de outros trabalhos (Marzochi et al., 1993). Neste trabalho, a quantidade de culturas que sofreram contaminação por fungos foi relativamente pequena 11,4%, visto que o material inoculado nos meios de cultura era proveniente de carrapatos, organismos já contaminados e que não passaram por qualquer tipo de assepsia. A sensibilidade demonstrada poderia ser explicada por modificações realizadas neste meio, que não foi enriquecido como recomendado por Shaw e Lainson (1981), e principalmente pelo baixo volume de fase líquida. Outros trabalhos mostraram que a contaminação com fungos foi um problema importante que afetou 27,5% das culturas que utilizam o meio de cultura enriquecido (Cuba et al., 1984).

Muitos trabalhos têm sido realizados utilizando cada vez mais a PCR da região conservada do kDNA como ferramenta no diagnóstico para as leishmanioses, principalmente por se tratar de uma técnica extremamente sensível, considerando a abundância do alvo a ser amplificado, e capaz de detectar com precisão casos inconclusivos (Ampuero et al., 2009). A PCR revelou-se uma técnica valiosa em estudos de reservatórios envolvidos na manutenção do ciclo de *Leishmania*, principalmente em material obtido em campo. Alguns estudos confirmam esta afirmativa, pois trabalhando com material coletado da fauna de mamíferos nos cafezais da Colômbia, detectaram a infecção por *L. braziliensis* (Alexander et al., 1998), além da detecção da infecção por *Leishmania* em biópsias de baço do roedor *Arvicanthus niloticus*, no Sudão Ocidental (Meredith et al., 1993).

A sensibilidade da PCR depende principalmente do alvo utilizado para a amplificação. Um estudo que avaliou três ensaios (PCR-RFLP 7SL, PCR-

RFLP ITS1 e PCR-kDNA), ambos comparados utilizando amostras de DNA extraídas a partir da mesma série de amostras provenientes de aspirado de tecidos, demonstrou que a PCR do kDNA foi o ensaio mais sensível (91,7%), seguido pela PCR 7SL (90,5%) e a PCR ITS1 (63,5%) (Azmi et al., 2011).

Estas características da PCR podem explicar a positividade encontrada na amplificação de kDNA a partir do DNA extraído da amostra de sangue dos quatro cães e o fato de duas destas amostras terem sido negativas na tentativa de amplificação do alvo de 234pb de hsp70 que seria menos sensível. Isto confirma que a PCR kDNA é a técnica molecular gênero-específica mais sensível e que os resultados negativos nessa PCR seriam úteis na confirmação de indivíduos verdadeiramente negativos (Azmi et al., 2011).

Além da PCR convencional, capaz de detectar DNA de *Leishmania*, este trabalho utilizou a técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) com dois tipos de enzimas de restrição, a HaeIII e a BstUI, que são capazes de cortar o DNA, em fragmentos gerados de acordo com seu tamanho, possibilitando a visualização de seus perfis em eletroforese após coloração pela prata.

A RFLP do kDNA foi muito utilizada na década de 80 para análise de tripanossomatídeos (Morel & Simpson, 1980; Morel et al., 1980; Deane et al., 1984; Lopes et al., 1984; Pacheco et al., 1989), e conseqüentemente, nas duas últimas décadas, foi possível realizar associação da PCR com a RFLP. Os minicírculos do kDNA têm se mostrado excelentes alvos de detecção para uma PCR que tem como objetivo o diagnóstico de *Leishmania*, isso por apresentarem um elevado número de cópias (~10.000) por parasito (Degraeve et al., 1994; Shapiro & Englund, 1995). A maior sensibilidade da PCR do kDNA é esperada devido à presença de cerca de 10^4 minicírculos por parasita (Rodgers et al., 1990) e o curto comprimento do produto de amplificação (Bensoussan et al., 2006).

O DNA extraído das cepas de isolados de referência quando digerido pela endonuclease HaeIII apresentou resultado concordante com os encontrados por Volpini e colaboradores (2003), que mostram a diferenciação das espécies de *L. (V.) braziliensis*, com digestão de 120pb em 80+40pb, e *L. (L.) amazonensis*, que não foi digerida pela enzima. A cepa de referência *L. (L.) chagasi* também apresentou perfil semelhante ao observado por Volpini (2003) quando digerido pela mesma endonuclease, com digestão de 120 pb em 80+60+40pb.

O DNA dos três isolados de referência também foi testado com a endonuclease BstUI, e apenas a *L. (V.) braziliensis* apresentou digestão dos 120pb em 70+50, concordantes com os dados do GenBank citados por Volpini (2003) e parcialmente diferente dos resultados observados neste estudo, que digeriu 120pb em 110+95+70+50+25pb. As cepas dos isolados de referência de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* mantiveram perfil esperado sem digestão dos 120pb.

O DNA do parasito isolado dos carrapatos e da amostra sanguínea coletados no cão 1 quando digerido pela enzima HaeIII apresentou perfil semelhante ao de *L. (V.) braziliensis*. Quando o DNA destas amostras foi digerido com a endonuclease BstUI, apresentou o mesmo perfil. O DNA do isolado dos carrapatos obtidos do cão 2 não apresentou nenhuma banda quando analisada no gel, o que pode ser explicado pela escassez ou degradação do DNA desta amostra, visto que outras reações já haviam sido realizadas, e que demonstraram compatibilidade com *Leishmania* spp. Por esse motivo, apenas a amostra de sangue deste cão foi analisada e também apresentou resultados semelhantes aos do cão 1.

O DNA dos isolados obtidos dos carrapatos coletados nos cães 3 e 4 quando digerido pela endonuclease HaeIII apresentou perfil semelhante

ao de *L. (L.) chagasi*, o mesmo perfil se repetiu nas amostras sanguíneas destes cães. Quando as mesmas amostras foram submetidas à digestão com a endonuclease BstUI, os fragmentos de 120pb não foram digeridos, mantendo-se de acordo com os trabalhos citados anteriormente.

O DNA amplificado pela PCR das amostras sanguíneas dos cães e das culturas dos parasitos isolados dos carrapatos foram submetidas ao sequenciamento o que permitiu a identificação definitiva dos tripanossomatídeos detectados. Este método foi adotado tendo em vista que não se pode descartar a hipótese de ocorrência de tripanossomatídeos monoxênicos nos carrapatos, e que os resultados de PCR positivos não são suficientes para indicar infecção por *Leishmania* (Rocha et al., 2010).

Atualmente, a análise de isoenzimas (MLEE) é a técnica de referência para a identificação de espécies de *Leishmania* (Schonian et al., 2010). Desta forma, o isolado obtido dos carrapatos do cão 3 foi submetido a esta análise apresentando perfil compatível com *Leishmania infantum*.

No presente estudo foi possível detectar formas flageladas sugestivas de tripanossomatídeos em apenas uma lâmina obtida de um carrapato macho retirado de um cão que apresentou todos os testes reagentes e/ou positivos. O fato de não encontrar parasitos nas outras lâminas pode ser explicado pela forma da dissecação dos carrapatos, visto que as glândulas salivares e o intestino foram retirados primeiro para análise pela PCR e cultura, restando pouco material para a confecção das lâminas. Uma maneira mais eficiente de encontrar tripanossomatídeos na pesquisa direta seria utilizar as glândulas salivares e intestino (possível localização de tripanossomatídeos) primeiro, antes de reservar este material para PCR e cultura. No entanto, esta abordagem aumentaria o risco de contaminação da cultura.

Os resultados da caracterização morfométrica refutam a hipótese do tripanossomatídeo detectado no carrapato retirado do cão 2 ser *T. cruzi*, *T. rangeli* ou *T. caninum*. Formas esferomastigotas têm sido detectadas nos gêneros *Trypanosoma* e *Blastocrithidia*. Tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* têm sido isolados em espécies de carrapatos de diferentes países como *R. (B.) microplus* no Brasil (Martins et al. 2008), *Haemaphysalis hystricis* no Japão (Thekisoie et al. 2007), *Ixodes ricinus* no Reino Unido (Mungonba et al. 1987) e *Hyalomma* spp. no Egito (el Kady 1998). Espécies de *Blastocrithidia* têm sido registradas principalmente em insetos da ordem Hemiptera (p. ex. *B. triatoma*, *B. gerricola* e *B. cyrtomeni*) (Cerisola et al., 1971; Merzlyak et al., 2001; Caicedo et al., 2011) e Diptera (*B. culicis*) (Nascimento et al., 2010). Entretanto, existem evidências de isolamento de *Blastocrithidia* em carrapatos das espécies *Hyalomma anatolicum* (Shastri, 1980) e até mesmo *R. sanguineus* (Machattie & Chadwick 1930; Sherlock, 1964).

A identificação específica do tripanossomatídeo detectado na lâmina do carrapato retirado do cão 2 deverá ser realizada após amplificação do DNA após raspagem da lâmina corada usando os iniciadores D74/D75 para região conservada de Trypanosomatidae (Souto et al., 1999) e posterior sequenciamento do fragmento amplificado. A comparação desta sequência com outras disponíveis no genbank poderá esclarecer se o tripanossomatídeo em questão é uma espécie de *Trypanosoma* ou *Blastocrithidia* conhecida ou uma nova espécie isolada de *R. sanguineus*.

Os resultados do sequenciamento dos produtos de PCR kDNA do DNA extraído das amostras de sangue e culturas dos quatro cães, apresentaram perfil de *L. infantum*, exceto as amostras de sangue e cultura do cão 1, que demonstraram presença de *L. braziliensis guyanensis* e *L. infantum* respectivamente, sugerindo uma co-infecção que também seria compatível com os resultados visualizados na figura 9.

Em 2006, no estado do Rio de Janeiro, foi realizada uma investigação parasitológica em 66 cães sororeativos para *Leishmania* durante atividades de controle de LV. Neste estudo foi possível isolar *Leishmania* de 80,3% dos cães. Destes, 22,6% estavam infectados com *Leishmania braziliensis* (exclusivamente de lesões cutâneas), 73,6% infectados com *Leishmania chagasi* (de diferentes locais), e 3,8% apresentaram co-infecção por *Leishmania braziliensis* (lesões de pele) e *Leishmania chagasi* (Madeira et al., 2006)

No bairro de Campo Grande, também no estado do Rio de Janeiro, um caso de infecção de LV e LT associadas, foi detectada em um menino de 5 anos de idade, com história prévia sugestiva de calazar. Antes de receber tratamento adequado, o menino desenvolveu uma lesão ulcerada na pele, coincidentemente o mesmo aconteceu com sua irmã. A biópsia da lesão da pele e o aspirado da medula óssea mostrou a existência de parasitos identificados como *L. braziliensis* e *L. chagasi* (Oliveira et al., 1986b). Em outro paciente adulto, residente da mesma área, foi possível isolar *L. chagasi* apenas de uma lesão cutânea ulcerada (Oliveira et al., 1986a)

Em termos gerais, o gênero *Leishmania* tem propriedades patogênicas específicas, o que também pode ser identificado dentro do nível de espécie, por exemplo, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Portanto, não se deve desconsiderar a hipótese de que a diversidade genética do parasito dentro do nível de espécie não tem impacto sobre a clínica da diversidade de leishmanioses (Bañuls et al., 2002).

No presente estudo, o cão possivelmente co-infectado pelas duas espécies apresentou lesões cutâneas nas orelhas, sintomatologia inespecífica encontrada em cães isoladamente infectados com qualquer uma das duas espécies, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Estes achados associados

com os estudos citados anteriormente confirmam que a co-infecção com *L. braziliensis* e *L. infantum* pode ocorrer.

A visualização de estádios de desenvolvimento de *Leishmania* spp. nas glândulas salivares e intestino dos carrapatos ajudaria a entender melhor o ciclo do protozoário no interior do ectoparasito. Para isto, outro método cronológico na dissecação de carrapatos deveria ser adotado, utilizando primeiro o conteúdo interno para confecção de lâminas, na tentativa de encontrar mais parasitos, e posterior análise pela PCR e culturas.

Análises morfológicas e ultraestruturais em carrapatos portadores de *Leishmania* spp. tornam-se essenciais para conhecer os detalhes do possível ciclo deste protozoário neste potencial vetor, visto que estes tripanossomatídeos permanecem vivos dentro dos ectoparasitos a ponto de serem isolados em meio de cultura.

A inoculação das cepas de *Leishmania* spp., isoladas de carrapatos, em hamsters ou camundongos deve ser testada a fim de identificar a capacidade de infecção deste protozoário em outros animais. Após um período de pelo menos um mês, o aspirado de lesões seria inoculado em meios de cultura e os animais sacrificados para realização de análise histopatológica nos órgãos internos.

Finalmente, experimentos semelhantes aos realizados por Mackenzie em 1984 deveriam ser repetidos e aprimorados na tentativa de reproduzir resultados concordantes, e principalmente, capazes de provar definitivamente a hipótese da competência e eficiência vetorial de *R. sanguineus* na transmissão da LVC.

7. CONCLUSÕES

1. *Rhipicephalus sanguineus* que se alimentam naturalmente em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* apresentam DNA do parasito no intestino e glândulas salivares.
2. Os resultados confirmam a presença de *Leishmania infantum* viável em *R. sanguineus* obtidos de cães naturalmente infectados pelo parasito.
3. A caracterização de tripanossomatídeos em carrapatos exige a aplicação de uma combinação de técnicas parasitológicas, enzimáticas e moleculares para discriminar adequadamente as espécies dos parasitos detectados.
4. Este estudo comprovou a possibilidade de isolamento de *L. infantum* em carrapatos por meio da inoculação em meio de cultura.

8. AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com recursos provenientes dos seguintes editais:

- Edital CAPES nº 027/2010 Pró-equipamentos institucional – UnB;
- Edital CAPES nº 032/2010 Parasitologia Básica;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis transmission of infection. *J Parasitol*, Lawrence 1981; 77:557-561.
- Adler S, Theodor O. Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. *Ann Rev Entomol* 1957; 2:203-226.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandez MZ, Ramos AMO, Wilson ME. Atypical American visceral leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100:79-82.
- Alexander B, Lozano C, Barker DC, McCann SHE, Adler GH. Detection of *L. (V.) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Trop* 1998; 69:41-50.
- Ampuero A, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GAS. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2009; 104:992-997.
- Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1936; 31:759-844.
- Aragão HB, Fonseca F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1961; 29: 115-130.
- Azmi K, Nasereddina A, Ereqata S, Schnur L, Schonian G, Abdeena Z. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. *Diag Microbiol Infec Disease* 2011; 71:151–155.
- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:480-484.
- Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M. Population genetics, evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(sup.S1):9-13.
- Barral A, Badaró R, Barral-Netto M, Grimaldi Jr G, Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:732-734.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 44:536-46.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223p.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 2006; 44:1435–1439.

Blanc G, Caminopteros J. La transmission du Kala-Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *C R Acad Sci* 1930; 191:1162-1164.

Borges BK, Silva JA, Haddad JP, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LM, Fiuza VO. Assessment of knowledge and preventive attitudes concerning visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saud Pub* 2008; 24:777-784.

Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A, and Puccini V. Canine leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy) *European Journal Epidemiology*, Roma 1992; 8:273-276.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 816 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 816 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 78 p.

Bray RS & Alexander J. *Leishmania* and Macrophage. In: W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Biology and Epidemiology, Acad Press 1987; 1: 212-233.

Burattini MN, Coutinho FAB, Lopez LF, Massad E. Modelling the Dynamics of Leishmaniasis Considering Human, Animal Host and Vector Populations. *J Biological Systems* 1998; 6:337-356.

Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 1998; 76:173-180.

Caicedo AM, Gallego G, Muñoz JE, Suárez H, Torres GA, Carvajal H, Carvajal FC, Posso AM, Maslov D, Montoya-Lerma J. Morphological and molecular description of *Blastocrithidia cyrtomeni* sp. nov. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) associated with *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106:301-307.

Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spinola RM, Cruz OG. Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Aracatuba, Sao Paulo, Brazil, 1998-1999. *Cad Saud Pub* 2001; 17:1263-1267.

Cardoso VV. Manifestações clínicas, laboratoriais e a função dos fagócitos em crianças com leishmaniose visceral tratadas com glucantime. Brasília. [Dissertação]. Brasília – Universidade de Brasília; 2007.

Carranza-Tamayo CO. Caracterização e acompanhamento geo-referenciado do primeiro foco de transmissão de leishmaniose visceral humana em Brasília, Distrito Federal. Brasília. [Tese]. Brasília – Universidade de Brasília; 2010.

Carranza-Tamayo CO, Carvalho MSL, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD, Cortez SMFC, Romero GAS. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:396-399.

Carvalho MSL, Bredt A, Meneghin ERS, Oliveira C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiol Serv Saúde*, Brasília 2010; 19:227-237.

Cerisola JA, Rohwedder R, Bozzini JP, Del Prado CE. *Blastocrithidia triatomae* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *J Protozool* 1971; 18:503-506.

Ciaramella P, Oliva G, Luna R, Ambrosio R, Cortese R, Persechino A, Gradoni L, Scalone A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 1997; 141:539-543.

Colombo FA, Odorizzi RMFN, Laurenti MD, Galati EAB, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res* 2011; 109:267-274.

Cooley RA. The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* (Ixodidea) of the New World. *National Institute of Health Bulletin*, Washington 1946; 187:1-54.

Cortada VM, Doval ME, Souza LMA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, Cupolillo E, Souza CS, Cardoso FO, Zaverucha do Valle T, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Vet Res Commun* 2004; 28:365-374.

Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34:223-228.

Courtenay O, Quinell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Diseases*, 2002; 186:1314-1320.

Coutinho MTZ. Investigação da Capacidade Vetorial de Sifonápteros e Ixodídeos na Leishmaniose Visceral Canina. Minas Gerais. [Tese] Minas Gerais – Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128:149-155.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol* 2007; 147:320-325.

CRMV – DF. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Distrito Federal, 2006. Circular nº 014/2006.

Cuba CC, Llanos-Cuentas EA, Barreto AC, Magalhães AV, Lago EL, Reed SG, Marsden PD. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 1984; 17:161-167.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:296-311.

da Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiúza VOP, Rabello A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolubilidade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:249-254.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. Primeira Descrição de parasitismo Humano por *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38:411-412.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop São Paulo 2006a; 48 : 151-156.

Dantas-Torres F; Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from na urban área of Brazil. Vet Parasitol, Amsterdam 2006b; 140:54-60.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2006c; 39:64-67.

Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Vet Parasitol 2008a; 152:173-185.

Dantas-Torres, F. Epidemiologia e controle da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco, Brasil: Situação atual e perspectivas. Salud Ciencia (En línea) 2008b; 16:156-159.

Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, Paiva-Cavalcanti MP, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandão-Filho SP, Alves LC, Otranto D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitol Res 2010a; 106:857-860.

Dantas-Torres F, Martins TF, Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandão-Filho SP. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. Exp Parasitol 2010b; 184-185.

Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. Trends Parasitol 2011a; 27:155-159.

Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. Parasites & Vectors 2011b; 4:56.

Dantas-Torres F, Venzal JM, Bernardi LFO, Ferreira RL, Onofrio VC, Marcili A, Bermúdez SE, Ribeiro AF, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Description of a New Species of Bat-Associated Argasid Tick (Acari: Argasidae) from Brazil. J Parasitol 2012; 98:36-45.

de Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, et al. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. Kinetoplastid Biol Dis 2007; 21:5.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica da calazar, no Ceará. O Hospital 1955; 48: 61-76.

Deane MP, Sousa MA, Pereira NM, Gonçalves AM, Momen H, Morel CM. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. J Protozool 1984; 31:276-280

Decker-Jackson FE, Tang DB. Identification of *Leishmania* spp. By radiorespirometry. II. A statistical method of data analysis to evaluate the reproductibility and sensitivity of the technique. In ML Chance, BC Walton (eds), *Biochemical Characterization of Leishmania*, proceedings of a workshop held at the PanAmerican Health Organization, Geneva 1982; 205-245.

Degrave W, Fernandes O, Thiemann O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, Pereira JB, Bozza M, Lopes U, Morel C. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89:367-368.

Dye C. The logic of Visceral Leishmaniasis control. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55:125-130.

Edwards KT, Goddard J, Varela-Stokes AS. Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblioma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a "How-to" Pictorial Dissection Guide. Midsouth Entomologist, 2009; 2:28-39.

el Kady GA. Protozoal parasites in tick species infesting camels in Sinai Peninsula. J Egypt Soc Parasitol, 1998; 28:765-76.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba São Paulo (Brasil). Clin Vet 2000; 5:36-44.

Fernandes FF. Atividade in vitro de permetrina, cipermetrina e daltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Arq Bras Med Vet Zootec 2000; 52:621-626.

Ferreira CGT, Rego IGR, Ahid SMM. Parasitemia in Humano POR *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) in Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte, Brasil. Pubvet 2008; 1:3-9.

Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Posrtús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet Parasitol 2001; 99:105-111.

Friedhoff KT. Interaction between parasites and tick vetor. Int J Parasitol 1990; 20:525-535.

- Genaro O. Leishmaniose Visceral Experimental. Belo Horizonte – MG. Minas Gerais [Tese]. Minas Gerais – Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.
- Goddard J. Ticks of medical importance occurring in the western hemisphere. USAF School of Aerospace Medicine, Texas 1987. 69p.
- Goddard J. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1989; 26:628-629.
- Gouvea MV, Werneck GL, Costa CH, Carvalho FAA. Factors associated to Montenegro skin test positivity in Teresina, Brazil. Acta Trop 2007; 104:99-107.
- Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, Falqueto A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2012; 106:54-9.
- Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabo MP, Martins JR, González-Acuña D, Estrada-Peña A. Ticks (Ixodidae) on humans in South América. Exp Appl Acarol 2006; 40:83-100.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Pena A, Horak IG, Shao RF, Barker SC. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. Zootaxa 2010; 2528:1-28.
- Guimarães JH, Tucci CE, Barros-Battesti DM. Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 218p.
- Hernández D, Rodriguez N, Martinez C, García L, Convit J. *Leishmania braziliensis* causing visceral leishmaniasis in a patient with immunodeficiency virus infection, identified with aid of polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993;87:627-628.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet Parasitol 2003; 113:99-113.
- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez MT, Piarroux R, Gállego M, Alunda JM, Portús M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2002; 9:1137-1141
- Jackson PR, Stiteler JM, Wohlhieter JA, Reed SG, Badaró R, Inverso JA, Jackson JE. Characterization of *Leishmania* responsible for visceral disease in Brazil by restriction endonuclease digestion and hybridization of kinetoplast DNA. In Proc 11th Internat Congr Trop Med Malar Calgary, Canada 1984; 68.

Jittapalapong S, Stich RW, Gordon JC, Wittum TE, Barriga OO. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *J Med Entomol* 2000; 37:601-611.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 1990; 65:37-42.

Koch HG. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Ann Entomol Society of America*, Lanham 1982; 75(5):583-586

Koshy TJ, Rajavelu G, Lalitha CM. On the life cycle of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Cheiron* 1983; 12:337-338.

Koutinas AF et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35: 376-383.

Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F. Analysis of ribosomal DNA internal ranscribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection* 2005; 7:1224-1234.

Labruna MB, Pereira MC. Carrapato em cães no Brasil. *Clin Vet* 2001; 30 : 24-32.

Labruna MB. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13 (Supl 1):123-124.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al. Carrapatos (Acari: Ixodidae) do estado de Rondônia, Amazônia Ocidental, Brasil. *Syst Appl Acarol* 2005; 10:17-32.

Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:569-596.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*, Academy Press 1987; (1):1-120.

Lainson R, Rangel EF. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In EF Rangel, R Lainson (eds), *Flebotomíneos do Brasil*, Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; 311-336.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In L Collier, A Balows, M Sussman (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*, Arnold, London 2005; (5):313-349.

Leônidas LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and sorology in Greece. *Vet Parasitol* 2002; 109:19-27.

Linardi PM, Nagem RL. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Rev Bras Biol* 1973; 33:529-538.

Lopes UG, Momen H, Grimaldi Jr G, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 1984; 70:89-98.

Louly CCB, Fonseca IN, Oliveira VF, Borges LM F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no Município de Goiânia, GO. *Ciência Animal Brasileira* 2006; 7:103-106.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KWQ, Jirku M, Chocholová E, Haralambous C, Pralong F, Oborkik M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 9375–9380.

Machattie C, Chadwick CR. Notes on a trypanosome infection of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* in Iraq. *Trans R Soc Trop Med Hyg, London* 1930; 23 : 417-420.

Madeira MF, Schubach AO, TMP Schubach, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo CX, Confort EM, Marzochi MCA. *Post mortem* avaliação de cães soros reagentes para *Leishmania* do Rio de Janeiro, Brasil. *Parasitol Vet* 2006; 138:366-370.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, de Paula CC, Faissal BNS, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MCA. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 2009; 136:411-23.

Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of Visceral Leishmaniasis – some recent concepts. *Indian J Med Res* 2006; 123: 267-274.

Manciant F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol, Amsterdam* 1996; 65:1-9.

Martins JR, Leite RC, Doyle RL. Tripanosomatídeos like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17:113-4.

Marzochi MCA, Sabroza PC, Toledo LM, Marzochi KBF, Tramontano NC, Filho FBR. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. *Cad Saúde Pública*, 1985; 1:5-17.

Marzochi MCA, Teixeira PC, Marzochi KBF, Conceição NF, Coutinho W, Brito DB. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport, preliminary report. Rev Inst Med Trop 1993; 35:301-303.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology 1999;119:237-46.

Mckenzie KK. A study of the transmission of canine leishmaniasis by the tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille), and an ultrastructural comparison of the promastigotas. Oklahoma [Tese] Oklahoma – Oklahoma State University; 1984.

Meredith SEO, Zijlstra EE, Schoone GJ, Kroon CCM, Van Eys GJJM, Schaeffer KU, El-Hassan AM, Lawyer PG. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. Archiv L'Institut Pasteur de Tunis 1993; 70:419-443.

Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev AS, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. Eukaryot Microbiol 2001; 48:161-169.

Michalick MSM. Gênero *Leishmania*. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia humana. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 31-35.

Momen H, Grimaldi GJr, Deane LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL)? Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82:447-448.

Morel C, Simpson L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonucleases fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. Am J Trop Med Hyg 1980; 29(Suppl5):1070-1074.

Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonucleases products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci 1980; 77:6810-6814.

Mozos E, Pérez J, Day MJ, Lucena R, Ginel PJ. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. J Comp Path 1999; 120:257-268.

Mumcuoglu KY, Frish K, Sarov B, Manor E, Gross E, Gat Z, Galun R. Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group rickettsiae. J Med Entomol 1993; 30:114-121.

Mungomba LM, Molyneux DH, Wallbanks KR. A record of trypanosomes from *Ixodes ricinus* in Britain. *Med Vet Entomol* 1987; 1:435-7.

Nascimento MT, Garcia MC, da Silva KP, Pinto-da-Silva LH, Atella GC, Motta MC, Saraiva EM. Interaction of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* with the *Aedes aegypti* salivary gland. *Acta Trop* 2010; 113:269-78.

Nicolle C, Comte C. Origine du Kalazar. *Acad Sci* 1908; 146:789.

Oliveira-Neto MP, Grimaldi Jr G, Momen H, Pacheco RS, Marzochi MCA, MacMahon-Pratt D. Active cutaneous leishmaniasis in Brazil induced by *Leishmania donovani chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986a; 81:303-309.

Oliveira-Neto MP, Marzochi MCA, Grimaldi Jr G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen, a infecção por H. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1986b; 80:587-592.

Oliveira CD, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 2001; 17:1231-1239.

Pacheco RS, Grimaldi Jr G, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitol* 1989; 100:393-398.

Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier P-E, Sotto A, Labauge P, Raoult D. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e338.

Paz GF, Labruna MB, Leite RC. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008a; 17:139-144.

Paz GF, Leite RC, Oliveira PR. Controle de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE) no Canil da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008b; 17:41-44.

Paz GF, Ribeiro MFB, Michalsky EM, Lima ACVMR, França-Silva C, Barata RA, Fortes-Dias CL, Dias ES. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parsitol Res* 2010a; 106:523-528.

Paz GF, Ribeiro MFB, de Magalhães DF, Sathler KP, Morais H, Fiúza VO, Brandão ST, Werneck GL, Fortes-Dias CL, Dias ES. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: a case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Prev Vet Med* 2010b; 97:131-133.

Pegram RG, Clifford CM, Walker JB, Keirans JE. Classification of the *Rhipicephalus sanguineus* group I *Rhipicephalus sulcatus* and *Rhipicephalus turanicus*. *Syst Parasitol* 1987; 10:3-26.

Petrova-Piontkovskaya SP. Comparative data on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* Latr. and *Rhipicephalus turanicus* Pom. under laboratory conditions. *Zoologicheskii Zhurnal, Moscow* 1947; 25:173-176.

Pineda V, Saldaña A, Monfante I, Santamaría A, Gottdenker NL, Yabsley MJ, Rapoport G, Calzada JE. Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet Parasitol* 2011; 78:360-363.

Porto C. Autoctonia da leishmaniose tegumentar americana: estudo humano e no cão na cidade de São Sebastião. Brasília. [Dissertação]. Brasília – Universidade de Brasília; 2004.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitol* 1997; 115:143-156.

Ramos RAN, Galindo MKF; Santana MA, Faustino MAG, Alves LC. Parasitism by *Amblyomma* sp (Acari: Ixodidae) in humans in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:594-595.

Reis AB. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. Belo Horizonte. [Tese]. Minas Gerais – Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Rey L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p. 633-641.

Rocha LS, Santos CB, Falqueto A, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. *Parasitol Res* 2010; 107:465-468.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71:267–275.

Romero GA, Boelaert M. Controle da leishmaniose visceral na América Latina – uma revisão sistemática. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e584.

Romero, GAS; Sampaio, RNR; Macedo, VO; Marsden, PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1999; 94(4):505-508.

Rondon FCM, Bevilaqua CML, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC, Diniz AT. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. Vet Parasitol, Amsterdam 2008; 155:24-31.

Santoro F, Lemesre JL, Rizvi FS, Afchain D, Sadogirsky M. Spécificité au niveau de protéines de surface des promastigotes de *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903), *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 et *Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937. In JA Rioux (2-6 July, 1984). *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications eco-Épidémiologiques*. Montpellier, France: Colloque Internat, IMMEE 1986; 71-76.

Sartor AA. Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório. Rio de Janeiro. [Tese]. Rio de Janeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1994.

Schonian G, Maurício I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? Trends Parasitol 2010; 26:466-469.

Schubach EYP. Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro. Brasília. [Dissertação]. Brasília – Universidade de Brasília; 2011.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of Kinoplast DNA. Ann Ver Microbiol 1995; 49:117-143.

Shastri UV. Parasites and parasitoids of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Indian Journal of Parasitology 1980; 3:35.

Shaw JJ, Lainson R. The in vitro cultivation of members of *Leishmania braziliensis* complex. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; 75:127.

Sherlock IA. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1964; 16:19-26.

Silva AR, Viana GMC, Varonil C, Pires B, Nascimento MDSD, Costa JML. Leishmaniose visceral (calazar) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30:359-368.

Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. Revista Tropic Ciências Agrárias e Biológicas 2007; 1:22.

Solano-Gallego L, Fernández-Belloon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum* - infected Dogs. J Comparative Pathology 2004; 130(1)7-12.

Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999; 91:306-314.

Sweatman GK. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks. *J Parasitol*, Lawrence 1967; 53:432-445.

Thekisoe OM, Honda T, Fujita H, Battsetseg B, Hatta T, Fujisaki K, Sugimoto C, Inoue N. A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. *Parasitol* 2007; 134:967-974.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:119-124.

Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31(Suppl 2):85-92

Volpini AC. PCR-RFLP mDNA no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose cutânea no Brasil. Belo Horizonte [Tese]. Belo Horizonte – Instituto Oswaldo Cruz; 2003.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 2003; 90:31-37.

Wenyon CM. The transmission of *Leishmania* infections: a review. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1932; 25:319-351.

Werneck GL. Fórum: expansão geográfica e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. Introdução. *Cad Saud Pub* 2008; 24: 2937-2940.

WHO. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2010; 793.

Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2006; 2(17):1-7.

ANEXO 1

CHAVES PARA FAMÍLIAS E PARA GÊNEROS E ESPÉCIES DO BRASIL

A apresentação de uma chave diferenciadora dos 52 gêneros e subgêneros de *Ixodides*, 30 dos primeiros e 22 dos últimos, viria complicar demasiado e desnecessariamente a distinção genérica dos representantes americanos que apenas alcançam cerca de um terço desse total. Aquêlê grande número de subdivisões não é, além disso, aceito ou adotado pela maioria dos sistematas que, ou considera injustificada sua proposta, ou acha que o critério adotado para ereção dessas novas entidades se afasta demais do habitualmente utilizado, como é o caso para vários gêneros de SCHULZE baseados na morfologia do órgão de Haller. Em conseqüência, julgou o autor junior mais acertado adotar o critério aqui seguido, embora o assunto não tivesse chegado a ser discutido com ARAÇÃO, mesmo porque é êste um procedimento mais coerente com a atitude do autor senior, o qual jamais fêz uso de tais entidades sistêmáticas nos seus numerosos trabalhos sôbre Ixódidas.

Ordem Acari

Sub-ordem Ixodides

CHAVE DAS FAMÍLIAS PARA GÊNEROS AMERICANOS

1. — Sem epístoma e sem grande cavidade bucal. Fêmea sem placa esternal. Hipostômio saliente e denticulado 2
— Com epístoma e grande cavidade bucal. Com placa esternal. Hipostômio saliente e inerme. Monotípica e de macho desconhecido. Parasita de morcegos centro e sul-americanos *Spelaeorhynchidae*
2. — Sem escudo dorsal — *Argasidae* 4
— Com escudo dorsal 3
3. — Escudo dorsal rudimentar, tegumento rugoso lembrando o de Argasídeos; monotípica e de macho desconhecido; com uma única espécie africana, *Nutalliella namaqua* *Nutalliellidae*
— Escudo dorsal bem diferenciado; desdobrada em muitos gêneros e com distribuição geográfica mundial — *Ixodidae* 7
4. — Bordos laterais do corpo com tegumento diferenciado *Argas Canestrini*, 1890
— Bordos laterais do corpo sem tegumento diferenciado 5
5. — Adultos com hipostômio vestigial; ninfas com tegumento espinhoso *Otobius* Banks, 1912
— Adultos com hipostômio normal; ninfas com tegumento não espinhoso 6
6. — Hipostômio escavado, convexo na face ventral e côncavo na face dorsal *Antricola* Cooley et Kohls, 1942
— Hipostômio de conformação variada, mas nunca escavado *Ornithodoros* Karsch, 1847
7. — Sulco anal passando por diante do ânus 8
— Sulco anal situado atrás do ânus 9
8. — Palpos do macho e da fêmea canaliculados; 3.º artículo dos palpos da fêmea mais longo do que largo e bem separado do 2.º artículo *Ixodes* Latreille, 1795
— Palpos do macho cônicos; 3.º artículo dos palpos da fêmea muito alargado e praticamente fundido com o 2.º *Ceratixodes* Neumann, 1902

9. — Rostro curto 10
 — Rostro longo 15
10. — Sem olhos *Haemaphysalis* Koch, 1844
 — Com olhos 11
11. — Base do capitulo retangular em ambos os sexos; machos sem placas ventrais e com coxa IV maior 12
 — Base do capitulo hexagonal em ambos os sexos; machos com placas ventrais e com coxa IV não maior do que as outras 13
12. — Escudo dorsal ornamentado em ambos os sexos; machos com 11 festões *Dermacentor* Koch, 1844
 — Escudo dorsal sem ornamentação; machos com 7 festões *Anocentor* Schulze, 1937
13. — Machos com uma placa pré-anal bem visível *Margaropus* Karsch, 1879
 — Machos sem placa pré-anal 14
14. — Em ambos os sexos o sulco anal é nítido, o espiráculo apresenta um prolongamento ou colo e a coxa I tem dois espinhos longos; machos de tamanho moderado, com festões e 2 ou 4 placas adanais *Rhipicephalus* Koch, 1844
 — Sulco anal ausente nas fêmeas e inconspícuo nos machos; espiráculos redondos e coxa I com dois espinhos curtos em ambos os sexos; machos muito pequenos sem festões e com 4 placas adanais *Boophilus* Curtice, 1891
15. — Com olhos *Amblyomma* Koch, 1844
 — Sem olhos *Aponomma* Neumann, 1899

CHAVES PARA DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DOS DIFERENTES GÊNEROS DE IXODÍDEOS EXISTENTES NO BRASIL

Gênero *Argas*

(Macho e fêmea)

1. — Corpo oblongo com as faces dorsal e ventral bem separadas; retículo quadrangular na margem. Peritrema grande, oval, com cerca de 27 a 28 μ de comprimento por 21 a 23 μ de largura *A. miniatus*
 (Nota: No *Argas persicus*, inexistente no Brasil, o peritrema é circular com o diâmetro de 15 a 17 μ).

Gênero *Ornithodoros*

(Macho e fêmea)

1. — Bochechas ausentes 2
 — Bochechas presentes 4
2. — Tarsos e pretarsos com pontas bem desenvolvidas nos 1.º, 2.º e 3.º pares, ausentes no 4.º par 3
 — Tarsos e pretarsos com rugosidades e pequenas saliências nos 1.º, 2.º e 3.º pares e uma pequena ponta apical no 4.º par *O. brasiliensis*
3. — Tibia com prolongamento d'gitiforme dorsal na metade proximal *O. nattereri*
 — Tibia sem prolongamento digitiforme dorsal *O. rostratus*
4. — Corpo muito anguloso na frente *O. júl*
 — Corpo pouco anguloso na frente 5
5. — Bochechas muito desenvolvidas chegando, às vezes, a cobrir as partes bucais. Coxas I e II separadas *O. talage*
 — Bochechas pouco desenvolvidas, tôdas as coxas contíguas *O. dunni*

Gênero *Otobius*

(Macho, fêmea e ninfa)

1. — Corpo mais largo na frente e com ligeira constrição ao nível do 4.º par de patas. Hipostômio pouco desenvolvido no adulto. Corpo das ninfas dilatado na frente, com tegumento muito espinhoso *O. megnini*

Gênero *Ixodes*

(Machos)

1. — Espinho externo da coxa I muito longo, cobrindo todo o articulo seguinte *I. luciae*
— Espinho externo da coxa I curto não cobrindo todo o articulo seguinte 2
2. — Gnatossoma com ângulos laterais dorsais da base muito arredondados *I. coraeifurcatus*
— Gnatossoma anguloso na face dorsal 3
3. — Espinhos da coxa I desiguais sendo o interno muito longo e ultrapassando a metade da coxa II. Hipostômio curto e largo, com 2 dentes posteriores extremamente fortes *I. aragaoi*
— Espinhos da coxa I subiguais não atingindo o meio da coxa II. Hipostômio fino e longo, sem dentes posteriores mais fortes 4
4. — Peritrema em oval irregular, menor e com o máximo de 5 fileiras de pontuações entre a mácula e o bordo na parte mais larga *I. loricatus*
— Peritrema elítico, maior e com o mínimo de 8 fileiras de pontuações entre a mácula e o bordo na parte mais larga *I. didelphidis*

Gênero *Ixodes*

(Fêmeas)

1. — *Cornua* e aurícula presentes 2
— *Cornua* e aurícula ausentes 3
2. — 1.º articulo dos palpos com prolongamento ventral acentuado dirigido para frente *I. auritulus*
— 1.º articulo dos palpos sem prolongamento ventral dirigido para frente *I. fuscipes*
3. — Coxa I com 2 espinhos desiguais sendo um deles longo e agudo, podendo cobrir o articulo seguinte 4
— Coxa I com 2 espinhos curtos pouco aguçados, podendo um deles atingir pequena parte do articulo seguinte 5
4. — O espinho mais longo da coxa I é o interno. Escudo regularmente pontuado *I. aragaoi*
— O espinho mais longo da coxa I é o externo. Escudo com pontuações maiores na porção mediana *I. luciae*
5. — Escudo com bordo anterior reto ou quase reto 6
— Escudo com bordo anterior chanfrado 7
6. — Escudo com o bordo anterior reto e com algumas pontuações em fila longitudinal no ângulo posterior *I. schulzei*
— Escudo com bordo anterior reto e sem fileira longitudinal e pontuações no ângulo posterior *I. amarali*
7. — Peritremas arredondados com 5 fileiras de fossetas bem isoladas na parte mais larga a contar da área estigmal *I. loricatus*
— Peritrema elipsóide com 9 fileiras de fossetas aproximadas umas das outras na parte mais larga a contar da área estigmal *I. didelphidis*

Gênero *Haemaphysalis*

(Macho e fêmea)

1. — Hipostômio com 3 fileiras de dentes de cada lado *H. leporispalustris*
— Hipostômio com 4 fileiras de dentes de cada lado 2
2. — 3.º articulo dos palpos com uma ponta retrógrada curta .. *H. cinnaberina*
— 3.º articulo dos palpos com uma ponta retrógrada longa
..... *H. kohlsi* (= *H. kochi pro parte*)*

Gênero *Rhipicephalus*

1. — Escudo sem manchas e com 3 fileiras de dentes de cada lado. Peritremas em vírgula. Macho com 2 placas adanais de cada lado, a interna larga e bem conformada e a acessória pouco acentuada, terminada em pequena ponta *R. sanguineus*

Gênero *Boophilus*

(Macho e fêmea)

1. — Escudo sem manchas e sem pontuações. Hipostômio mais longo que os palpos, com 4 a 5 fileiras de dentes de cada lado. Peritremas circulares. Macho com 2 placas adanais longas, bem distintas, de cada lado do corpo terminando posteriormente em ponta curta e aguda *B. micropluss*

Gênero *Anocentor*

1. — Escudo sem ornamentação e com 7 festões. Peritremas salientes, ovais, com poucas fossetas bastante grandes. Coxas de tamanho crescente do 1.º ao 4.º pares de patas *A. nitens*

Gênero *Amblyomma*

(Machos)

1. — Sulco marginal distinto, limitando posteriormente todos os festões
..... 2
— Sulco marginal incompleto ou ausente 13
2. — Coxa I com 2 espinhos agudos e longos, sobretudo o externo que é encurvado na extremidade, ambos cobrindo o articulo seguinte, especialmente o externo. Escudo castanho com faixas estreitas esverdeadas ou cõr de cobre. Espécie pequena e escura *A. ovale* (= *A. fossum*)
— Coxa I com 2 espinhos dos quais um em geral cobre o articulo seguinte ou se ambos o cobrem, não alcançam a metade desse articulo 3
3. — Coxa IV com um espinho mais longo ou quase tão longo quanto o articulo 4
— Coxa IV com um espinho mais curto que o articulo 7

* Segundo COOLEY, *H. kohlsi* Aragão et Fonseca, 1951 deve ser substituído por *H. juxtakochi* Cooley, 1946 que não difere da espécie descrita por ARAGÃO em 1908, ao contrário do que supunha COOLEY.

4. — Coxa I com 2 espinhos muito desproporcionados, sendo o externo longo e o interno quase obsoleto. Escudo castanho com faixas amarelas. Espécies pequenas 5
 — Coxa I com 2 espinhos desiguais, mas não de tamanho muito desproporcionado. Escudo castanho com faixas esbranquiçadas ou côr de cobre que dão à região anterior o aspecto de um pseudo-escudo fêmea. Espécie de tamanho variando de pequeno a médio *A. cajennense* *
5. — Pretarsos 2, 3 e 4 com 2 espinhos paralelos *A. maculatum*
 — Pretarsos 2, 3 e 4 com um só espinho 6
6. — Festões com tubérculos quitinosos (*peltae*) *A. triste*
 — Festões sem tubérculos quitinosos (*peltae*) *A. tigrinum*
7. — 1.º articulo dos palpos sem saliência ventral. Escudo, alargado para trás, de côr castanha com faixas esverdeadas. Espécie grande *A. geayi*
 — 1.º articulo dos palpos com saliência ventral 8
8. — Escudo sem manchas, de colorido castanho. Espécie muito pequena
 *A. parvum*
 — Escudo com manchas 9
9. — Espinhos da coxa I iguais 10
 — Espinhos da coxa I desiguais ou subiguais, curtos e separados 11
10. — Coxa I com 2 espinhos iguais e um tanto fortes. Escudo castanho escuro com manchas, dando à região anterior o aspecto de um pseudo-escudo fêmea. Espécie de tamanho médio *A. coelebs*
 — Coxa I com 2 espinhos iguais, mas fracos e pouco longos. Escudo castanho claro com manchas esbranquiçadas nas porções laterais. Espécie pequena *A. oblongoguttatum*
11. — Escudo castanho claro com manchas esbranquiçadas. Peritremas ovais muito largos. Espécie de tamanho médio *A. cooperi* **
 — Escudo castanho escuro. Peritremas em vírgula 12
12. — Escudo castanho avermelhado com algumas manchas amareladas nos lados. Pontuações numerosas por toda a superfície do escudo. Espécie muito pequena *A. auricularium*
 — Escudo castanho escuro com várias manchas amareladas próximas da margem. Pontuações pouco numerosas sobretudo na porção mediana do escudo. Espécie pequena *A. pseudoconcolor*
13. — Sulco marginal incompleto 14
 — Sulco marginal ausente 18
14. — Base do gnatossoma largamente hexagonal. Escudo castanho escuro com faixas esverdeadas ou amareladas. Espécie grande, estreita e escura *A. longirostre*
 — Base do gnatossoma quadrangular 15
15. — Coxa I com 2 espinhos longos quase iguais, cobrindo o articulo seguinte, sobretudo o externo. Escudo de fundo castanho claro, predominando o colorido amarelado. Espécie pequena, oval estreitada e clara
 *A. aureolatum* (= *A. striatum*)
 — Coxa I com 2 espinhos muito mais curtos e desiguais, cobrindo só pequena parte do articulo seguinte 16
16. — Só a coxa I com 2 espinhos, tendo as restantes um só espinho. Escudo castanho escuro com manchas. Festões prolongados por lâminas quitinosas (*peltae*) largas não incisadas. Espécie robusta e de tamanho médio *A. scalpturatum*
 — Tôdas as coxas com 2 espinhos 17

* No México e no sul dos Estados Unidos da América do Norte também o *A. imitator* Kohls, 1958.

** Segundo SANTOS DIAS, em 1958, o *Amblyomma lutzi* Aragão, 1908 precede de mais de um mês a descrição do *A. cooperi* por NUTTALL & WARBURTON, devendo, pois, prevalecer o nome proposto por ARAGÃO.

17. — Hipostômio com fórmula 4/4. Peritrema de grande desenvolvimento. Festões não prolongados por lâminas quitinosas salientes. Espécie pequena *A. tasquei* *
- Coxa I com 2 espinhos, os 2.^o e 3.^o pares com 2 pequenos tubérculos, o interno mais conspicuo e o do 4.^o par com espinho externo longo e um interno reduzido a um pequeno tubérculo. Hipostômio com fórmula 3/3. Peritrema de tamanho normal. Escudo castanho claro com manchas amareladas. Festões prolongados por lâminas quitinosas (*peltae*) salientes não incisadas. Espécie pequena *A. brasiliense*
18. — Coxa IV com um só espinho 19
- Coxa IV com 2 espinhos 30
19. — Coxa I com um só espinho *A. albopictum*
- Coxa I com 2 espinhos 20
20. — Hipostômio com 3 fileiras de dentes de cada lado 21
- Hipostômio com 4 fileiras de dentes de cada lado 28
21. — Coxa II com 2 espinhos. Espécie pequena *A. scutatium*
- Coxa II com um só espinho 22
22. — Coxa IV com um espinho mais curto que o articulo 23
- Coxa IV com um espinho tão longo quanto o articulo. Espécie de tamanho médio *A. calcaratum*
23. — Festões com prolongamentos quitinosos incisados. Espécie de tamanho médio *A. incisum*
- Festões sem prolongamentos quitinosos incisados 24
24. — Espécies de grandes dimensões, com idiossoma de mais de 0,5 cm 25
- Espécies de pequenas dimensões, com idiossoma de menos de 0,5 cm .. 26
25. — Escudo dorsal de cor castanha quase preta com desenhos esverdeados. Espécie grande e muito alargada *A. varium*
- Escudo dorsal de colorido pardo amarelado desenhando-se na região anterior um pseudo-escudo fêmea. Espécie grande e alongada *A. pictum*
26. — Palpos muito nodosos. Escudo de colorido castanho com manchas douradas que na porção ântero-lateral apresentam o aspecto de um "Y". Espécie de tamanho médio *A. nodosum*
- Palpos não nodosos 27
27. — Escudo plano, castanho, com colorido amarelado ou acobreado, com numerosas pontuações largas e superficiais. Face ventral com tubérculos mamiliformes correspondendo ao bordo interno dos festões, exceto o primeiro e o mediano, visíveis mesmo ao exame pela face dorsal, tal como nas fêmeas. Espécie pequena *A. mantiquirense*
- Escudo abaulado, castanho, com algumas manchas pouco distintas e numerosas pontuações finas regularmente distribuídas. Espécie pequena *A. pacae*
28. — Escudo castanho escuro sem manchas e com pequena elevação arredondada submediana. Espécie pequena *A. goeldii* **
- Escudo castanho sem pequena elevação arredondada submediana ... 29
29. — Escudo plano, castanho acinzentado, claro, com orla amarelada e pontuações pouco abundantes grandes e profundas quase ausentes na porção mediana. Coxa IV com espinho curto. Espécie larga e de tamanho médio *A. fuscum*
- Escudo castanho escuro, com manchas acobreadas e numerosas pontuações grandes e aproximadas. Coxa IV com espinho muito longo. Espécie de tamanho grande *A. multipunctum*

* Segundo FLOCH & FAURAN, em 1958, *A. romitii* Tonelli-Rondelli, 1939 tem prioridade sobre *A. tasquei* Floch et Abonnenc, 1940.

** Segundo SANTOS DIAS (1958) os exemplares existentes no Museu de Paris e considerados tipos do *Amblyomma fuscomaculatum* (Lucas, 1873) são, na opinião de NEUMANN, que assim os rotulou, e na sua própria, idênticos ao *A. goeldii* Neumann, 1899, devendo prevalecer, portanto, a denominação proposta por Lucas.

30. — Escudo castanho com manchas amareladas ou acobreadas predominantes, que na porção anterior tomam o aspecto de um pseudo-escudo fêmea. Pontuações numerosas muito grandes, entremeadas de outras menores, tanto umas como outras irregularmente distribuídas. Espécie de tamanho médio. Espinho interno da coxa IV às vezes ausente *A. dissimile* *
- Espécie de tamanho pouco acima do médio. Escudo castanho quase preto com manchas acobreadas, às vezes pouco visíveis, salvo duas manchas lineares situadas nas zonas escapulares, características da espécie. Pontuações numerosas não muito grandes espalhadas pelo escudo *A. humerale*

Gênero *Amblyomma*

(Fêmea)

1. — Coxa IV com um só espinho 2
 — Coxa IV com 2 espinhos, em geral curtos 29
2. — Hipostômio espatulado. Escudo subtriangular ou cordiforme 3
 — Hipostômio lanceolado. Escudo alongado, quase losângico, de cor castanha com manchas esverdeadas na porção mediana. Espécie de tamanho médio antes de sugar e muito grande quando cheia *A. longirostre*
3. — Hipostômio com 3 fileiras de dentes 4
 — Hipostômio com 4 ou 5 fileiras de dentes 25
4. — Coxa I com 2 espinhos maiores que o comprimento do articulo 5
 — Coxa I com 2 espinhos dos quais um pelo menos mais curto que o comprimento do articulo 6
5. — Coxa I com 2 espinhos muito longos sendo o externo terminado em ponta aguda e ligeiramente encurvada. Pontuações do escudo profundas, um tanto desiguais e desigualmente distribuídas. Manchas esverdeadas ou acobreadas deixando ver áreas escuras um tanto extensas. Espécie de tamanho médio *A. ovale* (= *A. fossum*)
 — Coxa I com 2 espinhos muito longos, subiguais, o externo não encurvado. Pontuações do escudo profundas, iguais e mais regularmente distribuídas por todo ele. Escudo praticamente todo amarelado ou cor de cobre. Espécie de tamanho médio *A. aureolatum* (= *A. striatum*)
6. — Coxa I com 2 espinhos muito desiguais sendo um tão longo que atinge o articulo seguinte e o outro quase obsoleto 7
 — Coxa I com 2 espinhos iguais ou desiguais mas não muito desproporcionados 9
7. — Pretarsos 2, 3 e 4 com 2 espinhos paralelos *A. maculatum*
 — Pretarsos 2, 3 e 4 com um só espinho 8
8. — Festões com tubérculos nos ângulos póstero-internos *A. triste*
 — Festões sem tubérculos nos ângulos póstero-internos *A. tigrinum*
9. — Escudo castanho com ou sem manchas e com pontuações superficiais ou um tanto profundas, iguais ou desiguais, mais ou menos regularmente distribuídas. Sem tubérculos mamiliformes nos festões, com exceção de *cajennense* 10
 — Escudo com bordos castanhos e centro amarelo ou acobreado com pontuações largas e superficiais especialmente numerosas nas porções laterais, pontuações essas entremeadas de outras finas mais abundantes na porção posterior. Festões com tubérculos mamiliformes salientes no ângulo interno *A. mantiquirensis*

* Em 1958 SANTOS DIAS exprime a opinião de que o *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 nada mais é do que *A. bibroni* (Gervais, 1842), nome este que deverá prevalecer.

10. — Escudo com vestígios de depressões laterais, cordiforme e de bordos sinuosos 11
 — Escudo sem vestígios de depressões laterais e quando cordiformes os bordos são sinuosos 12
11. — Escudo castanho avermelhado com raras manchas amareladas situadas lateralmente. Espécie pequena *A. auricularium*
 — Escudo castanho pardo, com várias manchas amareladas sobretudo nas porções laterais. Espécie pequena *A. pseudoconcolor*
12. — Escudo subtriangular 13
 — Escudo cordiforme 19
13. — 1.º articulo dos palpos com saliência ventral 14
 — 1.º articulo dos palpos sem saliência ventral 16
14. — Escudo dorsal geralmente sem manchas ou com manchas muito discretas. Face ventral com pêlos. Espécie muito pequena *A. parvum*
 — Escudo dorsal com manchas conspícuas 15
15. — Mancha esbranquiçada central do escudo interrompida na porção mediana posterior por uma faixa escura longitudinal. Peritremas de forma oval larga. Espécie de tamanho médio *A. cooperi* *
 — Mancha esbranquiçada central do escudo reduzida a pequena área posterior, não interrompida na região mediana. Espécie pequena. *A. oblongoguttatum*
16. — Escudo castanho com manchas pouco aparentes nos lados e na porção anterior. Pontuações finas muito numerosas, regularmente distribuídas. Espécie pequena *A. pacae*
 — Escudo com manchas bem aparentes, brancas ou acobreadas. Pontuações de tamanho médio irregularmente distribuídas 17
17. — Ápice dos festões com pequeno tubérculo no ângulo interno; sem projeção mais escura que o tegumento em situação póstero-lateral no orifício genital 18
 — Ápice dos festões sem tal tubérculo; projeção romba mais escura que o tegumento, de situação póstero-lateral e fazendo saliência para dentro do orifício genital *A. imitator* **
18. — Escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas não interrompidas na porção média posterior. Ápice dos festões com um pequeno tubérculo quitinoso no ângulo interno. Face dorsal pilosa. Espécie muito freqüente e de tamanho médio *A. cajennense*
 — Escudo castanho claro com ângulo posterior largo, e algumas manchas acobreadas pouco densas irregulares no centro e nos lados. Olhos situados no nível do meio do escudo. Espécie muito rara e de tamanho médio *A. parkeri*
19. — Base do gnatossoma quadrangular 20
 — Base do gnatossoma subtriangular ou trapezoidal 23
20. — Escudo amarelo pálido ou com manchas pardas 21
 — Escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas 22
21. — Escudo amarelo sujo. Espécie muito grande *A. pictum*
 — Escudo com manchas pardas. Espécie pequena *A. scutatun*
22. — Fossetas cervicais longas, em "S". Espécie de tamanho médio *A. coelebs*
 — Fossetas cervicais sob a forma de depressões curtas. Espécie de tamanho médio *A. nodosum*
23. — Escudo pardo vermelho ou pardo marron 24
 — Escudo quase preto com manchas esverdeadas. Espécie grande, sendo enormes as fêmeas quando repletas *A. varium*

* Ver nota feita a propósito do macho desta espécie.

** Muito próximo de *cajennense* mas só ocorrendo no sul dos Estados Unidos e México.

24. — *Cornua* saliente. Espécie de tamanho médio. *A. calcaratum*
 — *Cornua* pouco pronunciado. Espécie grande, com idiossoma de mais de 0,5 cm na fêmea jejuna *A. geayi*
25. — Hipostômio com 4 fileiras de dentes 26
 — Hipostômio com 5 fileiras de dentes. Espécie de tamanho acima do médio *A. multipunctum*
26. — Escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas, externas 27
 — Escudo castanho claro sem manchas 28
27. — Escudo com manchas esbranquiçadas ou acobreadas tomando quase toda a superfície. Ápice dos festões com um pequeno tubérculo quitinoso no ângulo interno. Espécie de tamanho médio *A. incisum*
 — Escudo com uma mancha esbranquiçada ou acobreada no ângulo posterior. Ápice dos festões com tubérculos quitinosos largos e pouco salientes no ângulo interno. Espécie robusta, de tamanho médio *A. sculpturatum*
28. — Escudo castanho brilhante com numerosas pontuações pequenas e iguais. Espécie pequena *A. goeldii* *
 — Escudo castanho fosco com cerca de 30 pontuações finas, umas e outras mais numerosas nas porções laterais. Espécie de tamanho médio *A. fuscum*
29. — Base do gnatossoma com ângulos póstero-laterais salientes 30
 — Base do gnatossoma com ângulos póstero-laterais não salientes 31
30. — Escudo subtriangular com ângulos escapulares paralelos aos bordos. Tubérculos quitinosos no ângulo interno do ápice dos festões. Espécie pequena *A. brasiliense*
 — Escudo subtriangular, com duas manchas escapulares e alongadas, paralelas aos bordos. Ápice dos festões sem tubérculos quitinosos no ângulo interno. Espécie de tamanho acima do médio *A. humerale*
31. — Hipostômio com fórmula 4/4 *A. tasquei* **
 — Hipostômio sem fórmula 3/3 32
32. — Escudo com cerca de 12 pontuações muito grandes e profundas na porção antero-lateral, entremeadas de outras menores, que também existem na região média. Espécie de tamanho médio a pequeno. Espinhos das coxas pontudos *A. dissimile* ***
 — Escudo com pontuações médias e pequenas mais numerosas nas porções laterais anteriores. Espécie de tamanho médio. Espinhos das coxas rombos *A. rotundatum*

* Leia-se a nota existente na chave para os machos, a propósito desta espécie.

** Sobre a sinonímia para este nome veja-se o referido em nota na chave para os machos.

*** Sobre a sinonímia para este nome veja-se o referido em nota na chave para os machos.

ANEXO 2

CHAVE PARA OS GÊNEROS DE IXODIDAE QUE OCORREM NA REGIÃO NEOTROPICAL, BASEADA EM GUIMARÃES ET AL. (2001), COM ADAPTAÇÕES

1. Sulco anal posterior ao ânus, podendo ser bem definido ou indistinto.....2
- Sulco anal anterior ao ânus, sempre bem definido.....***Ixodes***
2. Olhos presentes.....3
- Olhos ausentes; palpos curtos e largos, o 2º artículo com angulação externa bem diferenciada.....***Haemaphysalis***
3. Palpos mais largos do que longos ou no máximo com a largura igual ao comprimento.....4
- Palpos mais longos do que largos, com o segundo artículo mais do que duas vezes o comprimento do terceiro; escudo com padrões de cores (maioria das espécies); machos sem placas ventrais.....***Amblyomma***
4. Base dorsal do capítulo hexagonal (e); machos com 2 a 4 placas adanais (f) – carrapatos de tamanho médio ou pequenos, escudo geralmente sem padrões definidos de coloração.....***Rhipicephalus***
- Base dorsal do capítulo retangular; machos sem placas adanais (carrapatos grandes, escudo com ou sem padrões definidos de coloração); machos com coxas de tamanho crescente, no sentido I-IV.....***Dermacentor***

Fonte: Barros-Battesti (2006).

ANEXO 3

PROTOCOLO UTILIZADO PARA DISSECAÇÃO DOS CARRAPATOS (SEM ADAPTAÇÕES)

Midsouth Entomologist

2: 28–39

ISSN: 1936-6019

www.midsouthentomologist.org.msstate.edu

Research Article

Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” Pictorial Dissection Guide

Edwards, K. T.¹ J. Goddard¹, and A. S. Varela-Stokes².

¹Department of Entomology & Plant Pathology, Mississippi State University, Mississippi State, MS,

²Department of Basic Sciences, Mississippi State University, Mississippi State, MS.

Received: 24-XI-2008 Accepted: 21-I-2009

Abstract There is inadequate documentation of how to dissect ticks, a process required for many tick and disease studies. While the literature may contain numerous line drawings and instructions describing the process, none is adequate for the novice tick dissector. We present a “how-to” description and pictorial essay outlining our approach to tick dissection. The ticks used in this study were adult male and female Gulf Coast ticks, *Amblyomma maculatum* Koch, though the methods described herein could be applied to any species. None of the *A. maculatum* specimens we dissected adequately demonstrated ovaries, so we used one female *A. americanum* L. tick that we found to show them more clearly. The tissues targeted in this study included salivary glands, midgut, Malpighian tubules and ovaries. Tracheae are also delineated because they might easily be confused with Malpighian tubules.

Keywords *Amblyomma maculatum*, Gulf Coast tick, dissection, methods

Introduction

There is copious scientific literature on the anatomical structure of ixodid ticks (Acari: Ixodidae), as well as descriptions of the physiology (Obenchain and Galun 1982, Sonenshine 1991, Buczek 1999) of their digestive tracts and diagrams of their internal anatomy (Douglas 1943, Obenchain and Galun 1982). There are also stunning scanning electron microscopy images of tick mouthparts and other structures that are readily available on the Internet (Balashov lu and Raikhel 1973, (Pickering 2008)). However, there is inadequate documentation of how to dissect a tick (Balashov 1968, Obenchain and Galun 1982), a process required for many tick and disease studies (Goddard and Norment 1986, Goddard 2003). The literature contains numerous line drawings (Balashov 1968, Obenchain and Galun 1982) and instructions describing the process, but none is adequate for the novice tick dissector. One possible exception is found on a web page hosted by the Iowa State University Department of Entomology, where a limited midgut dissection sequence is presented for *Ixodes scapularis* Say (VanDyk 2001). However, for the most part, unless one has the guidance of an individual who is both knowledgeable and skilled in tick

dissection, it is extremely difficult to teach oneself the complete tick dissection process from currently available materials.

Since there is little assistance in the literature on how to dissect ticks, and specifically, how to identify structures at each step of the dissection, our tutorial is intended as a stand-alone document to guide an individual who is new to the process through the necessary steps. We offer a "how-to" description and pictorial essay outlining our approach to tick dissection. The ticks used in this study were adult male and female Gulf Coast ticks, *Amblyomma maculatum* Koch, though the methods described herein could be applied to any species. None of the *A. maculatum* specimens we dissected adequately demonstrated ovaries, so we used one female *A. americanum* L. tick that we found to show them more clearly. The tissues we targeted are those we were analyzing for our research and are commonly dissected. Specifically, we included salivary glands, midgut, Malpighian tubules and ovaries in this study (Figure 1). Tracheae are also delineated because they might easily be confused with Malpighian tubules.

Approach

The following is a step-by-step pictorial description of the dissection of the Gulf Coast tick, *A. maculatum*. Note: since field-caught ticks are potentially infected with a variety of disease agents, a few precautions might be necessary. For example, a white board with double-sided sticky tape around the edges may be used to sort ticks, and gloves should be used during dissection since the infectious status of ticks is often unknown. In addition, aerosolization of tick fluids is possible as tick parts are mixed with saline and should be avoided by wearing a mask during the dissection process. All ticks, parts, fluids, and supplies should be disposed of in clearly marked biohazard bags after completion of tick dissections. The dissection process is described in the following steps, shown pictorially following the text:

1. Prepare a small Petri dish ahead of time by pouring melted paraffin into the bottom and allowing it to cool and to solidify.
2. Briefly heat the center of the small paraffin-filled Petri dish. (We found that a simple approach was to use the tip of a glue gun to melt the paraffin, but a heated spoon might also suffice.)
3. Once the paraffin is warm and starts to melt, gently grasp the tick with forceps, pressing its legs and ventrum into the heated paraffin thereby immobilizing it and restraining its legs.
4. Cover the tick with a drop of phosphate buffered saline (PBS). This is an important step because it prevents desiccation of the tissues.
5. Remove the scutum with a microscalpel by first cutting across the dorsal shield at the most anterior point, just distal to the basis capitulum. (A regular scalpel is much too large and we therefore recommend using a microscalpel.)
6. Continue cutting around the edge of the scutum, inserting the microscalpel into the groove just inside the festoons. Lift the dorsal exoskeleton by using forceps held in one hand while carefully dissecting the attached muscles and connective tissue with the microscalpel in the other hand. Cut the dorsum and remove completely.
7. At this point, connective tissue and tracheae are apparent and usually have to be removed in order to observe deeper structures.
8. Observe the anterior salivary glands. These are clear, grape-like structures at the proximal end of the tick. There are also other sets of salivary glands located near the midgut.
9. Observe the gut. The gut is a dark red, spider-shaped structure.
10. Tracheae can be seen originating from spiracular plates and must be differentiated from Malpighian tubules.
11. Observe the Malpighian tubules. These tubules are clear, thin, tube-shaped structures that often contain urea, which appears white within the tubules. Connective tissue or tracheae might also appear white, but these are flat and wispy rather than tube shaped. Further distinction between tracheae and connective tissue is often challenging. Tracheae originate from spiracular plates but connective tissue often lacks obvious organization.
12. Observe the ovaries. These appear as an inverted U-shaped structure distal to the rectal sac.

Please note: All figures refer to *Amblyomma maculatum* Koch ticks unless otherwise stated.

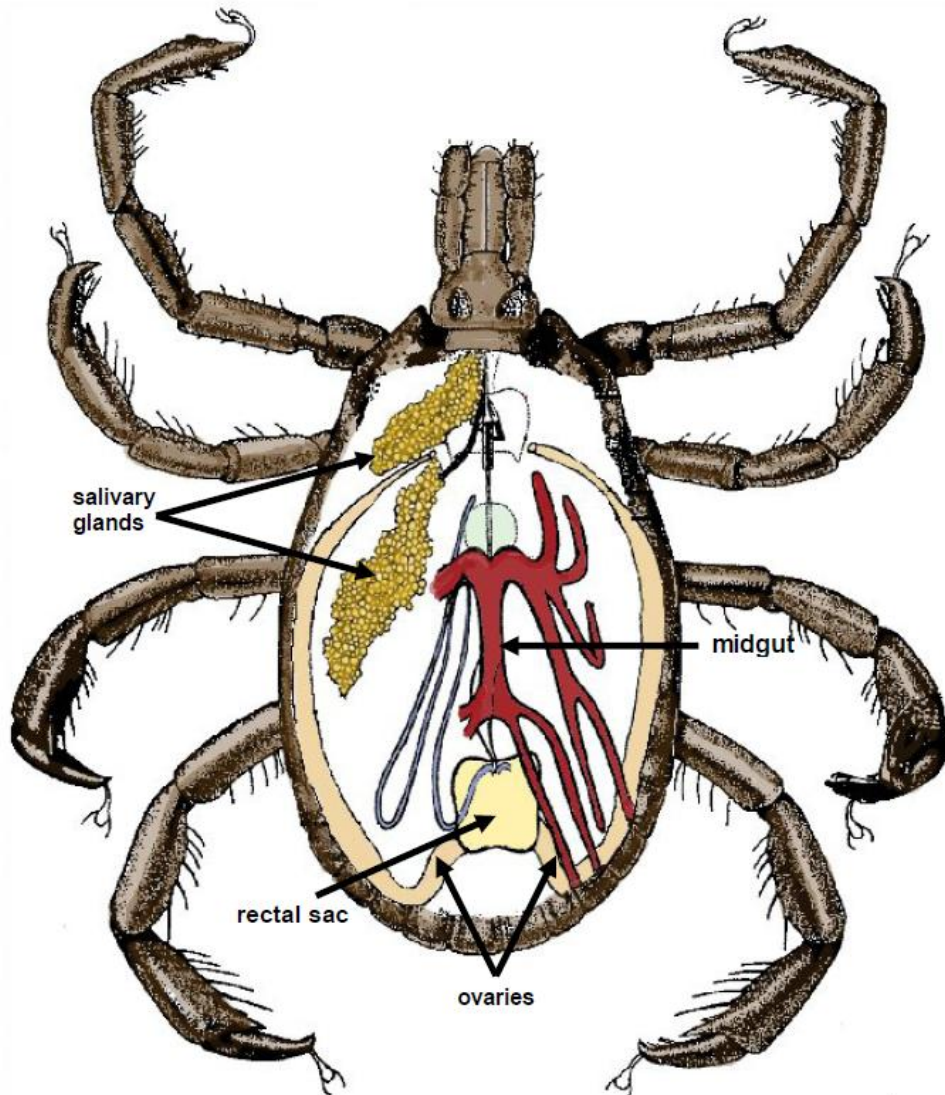
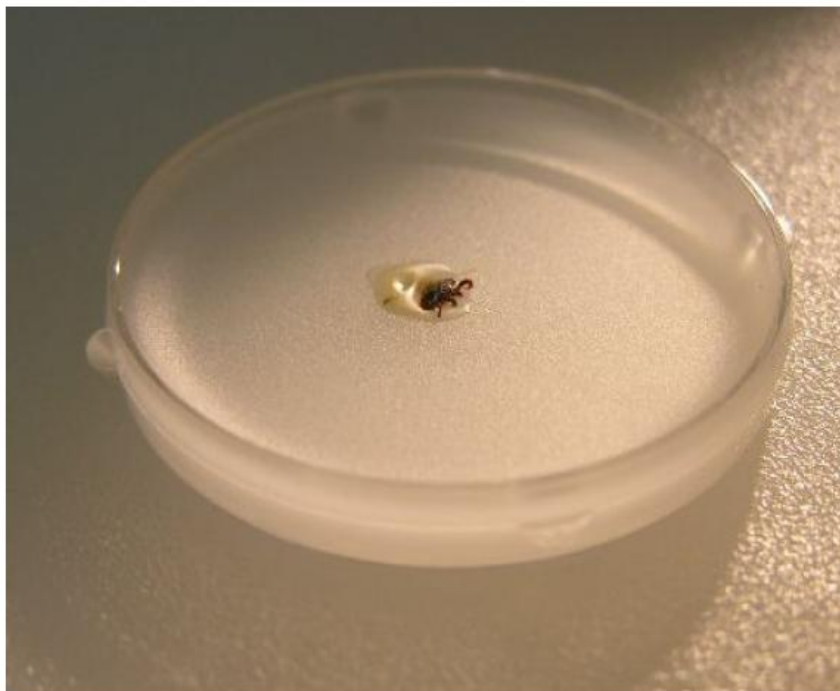


Figure 1. Line drawing of structures that may be observed during dissection (Original art work by Sylvia Burnett, Mississippi Department of Health; modified by senior author).



Steps 1 and 2: Using glue gun to melt paraffin in Petri dish.



Step 3. Tick imbedded in paraffin.



Step 4. Female embedded in paraffin, covered with PBS; dorsal view.



Step 5. Male embedded in paraffin; dorsal view. Preparing to remove scutum (bracket) with microscalpel starting at basis capitulum (arrow).



Step 6. Female; scutum removal.



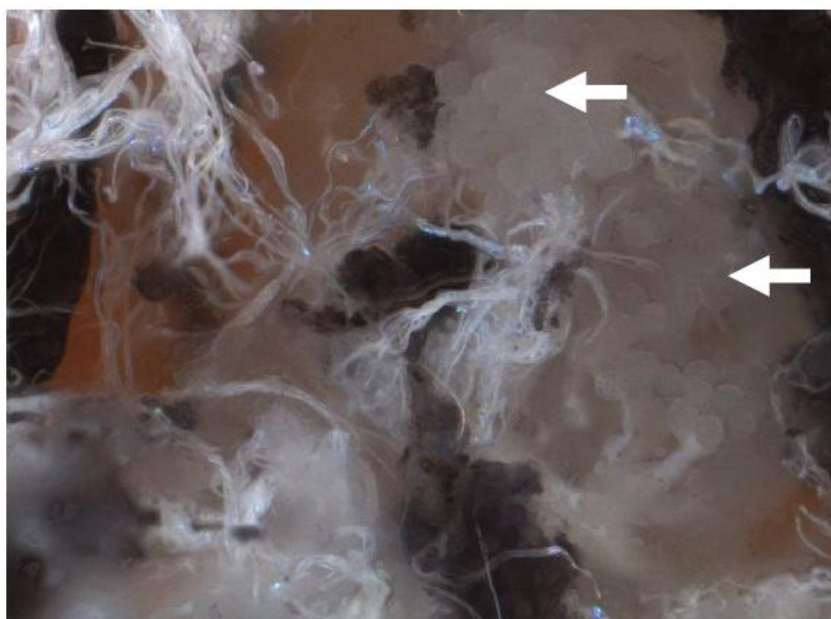
Step 6 (cont.). Female; scutum removed (arrow).



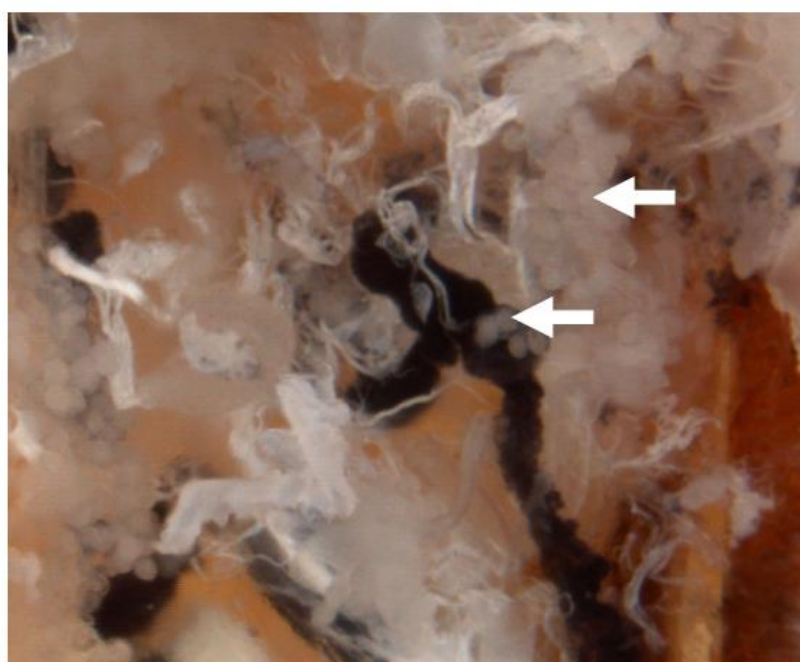
Step 7. Female; scutum removed. Connective tissue and tracheae (Philip and White 1955) are visible in contrast with the surrounding gut (dark).



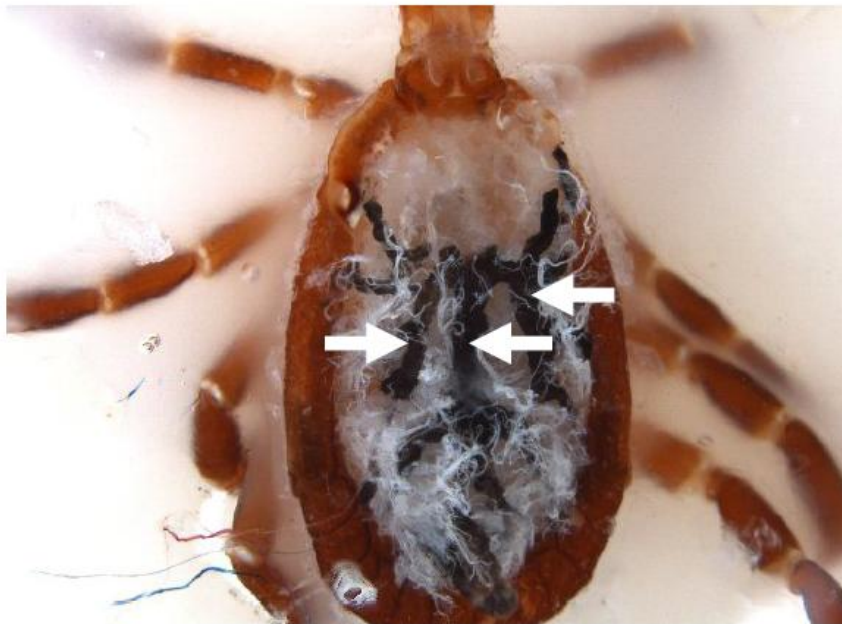
Step 8. Female; scutum removed. The complete gut is now visible, as are the anterior salivary glands (arrow).



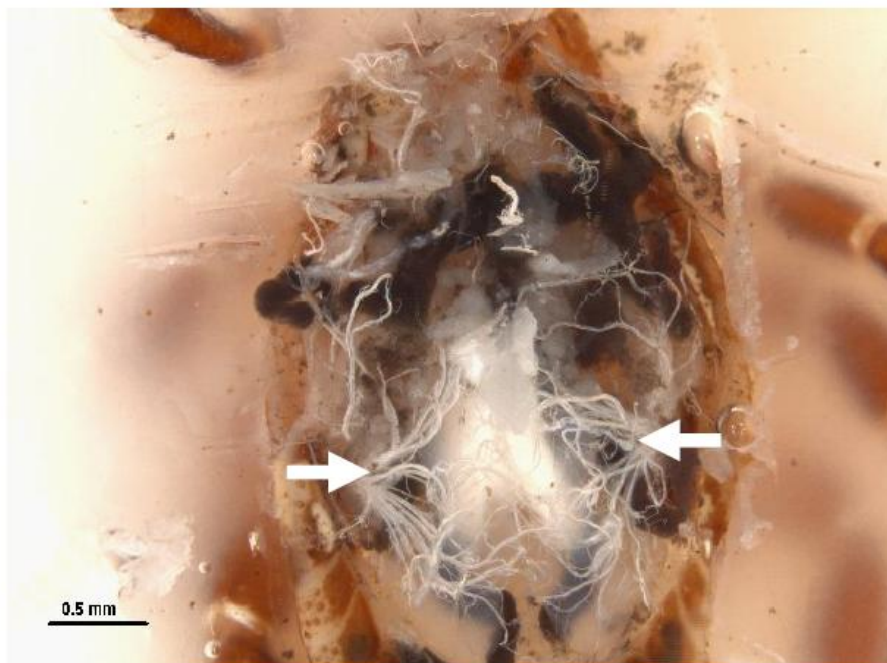
Step 8 (cont.). Salivary glands (arrow); close-up.



Step 8 (cont.). Female; close-up of salivary glands (arrows) near midgut.



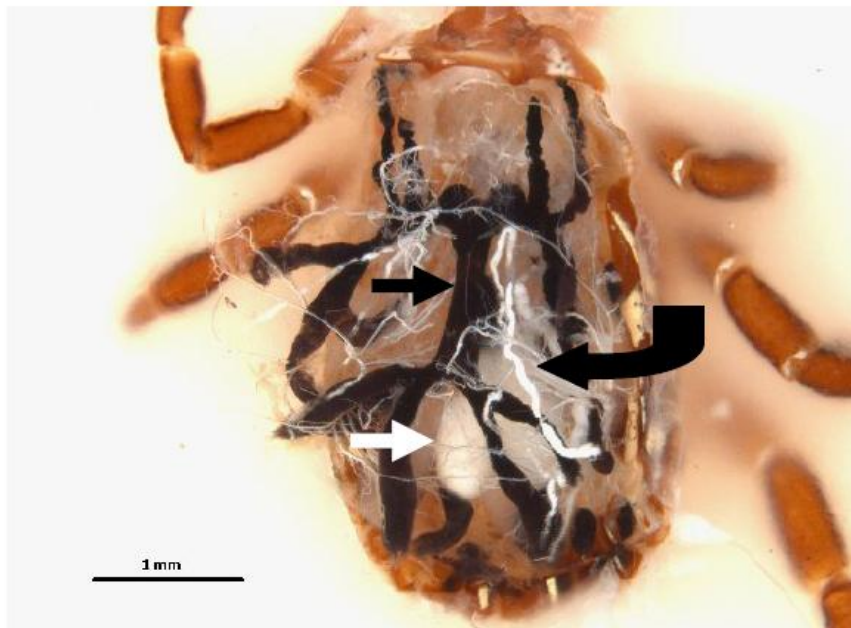
Step 9. Female; gut visible as dark, red, spider-shaped structure (arrows).



Step 10. Male; tracheae (arrows) originating from spiracular plates.



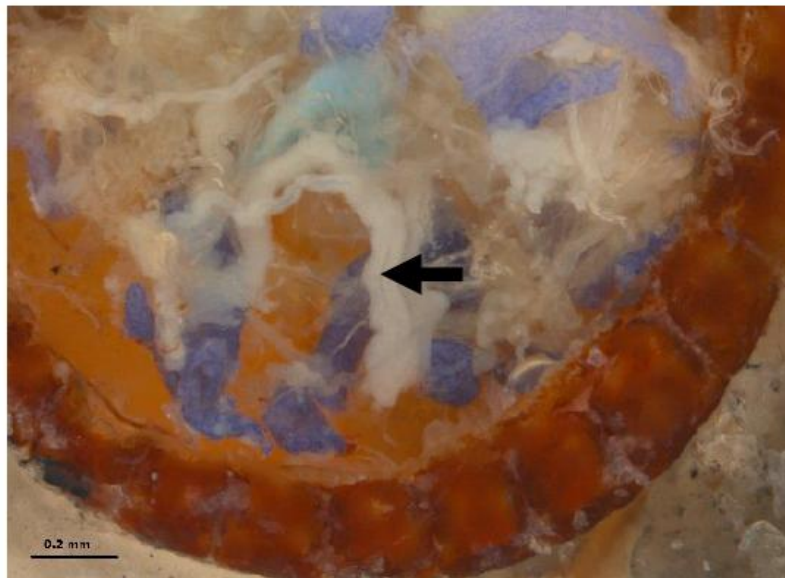
Step 10 (cont.). Male; tracheae close-up.



Step 11. Male; Malpighian tubules (curved arrow), rectal sac (white arrow), and midgut (black arrow).



Step 12. Gut removed and ovaries (arrow) in a female *A. americanum* tick.



Step 12 (cont.). Close-up of previous tick with gut removed to reveal ovaries (arrow) in a female *A. americanum* tick.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Joe MacGown, Department of Entomology & Plant Pathology, Mississippi State University for his assistance in taking photographs 4-12 and to Erle Chenney, Department of Basic Sciences, Mississippi State University for his assistance in preparing the Petri dishes. Funding was provided by the Department of Entomology & Plant Pathology and the College of Veterinary Medicine, Mississippi State University. This article has been approved for publication as Journal Article No. J-11498 of the Mississippi Agriculture and Forestry Experiment Station, Mississippi State University.

References

- Balashov Iu, S., and A. S. Raikhel. 1973.** Electron microscopic study of the Malpighian tubules of the tick *Hyalomma asiaticum* (Schulze and Schlotke) empty females. *Parazitologiya* 7: 231-237.
- Balashov, Y. S. 1968.** Bloodsucking Ticks (Ixodoidea)—Vectors of Diseases of Man and Animals. Medical Zoology Department, United States Naval Reserve Unit Number Three, Cairo, Egypt.
- Buczek, A. 1999.** Physiology of ticks (Ixodida) in non-parasitic phase of life cycle. *Wiad Parazytol* 45: 151-159.
- Douglas, J. 1943.** *Anatomy of Dermacentor andersoni* Stiles. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Goddard, J. 2003.** Experimental infection of Lone Star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of Guinea pigs to the agent. 40: 686-689.
- Goddard, J., and B. R. Norment. 1986.** Spotted fever group rickettsiae in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 23: 465-472.
- Obenchain, F. D., and R. Galun. 1982.** *Physiology of Ticks*. Pergamon Press. Oxford, Great Britian.
- Phillip, C. B., and J. S. White. 1955.** Disease agents recovered incidental to a tick survey of the Mississippi Gulf Coast. *Journal of Economic Entomology* 48: 396-399.
- Pickering, J. 2008.** Discover Life. Texas A&M University. On-line posting (<http://pick4.pick.uga.edu/mp/20q?search=Amblyomma+maculatum&guide=Arachnida>), accessed 14 Nov, 2008.
- Sonenshine, D. E. 1991.** *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York.
- VanDyk, J. 2001.** *Ixodes scapularis* tick dissection. Iowa State University, Department of Entomology, Ames, Iowa, <http://www.ent.iastate.edu/imagegal/ticks/iscap/tickdissection/entiresequence.html>, accessed 18 Nov, 2008.



ANEXO 4

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA) DA FACULDADE DE MEDICINA DA UnB



Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Brasília, 29 de junho de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Estudo de Rhipicephalus sanguineus como Potencial Vetor de Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal”, UnBDoc 57444/2011, sob responsabilidade Professor Gustavo Adolfo Sierra Romero, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte Prédio FM/FS CEP: 70.910-900

ANEXO 5

FORMULÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO E DEPÓSITO DE AMOSTRA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses
Coleção de Leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de Leishmania



CLIOC

Coleção de Leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC - WDCM 731
Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de Leishmania

Solicitação de Caracterização e/ou Depósito de Amostra(s) de *Leishmania*

Tipo de Solicitação:

Caracterização com Depósito; Caracterização sem Depósito

SCD / 2012

DADOS DO DEPOSITANTE

Nome: Gustavo Adolfo Sierra Romero

Vínculo Institucional: Professor

Laboratório: Laboratório de Leishmanioses - Lableish

Departamento: Núcleo de Medicina Tropical

Instituição: Universidade de Brasília

Endereço completo: Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF. 70904-970 Caixa postal 04517

Telefone/ Fax: 61 31071840 e 61 31071843

E-mail: gromero@unb.br, romgustavo@gmail.com,

DADOS DA AMOSTRA

Cepa/Código (Laboratório de origem e/ou outra Coleção): ARH/BR/2011/NMT-DF-2595

Natureza do isolamento (hospedeiro): *Rhipicephalus sanguineus*

Forma clínica: LV LC LM Difusa Disseminada

O isolamento foi Realizado: Antes do Início do Tratamento Após o Início do Tratamento

O isolamento se refere: Ao Primeiro Isolamento deste Hospedeiro A uma Lesão Recidiva A uma Lesão Primária A uma Lesão Secundária

A cepa foi isolada a partir de: BIÓPSIA DE LC Aspirado de LC Medula-Óssea Linfonodo

Outros(especificar): Conteúdo Intestinal do carrapato

Algum Método Diagnóstico foi Utilizado Antes ou Após o isolamento da Cepa? Sorológico Molecular

Imprint Em Lâmina Outro: Favor especificar a metodologia utilizada e os resultados obtidos: PCR kDNA no cão de onde foi coletado o carrapato

Local do isolamento (País/Estado/Município): Distrito Federal

Data do isolamento: 20/09/2011

Método de isolamento: Cultura em meio semissólido Difco Blood Base Agar com 15% sangue de coelho

Amostra já foi caracterizada? (em caso positivo, indique a metodologia e o resultado obtido):

Não Sim (hsp70-RFLP haellI com perfil Idêntico ao de *L. infantum*)

INFORMACOES COMPLEMENTARES

Melo de cultivo recomendado: NNN ou Schneider. O isolado cresce bem nos dois meios

Av. Brasil, 4365 Mangueiras - Rio de Janeiro, RJ - CEP 21040-360 - Brasil
Pavilhão Leônidas Deane, 1º andar - sala 116 e 5º andar - sala 502, 502-A, 509, 509-A
Tel.: (0055) (21) 3865-8177 / 3865-8195 / 3865-8172 / 3865-8226 - Fax: (0055) (21) 3865-8195



Tipo de depósito: () Aberto¹ () Restrito² (x) Fechado³ () Fiel Depositário

Forma de encaminhamento: (x) Cultura (Especifique o meio)

() Amostra Criopreservada (Especifique as condições)

() Extrato (Apenas no caso de CARACTERIZAÇÃO)

() Outro (especifique)

Especificações: Meio semissólido blood base agar difco com 15% sangue de coelho com fase líquida de Schneider com 20% SFB

Outras informações (referências bibliográficas / patentes/ outras características/ observações)

O depósito é fechado por três anos.

Data de envio da amostra: / /

Local e Data: 19-Jun-2012 19:21

Assinatura Responsável pela Solicitação:

Matrícula ou Identificação: FUB 309087

Autorização (Curadoria):

Pedido recebido (Responsável Técnico):

Data recebimento da amostra: / /

Ordem de Entrada:

1. (ABERTO) Sem restrições quanto à distribuição da amostra.

2. (RESTRITO) Distribuição autorizada apenas para algumas instituições ou pessoas (discriminar).

3. (FECHADO) A distribuição da amostra não está autorizada.

NOTA: No caso de depósito RESTRITO ou FECHADO o solicitante deve especificar o tempo necessário para que o depósito permaneça nesta categoria.

4. A veracidade das informações contidas neste formulário são de total responsabilidade do depositante/solicitante do serviço, assinando assim a CLIOC da mesma.

ANEXO 6

RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ENZIMAS



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC – WDCM 731
Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de *Leishmania*

RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

FORMULÁRIO Nº: ER 10/2012

Solicitação (s) nº 18/2012

Solicitante (nome e instituição): Gustavo Adolfo Sierra Romero
Laboratório de Leishmanioses – Núcleo de Medicina Tropical - UNB

Data da entrada da amostra na CLIOC: 13/06/2012

Data da liberação do resultado: 16/07/2012

| Amostra | Ordem de Entrada CLIOC | Forma de recebimento | Resultado da caracterização | IOC-L |
|--------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|-------|
| ARHI/BR/2011/NMT-DF-2595 | 023/2012 | Cultura | <i>L. infantum</i> | 3377 |

L. infantum – sin. *L. chagasi* (ver Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, et al. 2011. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. PLoS Negl Trop Dis 5(6): e1155. doi:10.1371/journal.pntd.0001155.

Enzimas ensaiadas:

| | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ME | MDH | ACP | G6PDH | PGM | 6PGDH | GPI | FUM | MPI |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| IDH | IDH | PEPD | PEPD2 | PEPD3 | ACON | HK | NH | |
| NADP | NAD | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupolillo et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Registro do ensaio

Formulário de ensaio isoenzimático [Form-LRNTL/CLIOC-027-001]: pág 12

Executado por:
Mariana Boité
Tecnologista

Conferido por:
Elisa Cupolillo
Pesquisador- Curadora CLIOC

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2012

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-361 – Brasil
Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – sala 509 e 1º andar – sala 116
Tel.: (0055) (21) 3865-8226 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8195

APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – Núcleo de Medicina Tropical

Recebido em: 04/07/11

Luciana

Luciana Alves de Quadro
Secretária-Dival
Mat. 156.774-8

Brasília, 28 de junho de 2011.

À Coordenação da Divisão de Vigilância Ambiental do Distrito Federal

Senhor Coordenador,

Estamos desenvolvendo um projeto de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília intitulado “**Estudo de *Rhipicephalus sanguineus* como Potencial Vetor de Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal**”. Trata-se de um estudo que propõe a colaboração entre o Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical/UnB, o Laboratório de Parasitologia e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina/UnB e a Coordenação de Vigilância Ambiental do Distrito Federal, sob a orientação dos professores **Gustavo Romero e Rodrigo Gurgel Gonçalves**.

O estudo, pioneiro no Distrito Federal, terá a finalidade de identificar a presença de *Leishmania* em espécimes de *R. sanguineus* que parasitam cães e estudar a possível associação entre a presença do protozoário nos carrapatos e o estado de soropositividade para leishmaniose visceral nos cães ectoparasitados.

Desta forma, solicitamos a colaboração da equipe da DIVAL e a autorização formal para que a mestranda **Viviane Medeiros Silva** possa realizar as coletas dos ectoparasitos na Divisão de Vigilância Ambiental juntamente com os responsáveis pelo Núcleo de Animais Domésticos.

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, CP 04517. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF. Brasil 70904-970. Contatos: Viviane Medeiros Silva - telefones (61) 3107-1930 / (61) 9648-7559, vianemedeiros@gmail.com, vianemedeiros@unb.br, Gustavo Adolfo Sierra Romero (61) 3107-1843 ou 31071840; romgustavo@gmail.com, Rodrigo Gurgel Gonçalves (61) 3307-2259, rgurgel@unb.br



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – Núcleo de Medicina Tropical

Após finalização da dissertação de mestrado discutiremos e informaremos oficialmente os resultados da pesquisa à Coordenação para aprimorar as ações de vigilância. Ressaltamos que as publicações eventuais sobre os resultados da pesquisa terão a co-autoria da equipe colaboradora da DIVAL

Ficamos à disposição para qualquer esclarecimento,

Atenciosamente,

Gustavo A. S. Romero

Orientador

Rodrigo Gurgel Gonçalves

Co-Orientador

Cleudson Nery de Castro

Coordenador do Núcleo de Medicina Tropical - UnB

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, CP 04517. Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF. Brasil 70904-970. Contatos: Viviane Medeiros Silva - telefones (61) 3107-1930 / (61) 9648-7559, vianemedeiros@gmail.com, vianemedeiros@unb.br, Gustavo Adolfo Sierra Romero (61) 3107-1843 ou 31071840; romgustavo@gmail.com, Rodrigo Gurgel Gonçalves (61) 3307-2259, rgurgel@unb.br

APÊNDICE 2 – Quadro Geral de Resultados

| Cão | ELISA | RIFI | DPP | PCR (kDNA) Sangue Canino | n de Carrapatos | Estádio/sexo dos carrapatos | | | PCR (kDNA) G. Salivar (n 44 pools) | | | PCR (kDNA) Intestinos (n 44 pools) | | | Culturas |
|-----|--------------|---------------|----------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|--------|--------|------------------------------------|----------|----------|------------------------------------|----------|----------|-------------------|
| | | | | | | Fêmeas | Machos | Ninfas | Fêmeas | Machos | Ninfas | Fêmeas | Machos | Ninfas | |
| 01 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 01 | 01 | | | Negativo | | | Negativo | | | |
| 02 | Não reagente | Não realizado | Positivo | Negativo | 06 | 04 | 02 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 03 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | 05 | | 05 | | | Negativo | | | Negativo | | |
| 04 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 06 | 05 | 01 | | Positivo | Positivo | | Positivo | Negativo | | Positivo (Fêmeas) |
| 05 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 07 | 05 | 02 | | Positivo | Negativo | | Positivo | Positivo | | |
| 06 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | 05 | 02 | 03 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 07 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 08 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 09 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 10 | Reagente | 1/40 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 11 | Reagente | Não reagente | Negativo | Positivo | 01 | | 01 | | | Negativo | | | Negativo | | |
| 12 | Não reagente | Não realizado | Positivo | Negativo | 02 | 01 | 01 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 13 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 14 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 15 | Reagente | Não reagente | Negativo | Negativo | 03 | | | 03 | | | Positivo | | | Positivo | |
| 16 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 06 | 04 | 02 | | Positivo | Positivo | | Positivo | Positivo | | |
| 17 | Reagente | Não reagente | Negativo | Negativo | 10 | 05 | 05 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 18 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 19 | Reagente | Não reagente | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 20 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 21 | Reagente | 1/40 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 22 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | 03 | | 03 | | | Negativo | | | Negativo | | |
| 23 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 06 | 04 | 02 | | Positivo | Positivo | | Negativo | Negativo | | |
| 24 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 05 | 03 | | 02 | Negativo | | Negativo | Negativo | | Negativo | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------|---------------|----------|----------|----|----|----|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------|
| 25 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | 06 | | 06 | | | Negativo | | | Negativo | | |
| 26 | Reagente | Não reagente | Negativo | Negativo | 06 | 06 | | | Negativo | | | Negativo | | | |
| 27 | Reagente | 1/80 | Positivo | Negativo | 04 | 02 | | 02 | Negativo | | Negativo | Negativo | | Negativo | |
| 28 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 05 | | 05 | | | Positivo | | | Positivo | | Positivo |
| 29 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 30 | Reagente | 1/80 | Negativo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 31 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 32 | Reagente | 1/80 | Positivo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 33 | Reagente | 1/80 | Positivo | Negativo | 02 | 02 | | | Negativo | | | Negativo | | | |
| 34 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Positivo | 15 | 05 | 10 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 35 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 36 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 08 | 03 | 05 | | Positivo | Positivo | | Positivo | Positivo | | Positivo (F e M) |
| 37 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 38 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 01 | 01 | | | Positivo | | | Positivo | | | |
| 39 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | 03 | 02 | 01 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 40 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Positivo | 04 | 02 | 02 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 41 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 42 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 43 | Reagente | 1/40 | Positivo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 44 | Reagente | 1/40 | Positivo | Positivo | 02 | 01 | 01 | | Positivo | Negativo | | Positivo | Negativo | | Positivo (Fêmea) |
| 45 | Não reagente | Não realizado | Negativo | Negativo | | | | | | | | | | | |
| 46 | Reagente | Não reagente | Negativo | Negativo | 04 | 03 | 01 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Negativo | | |
| 47 | Reagente | 1/80 | Negativo | Positivo | | | | | | | | | | | |
| 48 | Reagente | 1/80 | Positivo | Positivo | 04 | 01 | 03 | | Negativo | Negativo | | Negativo | Positivo | | |

APÊNDICE 3

RESULTADOS DO ALINHAMENTO Blastn

Amostra Sangue Cão 1 (2004)

SEQ 2004S_BW_B_008_D02: 87 bp;
Composition 18 A; 19 C; 19 G; 21 T; 10 OTHER
Percentage: 20.7% A; 21.8% C; 21.8% G; 24.1% T; 11.5%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 26.85 dsDNA: 53.6

ORIGIN

1 NNNNNNNNNN CAAAACGTGA TTTTCGGGGG ATTTTTGACG GGGTTTCTGT ATGCCAAAAT
61 GGCATTTTCGC AGAACGCCCC CTACCCA

[emb|X54472.1|](#) *L. braziliensis guyanesis* kinetoplast minicircle (LBkDNA25)
DNA, conserved region
Length=220

Score = 107 bits (118), Expect = 7e-21
Identities = 72/77 (94%), Gaps = 4/77 (5%)
Strand=Plus/Plus

Query 2 AAAACGTGATTTTCGGGGGATTTTGAACGGGGTTTCTGTATGCCAAAATGGCATTTTCGC
60

|||||
Sbjct 110 AAAACGTGATTTTCGGGGGATTTTGAACGGGGTTTCTGTATGCCAAAAT--CGTTTCGC
167

Query 61 AGAACGCCCCCTACCCA 77

|||||
Sbjct 168 AGAACG-CCCCTACCCA 183

Amostra Cultura Carrapatos Cão 1 (2004)

SEQ 2004C_BW_B_002_A02: 88 bp;
Composition 13 A; 21 C; 14 G; 28 T; 12 OTHER
Percentage: 14.8% A; 23.9% C; 15.9% G; 31.8% T; 13.6%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 26.96 dsDNA: 54.3

ORIGIN

1 NNNNNNNNNN NNACATTTTG GCATTTTGG CCAATTTTGG ACGGGATTTT TGCACCCATT
61 TTTTCGGTTTT CGCAGAACGC CCCTACCC

[gb|EU437406.1|](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone
LinGpja_8
kinetoplast minicircle, complete sequence
Length=780

Score = 122 bits (134), Expect = 3e-25
Identities = 72/74 (97%), Gaps = 1/74 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 4 ttttggcatttttggccaatttttga-cgggatcttctgcaccatttttgcggttttCGCA
62

|||||
Sbjct 52 TTTTGGCATTTTGGCCAATTTTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTCGATTTTCGCA
111

Query 63 GAACGCCCTACCC 76
|||||||
Sbjct 112 GAACGCCCTACCC 125

SEQ 2004C_BW_CA_001_A03: 87 bp;
Composition 13 A; 20 C; 14 G; 27 T; 13 OTHER
Percentage: 14.9% A; 23.0% C; 16.1% G; 31.0% T; 14.9%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 26.68 dsDNA: 53.6
ORIGIN
1 NNNNNNNNNN NNNACATTTG GCATTTTTGG CAATTTTTGA CGGGATTCT GCACCCATTT
61 TTCGGTTTTC GCAGAACGCC CCTACCC

SEQ 2004C_F_001_A01: 106 bp;
Composition 2 A; 9 C; 13 G; 9 T; 73 OTHER
Percentage: 1.9% A; 8.5% C; 12.3% G; 8.5% T; 68.9%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 32.80 dsDNA: 65.4
ORIGIN
1 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NTTTCNNNTT TGCCNNNNT NNCCNNNNNN
61 NNNTCCNGGG CGGGNNNTG NNNNNNNNNN ANNNNNNNGG GCGGNA

Amostra Sangue Cão 2 (2361)

SEQ 26315_completo: 128 bp;

ORIGIN
Primer BW-B
1 CCGCCCCTA TTTTACACC AACCCCCAGT TTCCCGCCC GGAGCCAGAA TTGGCATTTT
61 GGCATTTTTG GCCAATTTTT GACGGGATT CTGCACCCAT TTTTCGGTT TCGCAGAACG
121 CCCCTACCC
Primer FW

[gb|EU437406.1|](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone
LinGpja_8
kinetoplast minicircle, complete sequence
Length=780

Score = 165 bits (182), Expect = 6e-38
Identities = 116/129 (90%), Gaps = 9/129 (7%)
Strand=Plus/Plus

Query 2 CCGCCCCTATTTTTACACCAACCCCCAGTTTCCCGCCCCGGAGCCAGAattggcattttg
61
Sbjct 5 CCGGCCCTATTTT-ACACCAACCCCCAGTTTCCCGCCTCGGAGCCC--ATT-----TTTG
56

Query 62 gcatttttggccaatttttga-cgggatttctgcacccatttttcggttttCGCAGAACG
120
Sbjct 57 GCATTTTTGGCCAATTTTTGAACGGGATTCTGCACCCATTTTCGATTTTCGCAGAACG
116

Query 121 CCCCTACCC 129
|||||||
Sbjct 117 CCCCTACCC 125

Amostra Sangue Cão 3 (2595)

SEQ 25955_completa: 122 bp;

ORIGIN

1 CCGCCCCTAT TTTACACCAA CCCCAGTTT CCGCCCCGG AGCCGAATAT TTGGCATTTT
61 TGGCCAATTT TTGAACGGGA TTTCTGCACC CATTTTTTCGG TTTTCGCAGA ACGCCCCTAC
121 CC

[emb|Z35292.1|](#) *L.infantum* (AJS-D2PST) kinetoplast DNA
Length=803

Score = 194 bits (214), Expect = 1e-46
Identities = 117/122 (96%), Gaps = 1/122 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 CCGCCCCTATTTTACACCAACCCCAGTTTCCCGCCCCGGAGCCGAATATTTGGCATTTT
60
Sbjct 165 CCGCCCCTATTTTACACCAACCCCAGTTTCCCGCCCCGGAGCCGATT-TTTGGCATTTT
107
Query 61 TGGCCAATTTTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTTCGGTTTTTCGCAGAACGCCCTAC
120
Sbjct 106 TGGCCGATTTTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTCCGATTTTCGCAGAACGCCCTAC
47
Query 121 CC 122
Sbjct 46 CC 45

Amostra Cultura Carrapatos Cão 3 (2595)

SEQ 2595C_completa: 119 bp;

ORIGIN

primer BW-B
1 CCGCCCCTAT TTTACACCAC CCCAGTTTCC CGCCCCGGAG CCAGATATTG GCATTTTGG
61 CCAATTTTGG AACGGGATTT CTGCACCCAT TTTTCGGTTT TCGCAGAACG CCCCTACCC
Primer FW

[gb|EU437406.1|](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone
LinGpja_8
kinetoplast minicircle, complete sequence
Length=780

Score = 176 bits (194), Expect = 3e-41
Identities = 112/121 (93%), Gaps = 2/121 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CCGCCCCTATTTTACACCA--CCCAGTTTCCCGCCCCGGAGCCAGATATTGGCATTTT
58
Sbjct 5 CCGGCCCTATTTTACACCAACCCCAGTTTCCCGCCTCGGAGCCCATTTTGGCATTTT
64

```

Query 59 GGCCAATTTTTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTTCGGTTTTTCGCAGAACGCCCTACC
118
Sbjct 65 GGCCAATTTTTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTTCGATTTTTTCGCAGAACGCCCTACC
124
Query 119 C 119
Sbjct 125 C 125

```

Amostra Sangue Cão 4 (2623)

SEQ 26235_completa: 121 bp;
Composition 21 A; 43 C; 21 G; 36 T; 0 OTHER
Percentage: 17.4% A; 35.5% C; 17.4% G; 29.8% T; 0.0%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 36.85 dsDNA: 74.6
ORIGIN primer BW-B
1 CCGCCCCTAT TTTACACACC AACCCCCAGT TTCCCGCCTC GGAGCCGATA TTGGCATT
61 TGGCCAATTT TTAGCGGGAT TTCTGCACCC ATTTTTTCGGT TTTCGCAGAA CGCCCCTACC
121 C primer FW

[gb|EU437406.1|](#) *Leishmania infantum* isolate MCAN/ES/98/10445 clone
LinGpja_8
kinetoplast minicircle, complete sequence
Length=780

Score = 176 bits (194), Expect = 3e-41
Identities = 115/123 (93%), Gaps = 4/123 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 CCGCCCCTATTTTACACACCAACCCCCAGTTTCCCGCCTCGGAGCCGATATT-GGCATTT
59
Sbjct 5 CCGGCCCTATTTTACAC--CAACCCCCAGTTTCCCGCCTCGGAGCCCATTTTTGGCATT
62
Query 60 TTGGCCAATTTTTGA-CGGGATTTCTGCACCCATTTTTTCGGTTTTTCGCAGAACGCCCTA
118
Sbjct 63 TTGGCCAATTTTTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTTCGATTTTTTCGCAGAACGCCCTA
122
Query 119 CCC 121
Sbjct 123 CCC 125

```

Amostra Cultura Carrapatos Cão 4 (2623)

SEQ 2623C_completa: 130 bp;

ORIGIN primer BW-B
1 CCGCCCCTAT TTTACACCAA CCCCCAGTTT CCCGCCCGG AGCCGATATA TTGGCATT
61 TGGCCATTTT GGCCAATTTT TGACGGGATT TCTGCACCCA TTTTTCGGTT TTTCGCAGAAC
121 GCCCCTACCC Primer FW

[gb|EU370885.1|](#) *Leishmania donovani* isolate Ld-IN-35 kinetoplast
minicircle,
partial sequence
Length=116

Score = 167 bits (184), Expect = 2e-38
Identities = 112/125 (90%), Gaps = 9/125 (7%)
Strand=Plus/Minus

Query 6 CCTATTTTACACCAACCCCAAGTTTCCCGCCCCGGAGCCGATATattggcatttttggcc
65

|||||
Sbjct 116 CCTATTTTACACCAACCCCAAGTTTCCCGCCCCGGAGCCGATTT-TTGGCATTTTTGGCT
58

Query 66 attttggccaatttttgacgggatttctgcaccatttttcggttttCGCAGAACGCCCC
125

|||||
Sbjct 57 ATTTT-----TTGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTTCGGTTTTCGCAGAACGCCCC
6

Query 126 TACCC 130

|||||
Sbjct 5 TACCC 1

APÊNDICE 4

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE CÃES COM SUSPEITA E/OU CONFIRMADOS COM LEISHMANIOSE

Ficha de Identificação de Cães com Suspeita e/ou Confirmados com Leishmaniose

Nº da Ficha: _____ Data da Coleta: _____

Sexo: ()M ()F Idade: _____

Raça: _____ Pelagem (cor): _____

Pelagem tamanho: () Curta () Média () Longa

Porte: () Pequeno () Médio () Grande

Proprietário: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone: _____

Quantidade de carrapatos coletados: _____

Larvas: ___ Ninfas: ___ Adultos: ___ Fêmeas: ___ Machos: ___

Coleta de Amostra sanguínea: () Sim () Não

Observações:

APÊNDICE 5

LEITURA DOS RESULTADOS DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO DE DUPLO PERCURSO (TRDPP) DOS 4 CÃES COM AMOSTRAS ANALISADAS PELO SEQUENCIAMENTO E DE MAIS TÉCNICAS MOLECULARES E SOROLÓGICAS

