



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

MÁRCIA JANETE DE FÁTIMA MESQUITA DE FIGUEIREDO

SOROPREVALÊNCIA E AVALIAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE COLARES, ESTADO DO PARÁ

BELÉM-PA

2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

MÁRCIA JANETE DE FÁTIMA MESQUITA DE FIGUEIREDO

SOROPREVALÊNCIA E AVALIAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE COLARES, ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como exigência do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nazaré Fonseca de Souza.

BELÉM-PA

2013

Figueiredo, Márcia Janete de Fátima Mesquita de

Soroprevalência e avaliação clínica da Leishmaniose visceral canina no Município de Colares, Estado do Pará. / Márcia Janete de Fátima Mesquita de Figueiredo. - Belém, 2013.

88 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Soroprevalência. 3. Cães - avaliação clínica. I.Título.

CDD – 616.9363

MÁRCIA JANETE DE FÁTIMA MESQUITA DE FIGUEIREDO

SOROPREVALÊNCIA E AVALIAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA NO MUNICÍPIO DE COLARES, ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como exigência do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Data da aprovação: 07/03/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Nazaré Fonseca de Souza - Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof^ª. Dr^ª. Edna Aoba Yassui Ishikawa - 1º Examinador
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Maria Goés Negrão - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno - Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

A DEUS que enviou seu filho amado JESUS CRISTO que vive e reina para sempre em minha vida.

Ao meu pai JOSÉ MESQUITA DE SOUZA FILHO “in memoriam” cuja presença ainda permanece viva no meu coração. Saudade.

Aos CÃES vítimas da Leishmaniose em todo mundo e que padecem por serem incriminados como os maiores responsáveis pela disseminação da doença.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e por me sustentar, me motivando em todos os meus momentos.

A minha família, sem a qual não teria conquistado esta vitória.

Ao meu marido Heriberto Ferreira de Figueiredo pelo seu amor, estímulo e companhia, TE AMO.

Aos meus filhos Mariah Mesquita de Figueiredo e Hiarley Mesquita de Figueiredo por todo orgulho e amor que tenho de vocês e por entenderem os momentos de minha ausência, principalmente da “barriga”.

A minha mãe Ana Maria Monteiro Mesquita, exemplo de superação, pelas orações, amor, confiança e incentivo.

As minhas irmãs Dedé Mesquita e Joseana Silva que sempre me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas.

Ao meu irmão José Maria Mesquita, sobrinhos (as) e cunhados (as) por fazerem parte das minhas realizações.

Ao meu “patrimônio” doméstico, Maria Tereza Barbosa, por cuidar tão bem da minha casa e dos meus filhos.

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela oportunidade em realizar o Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia e também pela viabilização do transporte para as realizações das viagens de campo.

À minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Nazaré Fonseca de Souza pela orientação, por acreditar sempre em mim, estimulando-me constantemente, pela contribuição e ensinamentos durante toda a minha vida acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses, Diretor do HOVET/UFRA, pela amizade, orientação, apoio e incentivo dado a todos os Médicos Veterinários do HOVET em fazer a pós-graduação, contribuindo para a nossa qualificação.

A Médica Veterinária Monica da Rocha Fadul, da Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará, pelo apoio e disponibilização de dados para iniciarmos este estudo.

Ao Programa de Cooperação Acadêmica - Novas Fronteiras (PROCAD-NF UFRA-UFRPE-UNESP Botucatu) pelo apoio financeiro, em especial a Coordenadora do PROCAD/UFRA, Prof^a. Dr^a. Maria das Dores Correia Palha, pela organização e viabilização na realização dos trabalhos de campo, como também na viagem de intercâmbio para Recife e pela aquisição dos kits sorológicos. Ao Coordenador do PROCAD/UFRPE, Prof. Dr. Jean Carlos Ramos, pelo apoio.

A Prefeitura Municipal de Colares, estado do Pará, pelo apoio e compromisso na realização dos trabalhos de campo.

A Secretaria Municipal de Saúde de Colares, que nos proporcionou o primeiro contato com os Agentes Comunitários de Saúde, ponto de partida para este estudo e por conceder um espaço para realização dos trabalhos pós-campo.

Aos Agentes Comunitários de Saúde do município de Colares pelo trabalho de divulgação nas localidades, facilitando e intermediando no contato com os moradores.

Aos proprietários dos cães, moradores dos bairros e localidades rurais do município de Colares, pela importante colaboração, permitindo a realização deste estudo.

A toda a equipe de trabalho de campo: Médico Veterinário Heriberto Ferreira de Figueiredo, Prof^a. Dr^a. Nazaré Fonseca de Souza, Médicos Veterinários Residentes do HOVET/UFRA Joanan Souza e Anderson Carvalho, Biomédica e responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas do HOVET/UFRA Flávia Oliveira, bolsistas do Projeto Vida Digna/UFRA Suelen Farias e Luciana Siqueira, funcionário do Projeto Carroceiro/UFRA Raimundo Magno e motoristas da UFRA Orivaldo Alves e José Soares da Paz, pelo apoio, ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Léucio Câmara Alves da Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter me recebido tão bem no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, pelo apoio e colaboração neste estudo.

A toda equipe de graduandos e pós-graduandos do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, da UFRPE, pela recepção, em especial à Médica Veterinária Residente do Laboratório Gláucia Grazielle Nascimento pelo apoio e por todo seu conhecimento prestado durante a realização dos testes sorológicos, pela amizade construída, carinho e companhia.

Aos membros da Banca de Qualificação: Prof^ª. Dr^ª. Edna Aoba Yassui Ishikawa, Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno e Prof^ª. Dr^ª. Andréa Maria Goés Negrão, por auxiliarem na correção deste trabalho, contribuindo para o melhor desenvolvimento da dissertação.

Ao Prof. Dr. Ednaldo Silva Filho, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural da Amazônia, pela orientação, análise estatística e auxílio na elaboração das tabelas.

As bibliotecárias, Sueli França, Nilzete Gomes e Heloísa Brasil, da Biblioteca Lourenço José Tavares Vieira da Silva, da Universidade Federal Rural da Amazônia, pelas correções das referências bibliográficas e pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos colegas da Turma de Mestrado, pela convivência e descontração durante as disciplinas ministradas no curso.

A todos do HOVET, Projeto Vida Digna e demais colegas, que de forma direta ou indireta, me apoiaram e incentivaram neste trabalho.

RESUMO

Para elaboração de medidas de controle mais efetivas para diminuir o número de casos de Leishmaniose Visceral Humana (LVH) são fundamentais as informações sobre a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). No Pará, essas informações são escassas na maior parte dos seus municípios. Assim, foi realizado um estudo com o objetivo de determinar a soroprevalência e avaliar as alterações clínicas da LVC no município de Colares, estado do Pará. Foram coletadas e analisadas 435 amostras de soro sanguíneo de cães de ambos os sexos, idade a partir de 4 meses, com ou sem padrão de raça definida e com ou sem sintomatologia clínica sugestiva da enfermidade, dos bairros e das localidades da zona rural. A sorologia foi realizada empregando-se os métodos Ensaio Imunoenzimático (ELISA/S7) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em lâminas fixadas com antígenos de *Leishmania infantum*. O resultado da soroprevalência foi de 9,9%. A variável sexo não apresentou prevalência significativa ($P > 0,05$). Observou-se prevalência significativa de LVC e as variáveis faixa etária e classificação clínica ($P < 0,05$). A soroprevalência foi maior para cães na faixa etária menor de 2 anos e para os classificados clinicamente como sintomáticos, sendo que onicogribose e alterações cutâneas foram as alterações clínicas mais frequentes. Nas localidades estudadas a frequência dos cães sororeagentes baseados nas reações de ELISA, RIFI e ELISA+RIFI, foram: 86,1 e 74,1% pelo ELISA, em Juçateua e Uriri, respectivamente; 55,1 e 48% à RIFI, no Ariri e Genipáuba da Laura, respectivamente e 30,5, 22,4 e 20% ao ELISA + RIFI, em Juçateua, Ariri e Guajará, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo são a primeira confirmação da soroprevalência no município de Colares e contribuem na elaboração de medidas de controle da LVC no estado do Pará.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, soroprevalência, avaliação clínica, ELISA, RIFI.

ABSTRACT

For the elaboration of more effective control measures for reducing the number of cases of Human Visceral Leishmaniasis (HVL), the information on the prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is vital. In the state of Pará, this information is scarce in most of its municipalities. Thus, a study was conducted in order to determine the seroprevalence and to evaluate the clinical changes in CVL in the city of Colares, state of Pará. 435 blood serum samples were collected and analyzed, from dogs of both sexes, aged from 4 months, with or without standard breed and with or without clinical symptoms suggesting the disease, from the neighborhoods and rural localities. The serology was performed using immunoenzymatic assay (ELISA/S7) and Immunofluorescence Assay (IFA) methods in fixed slides with *Leishmania infantum* antigens. The result of seroprevalence was 9.9%. The gender variable showed no significant prevalence ($P > .05$). Significant prevalence of CVL and the age and clinical classification variables ($P < .05$) were observed. The seroprevalence was higher for dogs under 2 years old and for those classified as clinically symptomatic, and onychogryphosis and skin changes were the most common clinical changes. In the studied localities, the frequency of seropositive dogs based on ELISA, IFA and ELISA + IFA reactions was 86.1 and 74.1% by ELISA, in Juçarateua and Uriri respectively, 55.1 and 48% to the IFA, in Ariri and Genipaúba da Laura respectively, and 30.5, 22.4, and 20% to the ELISA + IFA in Juçarateua, Ariri and Guajará respectively. The results obtained in this study are the first confirmation of seroprevalence in the city of Colares and they contribute for the development of measures for controlling CVL in the state of Pará.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, seroprevalence, clinical evaluation, ELISA, IFA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Mapa do município de Colares, estado do Pará, indicando os limites geográficos, zona urbana, bairros estudados da zona urbana e localidades estudadas da zona rural. 68
- Tabela 1:** Resultado das reações sorológicas para Leishmaniose Visceral Canina pelos métodos ELISA e RIFI em 435 cães do município de Colares, estado do Pará - 2013. 70
- Tabela 2:** Prevalência e variáveis sexo, faixa etária e classificação clínica associadas à soropositividade nas reações ELISA+RIFI para Leishmaniose Visceral Canina no município de Colares, estado do Pará - 2013. 71
- Tabela 3:** Frequência dos sororeagentes no ELISA e RIFI, baseados nas alterações clínicas dos cães do município de Colares, estado do Pará - 2013. 71
- Tabela 4:** Frequência dos cães sororeagentes baseados nas reações de ELISA, RIFI e ELISA+RIFI nas localidades do município de Colares, estado do Pará - 2013. 72
- Gráfico 1:** Dendograma para demonstração gráfica com base na comparação das localidades que apresentaram cães sororeagentes ao ELISA, RIFI e ELISA+RIFI no município de Colares, estado do Pará - 2013. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ag. AMA - Antígeno Amastigota

ag. PRO - Antígeno Promastigota

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CRS - Centro Regional de Saúde

DCDTV - Departamento de Controle de Doenças Transmissíveis por Vetores

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DPP - Dual Path Platform

DVISA - Departamento de Vigilância Sanitária

EIE/ ELISA - Ensaio Imunoenzimático

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HSP - Heat Shock Proteins

HV/HOVET - Hospital Veterinário

IC - Intervalo de Confiança

IDESP - Instituto do Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará

IFAT - Indirect Fluorescence Antibody Test

IFI - Imunofluorescência Indireta

IPEN - Instituto de Patologia Experimental do Norte

ITEP - Instituto Tecnológico de Pernambuco

LACEN - Laboratório Central/ Laboratório de Referência Estadual

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LDP - Laboratório de Doenças Parasitárias

LV - Leishmaniose Visceral

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LVH - Leishmaniose Visceral Humana

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OR - “Odds Ratio”

P - Probabilidade

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PROCAD NF - Programa de Cooperação Acadêmica Novas Fronteiras

® - Trade Mark/ Marca Comercial

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

rK39 - Antígeno recombinante k39

SESPA - Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SMF - Sistema Mononuclear Fagocitário

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Geral	16
1.1.2 Específicos	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	17
1.2.1 A Doença - Leishmaniose Visceral Canina	17
1.2.2 Histórico	17
1.2.3 Agente etiológico, origem e classificação	18
1.2.4 Epidemiologia	20
1.2.4.1 Vetores	20
1.2.4.2 Reservatórios	22
1.2.4.3 Vias de Transmissão	23
1.2.4.4 Evolução	24
1.2.4.5 Prevalência e Fatores de Riscos	25
1.2.4.6 Prevalência no Brasil, de acordo com o diagnóstico sorológico, pelos métodos ELISA e RIFI	27
1.2.5 Resposta Imune	33
1.2.6 Alterações Clínicas	35
1.2.6.1 Alterações Dermatológicas	35
1.2.6.2 Alterações dos Órgãos do Sistema Mononuclear Fagocitário	36
1.2.6.3 Alterações Gerais	36
1.2.7 Diagnóstico	38
1.2.7.1 Método Parasitológico	39
1.2.7.2 Método Sorológico	40
1.2.7.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	41
1.2.7.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	42

1.2.7.2.3 Teste Imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®)	42
1.2.7.3 Método Molecular	43
1.2.8 Controle e Profilaxia	44
1.2.8.1 Controle dos Vetores	44
1.2.8.2 Controle dos Reservatórios Domésticos	45
1.2.8.3 Profilaxia	46
REFERÊNCIAS	47
2 SOROPREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE COLARES, ESTADO DO PARÁ	65
2.1 INTRODUÇÃO	65
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.2.1 Comitê de ética	66
2.2.2 Área de Estudo	66
2.2.3 Animais	69
2.2.4 Métodos Sorológicos	69
2.2.5 Análise Estatística	69
2.3 RESULTADOS	70
2.4 DISCUSSÃO	73
2.5 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICES	83
ANEXOS	86

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As zoonoses são doenças ou infecções transmitidas naturalmente de animais vertebrados para os seres humanos e, exercem um papel de grande valor na relação entre os animais e o homem, sendo assim, o conhecimento da participação dos animais neste contexto é essencial para elucidar diversos aspectos das infecções zoonóticas na natureza, representando um importante elo no ciclo de transmissão, podendo também auxiliar no direcionamento das medidas de controle e prevenção.

Com o objetivo de realizar um estudo da prevalência de zoonoses no Município de Colares, no Estado do Pará, foi solicitado ao Departamento de Vigilância Sanitária (DVISA) da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Colares, informações sobre os agravos notificados em humanos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no período de 2006 a 2011, onde no ano de 2008, foi notificado um caso de Leishmaniose Visceral Humana (informação verbal)¹, sendo um problema de saúde pública mundial e atualmente encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, onde a transmissão para o homem e para os animais se dá através da picada de mosquitos do gênero *Lutzomyia* e, o principal reservatório doméstico na transmissão humana é o cão doméstico.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma das zoonoses globalmente mais importantes, que a cada ano, apresenta uma crescente disseminação pelo Brasil, exigindo que Médicos Veterinários, como também os demais profissionais da área da saúde se mantenham alertas quanto a sua prevalência. Sendo necessário um trabalho responsável e contínuo, baseado em diagnósticos frequentes nas populações caninas, justificando a necessidade de tornar o problema público como a única forma de impedir essa disseminação, devido à gravidade da doença.

No Pará, ainda são escassas as informações sobre a situação da LVC em alguns municípios e até o momento não existe nenhum estudo a respeito da prevalência da LVC no município de Colares. Esta pesquisa é muito importante por ser a primeira realizada sobre a sorologia da LVC em cães nos bairros e localidades das zonas rurais deste município, pertencente à região do Nordeste Paraense.

¹ Informação fornecida pelo Médico Veterinário Lindon Johnson Alves Barreto, Coordenador de Vigilância Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde de Colares, em Belém, em maio de 2011.

De acordo com a Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA), o município de Colares faz parte do 2º Centro Regional de Saúde (CRS), onde também encontramos os municípios: Acará, Bujaru, Concórdia do Pará, Santa Izabel do Pará, Santo Antonio do Tauá, São Caetano de Odivelas, Tomé-Açu e Vigia, entretanto seis municípios desse centro realizam inquérito canino, com os dados recebidos e sistematizados na SESPA. E, segundo a mesma, foram registrados no período de 2006 a 2011, 1.339 casos de leishmaniose visceral canina no 2º CRS: Tomé-Açu com 636, Concórdia do Pará com 335, Bujaru com 169, Acará com 166, Vigia com 29 e São Caetano de Odivelas com 04 (informação verbal)².

O conhecimento sobre a prevalência e de fatores de riscos na epidemiologia da LVC no município de Colares, considerando sua proximidade com o município de Vigia, subsidiará a definição de estratégias para o controle da zoonose naquele município e, poderá apontar para a necessidade de implantação de uma política de vigilância, com interação de informação entre os órgãos da área de saúde e os Médicos Veterinários; investigação epidemiológica de todos os casos caninos e humanos registrados no município e investimentos para a prevenção e controle da LVC.

² Informação fornecida pela Médica Veterinária Monica Fadul da Coordenação de Leishmaniose do Departamento de Controle de Doenças Transmissíveis por Vetores da Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará, em Belém, em junho de 2011.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

- Determinar a soroprevalência e avaliar as alterações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina no município de Colares, estado do Pará.

1.1.2 Específicos

- Comparar a frequência entre as reações sorológicas para Leishmaniose Visceral Canina pelos métodos ELISA e RIFI.

- Relacionar as variáveis sexo, raça, faixa etária e classificação clínica associadas à soropositividade para Leishmaniose Visceral Canina.

- Especificar as alterações clínicas dos cães sorologicamente positivos para Leishmaniose Visceral Canina.

- Analisar a distribuição da soroprevalência da Leishmaniose Visceral Canina nas localidades do município de Colares.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 A Doença - Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), conhecida também como Leishmaniose Visceral Americana (LVA), ou calazar, é uma doença infecto-parasitária de caráter grave e crônico, de grande impacto na saúde pública. Caracterizada por elevada taxa de morbidade e letalidade, sendo considerada primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose, cuja característica principal, e que compromete o seu controle, é a diversidade epidemiológica, em função da grande variabilidade de espécies hospedeiras e reservatórios, de vetores e de características ambientais que interagem e possibilitam a manutenção e difusão da enfermidade (LANGONI, 2008; BRASIL, 2006).

Em Medicina Veterinária, a LVC é a mais importante, pois além da doença ser, na maioria dos casos, severa e fatal para o cão, este é ainda o reservatório da doença para os humanos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os cães têm sido incriminados como o principal reservatório da doença, pois preenchem as condições necessárias para isso, por serem altamente susceptíveis à infecção, por possuírem alto parasitismo cutâneo, e principalmente devido à sua estreita relação com o homem, tanto em áreas rurais, como urbanas (DANTAS-TORRES e BRANDÃO FILHO, 2006). Nos últimos anos a doença vem passando por um processo de urbanização, o que deve ser considerado na epidemiologia da doença (MONTEIRO et al. 2005). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (SILVA, 2008).

É uma doença sistêmica severa, cujas manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado, o quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final e tem evolução lenta e início insidioso (SILVA, 2008; BRASIL, 2006).

1.2.2 Histórico

A participação dos cães no ciclo epidemiológico da doença tem sido estudada desde 1908, quando Nicolle e Comte, na Tunísia, através de estudos experimentais demonstraram pela primeira vez o parasito na pele destes animais, sugerindo o possível papel dos mesmos

como reservatórios do agente (ALVES, 2006). Laveran (1914, apud SILVA, 2011), no Instituto Pasteur, reforça ainda mais esta sugestão através de estudo experimental com *L. infantum* em 25 cães, reproduzindo a infecção, encontrando e descrevendo o parasito na pele e outros órgãos destes animais.

Em 1936, Evandro Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, foi nomeado chefe da Comissão, estabelecida para estudar a leishmaniose visceral no Brasil, que só obteve apoio do governador do estado do Pará. Assim, foi fundado em Belém o Instituto de Patologia Experimental do Norte (IPEN), que serviu de base para Evandro Chagas e seus colaboradores desenvolverem suas pesquisas (LAINSON e RANGEL, 2003).

Em 1937, a equipe chegou à conclusão de que a doença era essencialmente rural e que ocorria apenas em locais próximos a florestas ou capoeiras, razão pela qual foi levantada a hipótese de que o agente causal, nomeado *Leishmania chagasi* por Cunha e Chagas, originava-se de algum animal silvestre (LAINSON e RANGEL, 2005).

O primeiro trabalho relatando a infecção canina nas Américas foi publicado no Brasil na década de 1930 por Evandro Chagas que encontrou 4,1% dos cães infectados nas localidades de Moju e Abaetetuba, no Pará (DIETZE e CARVALHO, 2003 apud CARVALHO, 2005).

Em 1953, outra investigação epidemiológica foi então organizada, envolvendo três proeminentes figuras da medicina tropical brasileira - Joaquim Eduardo Alencar e o casal Leônidas Deane e Maria Paumgartter Deane, que haviam participado da equipe de Evandro Chagas, no Pará, onde estudando a leishmaniose no Ceará, obtiveram facilmente infecções em *Lutzomyia longipalpis*, quando esses flebotomíneos foram alimentados experimentalmente em raposas infectadas, estabelecendo assim a importância epidemiológica de *Lutzomyia longipalpis* como vetor (LAINSON e RANGEL, 2003).

Em 1955, Alencar, Deane e Deane também observaram que a infecção nos cães levava a uma patologia tão grave quanto no homem, pelo fato de que os cães constituíam o principal reservatório para a doença humana indicada pela alta taxa de infecção em espécies de *Lutzomyia longipalpis*, que haviam sido alimentados experimentalmente nesses animais infectados. No entanto, o homem parecia constituir uma escassa fonte de parasitas para o flebotomíneo em questão, quando este era alimentado em pacientes infectados, diante desse fato consideraram o cão sendo o reservatório mais importante na cadeia epidemiológica do que o homem, definindo a doença como zoonose (LAINSON e RANGEL, 2005).

1.2.3 Agente etiológico, origem e classificação

Na América do Sul a leishmaniose visceral canina é um grande problema de saúde pública e veterinária. É uma doença causada por um protozoário flagelado, intracelular

obrigatório de células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), do gênero *Leishmania*, pertencente ao Reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Tripanossomatidae, que necessita de um hospedeiro intermediário invertebrado hematófago, como vetor e, de um hospedeiro vertebrado definitivo. O bioagente da doença recebeu o nome de *Leishmania chagasi* em 1937 por Cunha e Chagas e, nos últimos anos recebeu a denominação de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (LAINSON e SHAW, 2005).

Segundo Lainson e Rangel (2005) o nome de *Leishmania chagasi* denominado por Cunha e Chagas em 1937 permaneceu por muito tempo em uso, apesar do considerável debate sobre a origem do parasita e sua taxonomia. Assim, com relação à origem do agente etiológico da doença no Continente Americano, referem que Lainson e Shaw respectivamente em 1987 e 1998, descreveram que o parasita já estava presente nas Américas mesmo antes da colonização europeia tendo sua origem indígena, através dos animais silvestres nativos, especialmente raposas, divergindo das opiniões de Killick-Kendrick em 1985 e de Rioux et al. em 1990, de que o parasita teria entrado nas Américas por meio de cães trazidos pelos colonizadores europeus durante as invasões portuguesas e espanholas.

Quanto à classificação taxonômica, os pesquisadores divergem mais ainda. Na opinião de Dantas-Torres (2006a), *L. infantum* e *L. chagasi* devem ser considerados como sinônimos, até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta e, considerando a lei de prioridade o nome de *L. infantum* é o nome que prevalece, sendo válido, mesmo para agente causal nas Américas e, que para fins didáticos apenas, o nome de *L. chagasi* deve ser dada entre parênteses após o nome de *L. infantum*, isto é, “*L. infantum* (= *L. chagasi*)”, quando se referir ao parasita isolado nesta área.

Lainson e Rangel (2006) concordam com Dantas-Torres (2006a), de que a lei da prioridade no uso de nomes científicos não deve ser esquecida ou ignorada, e isso é evidente quando esses autores em um de seus artigos consideram correto o uso dos nomes das subespécies *Leishmania infantum infantum* e *L. infantum chagasi*, porém preferem não se referir ao agente etiológico da doença no novo mundo simplesmente como *L. infantum* (= *L. chagasi*), já que o símbolo = sugere que no velho e no novo mundo os parasitas são idênticos, tendo em vista que já foram demonstrados que uma série de diferenças existe entre esses dois organismos.

Shaw (2006) refere um grande interesse nessa discussão entre Dantas-Torres e Lainson e Rangel em 2006 sobre o nome usado para o parasita que causa leishmaniose visceral canina

nas Américas e independente do nome que ele já havia usado em 2002 para o agente etiológico da doença de Leishmania (*Leishmania*) *infantum* *chagasi*, o mesmo acrescentou sua opinião para este dilema taxonômico, quando concorda com esses autores de que as leis de uma nomenclatura devem ser obedecidas em todas as circunstâncias, e que de acordo com a Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE, 1999), o nome *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* é absolutamente correto. Porém considera que o fato em questão é se o nome *chagasi* pode ser sinônimo de *infantum*, e concorda com Lainson e Rangel (2006) que existem diferenças entre esses dois organismos, pois a biologia molecular já demonstrou muitas vezes que essas duas espécies de *Leishmania* são compostas de populações clonais cuja estrutura varia de acordo com o método de caracterização.

Entretanto, Dantas-Torres (2006b) refere que a partir dessa discussão, seria bom enfatizar a importância para uma designação simples, atribuindo um nome único para o agente etiológico na literatura atual, que parece estar perdendo sua identidade, mas não a sua virulência, o que em sua opinião é cientificamente inaceitável.

Concluindo Silveira e Corbett (2010) referem que não podem concordar com a proposta de desqualificar *L. (L.) chagasi*, que tem sido reconhecida por mais de 50 anos, como o agente etiológico da doença, em vista da sua similaridade de DNA com *L. (L.) infantum*, assim acreditam que a melhor decisão a ser tomada em relação a este assunto é manter o status de subespécie para o agente etiológico como *L. (L.) i. chagasi*, como foi proposto por Lainson e Shaw (2005) em sua última revisão sobre parasitas neotropicais com importância médica.

A nomenclatura *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* será usada neste trabalho para o agente etiológico da LVC no Brasil, de acordo com a Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE, 1999).

1.2.4 Epidemiologia

1.2.4.1 Vetores

Os vetores da leishmaniose visceral canina são insetos dípteros, hematófagos, pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, comumente chamados de flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (nas Américas), tendo como principal vetor da *L. (L.) i. chagasi* no Brasil o *Lutzomyia longipalpis*, também têm sido incriminados como vetores o *Lutzomyia cruzi* no estado do Mato Grosso do

Sul e o *Lutzomyia intermedia*, no litoral do município do Rio de Janeiro. Com vasta distribuição nos climas quente e temperado, coincidindo com os focos da doença, de hábito alimentar eclético, antropofílico e com comprovação de infecção natural e experimental (COSTA, 2011; DANTAS-TORRES, 2007; BARATA et al., 2004).

Popularmente conhecidos por mosquito palha, tatuquira, birigui ou cangalhinha, caracterizados pelo pequeno porte, de 1 a 3 mm de comprimento, corpo e patas cobertos de pelos e de coloração clara (cor de palha ou castanho claro), facilmente reconhecível pelo comportamento de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso, o que limita o deslocamento e os mantém no nível do solo, próximos a vegetação. Na fase larvária desenvolvem-se em ambientes com pouca luminosidade, úmidos, sombreados com muitas árvores, ricos em matéria orgânica em decomposição. As formas adultas possuem atividade predominantemente crepuscular e noturna, estão adaptadas a variadas temperaturas e a diversos ambientes, tendo capacidade de se adaptar ao ambiente peridomiciliar, especialmente em zonas rurais ou suburbanas, áreas com abundância de animais domésticos e abrigos de animais, aumentando muito a densidade populacional destes insetos, facilitando a transmissão da doença. Como muitos outros dípteros hematófagos necessitam de carboidratos, que na natureza são extraídos da seiva de plantas e de frutas maduras, porém para que ocorra a maturação e desenvolvimento dos ovos as fêmeas precisam ingerir, além de carboidratos, uma fonte alimentar sanguínea encontrada em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2006; BARATA et al., 2005; FRANÇA-SILVA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2005).

No Brasil, a distribuição geográfica de *Lu. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão, antigamente eram encontrados apenas nas matas das regiões Norte e Nordeste, participando do ciclo primário na transmissão da doença. Progressivamente houve adaptação desse inseto para o ambiente rural somada à presença de animais silvestres e sinantrópicos, com a sua expansão encontra-se distribuído em todas as regiões geográficas do país: Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, exceto a região Sul, apesar de já apresentar distribuição geográfica ampla, parece estar passando por uma expansão ainda mais territorial, com Acre, Amazonas, Amapá, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul como os únicos estados que ainda não registraram a presença desse flebotomíneo (RANGEL e VILELA, 2008; BRASIL, 2006; RESENDE, et al., 2006).

No estado do Pará, região Norte do Brasil, poucos trabalhos foram realizados com relação à distribuição do flebotomíneo *Lu. longipalpis* em seus municípios, como de Oliveira (2009) onde refere que o município de Barcarena, pertencente à mesorregião metropolitana de

Belém, apresenta uma rica fauna flebotomínea, sendo a espécie *Lu. longipalpis* a mais abundante em área de mata e em área de borda de mata, concluindo que a espécie é mais bem adaptada nas áreas alteradas por ação antrópica. Também Garcez et al. (2010) realizando um estudo sobre vigilância da leishmaniose visceral no município de Juruti, região oeste do estado, revelaram a presença de flebotomíneos sinantrópicos, com predominância de *Lu. longipalpis* em relação a *Lutzomyia* spp. No entanto, Silveira e Corbett (2010) referem que mais precisamente na região metropolitana de Belém, recentemente foi descoberta a presença de *Lu. longipalpis* em uma área de campo de floresta do Instituto Evandro Chagas no município de Ananindeua, que é próxima ao Parque Ambiental do Utinga e segundo estes autores isto pode confirmar a existência de um ciclo enzoótico indígena de *L. (L.) i. chagasi* nesta área onde não há evidência de doença visceral humana ou canina.

1.2.4.2 Reservatórios

O reservatório de uma doença infecciosa é representado quando o agente causador da doença sobrevive em uma determinada espécie animal, e assim, mantendo-se no ambiente, sendo amplamente aceito que essa manutenção, bem como a dificuldade da erradicação da doença em meios antrópicos está associada a pouca capacidade de se determinar de maneira completa todos os casos da doença não humana e a capacidade dos animais de infectar os vetores (SILVA e SANTOS, 2011; REITHINGER e DAVIES, 2002).

No Brasil, o cão é considerado o maior reservatório doméstico e desempenha o papel de fonte de infecção imediata para os vetores que infectam os humanos, sendo hospedeiro primário do protozoário *L. (L.) i. chagasi* (LAINSON e SHAW, 2005).

Os cães são os animais de companhia comumente encontrados com um grande número de famílias, tanto em áreas rurais quanto em urbanas e à saúde dos cães torna-se uma grande preocupação, devido essa relação próxima com o homem e até o presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da leishmaniose visceral o cão é considerado epidemiologicamente o mais importante, pois apresenta uma alta susceptibilidade à infecção e um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da doença, mesmo assintomático (MOSHFE et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MELO, 2004).

Silva (2007) afirma que outros hospedeiros vertebrados podem compor o cenário epidemiológico da LVC em áreas endêmicas, pois, mesmo com a retirada de todos os cães soropositivos, o ciclo de transmissão da doença ainda pode existir, e segundo Albuquerque et al. (2007) cães abandonados, ao vagar pela periferia da cidade, podem se infectar ao entrarem

em contato direto com reservatórios selvagens da doença e, ao retornarem para o interior da cidade, serviriam de amplificadores da infecção para outros cães e para os humanos.

No Brasil são implicadas como os principais reservatórios selvagens da *L. (L.) i. chagasi* em áreas não urbanas, os marsupiais do gênero *Didelphis*, encontrados infectados na Bahia e no Rio de Janeiro e duas espécies de raposas: *Lycalopex vetulus* no Ceará, e *Cerdocyon thous* no Pará, no Mato Grosso e em Minas Gerais, o fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos, isso poderia promover a ligação entre os ciclos silvestres e domésticos (LUPPI et al., 2008; SILVA, 2007; BRASIL, 2006; GONTIJO e MELO, 2004).

A participação de outras espécies de animais domésticos, como galinha, bovino, equino, caprino, ovino, suíno e gatos, assim também de outros animais selvagens, como roedores, gambás, tamanduás, tatus, primatas e preguiças, parece estar associada à capacidade de atração dos vetores ao peridomicílio ou atuação como reservatórios do parasita, em áreas onde a doença é comum em cães (COELHO et al, 2011; BARBOZA et al., 2006).

1.2.4.3 Vias de Transmissão

Embora na leishmaniose visceral canina a transmissão natural ocorra pela picada de flebotomíneos; carrapatos e pulgas tem sido objeto de estudo, como também outros modos de transmissão secundários são relatados na literatura, transfusão de sangue, transplacentária e venérea, entretanto, a relevância de todos esses meios alternativos de transmissão sem intervenção de um flebótomo ainda não está completamente esclarecida (BANETH, 2010; DANTAS-TORRES, 2009; COUTINHO et al., 2005).

Os cães são considerados a parte mais vulnerável na transmissão de *L. (L.) i. chagasi*, o principal modo de transmissão de cão para cão é reconhecido como sendo marcadamente dependente do vetor invertebrado, que ocorre principalmente pela ação hematófaga de flebotomíneos infectados pertencentes a espécie *Lu. longipalpis*, na ausência dessa espécie, em algumas áreas onde casos de leishmaniose visceral canina foram relatados, o envolvimento de outras espécies de flebotomíneos são sugeridos (DANTAS-TORRES, 2009; BRASIL, 2006; BARATA et al., 2004).

A transmissão pode ser possivelmente garantida por outros ectoparasitas do cão, particularmente a pulga *Ctenocephalides felis felis* e o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Estudos recentes permitiram constatar que a infecção pode ocorrer após a ingestão de sangue de cães infectados com o protozoário, tendo sido possível verificarem que a inoculação, por via oral ou intraperitoneal, de homogeneizados destes ectoparasitas conduz à infecção em roedores, contudo, apesar destes resultados sugerirem que a ingestão de carrapatos e pulgas

infectadas pode ser uma via alternativa de transmissão de *Leishmania* para os cães. Ainda não foi comprovada a sua competência vetorial e o seu verdadeiro papel na epidemiologia da Leishmaniose visceral canina (DANTAS-TORRES et al., 2010; COUTINHO e LINARDI, 2007).

A transmissão de *L. (L.) i. chagasi* por meio de transfusão sanguínea, que é uma prática comum e importante no exercício da clínica e geralmente usada em situações de emergência, foi demonstrada experimentalmente em cães, como também através de sangues provenientes de bancos de sangue documentada em cães da América do Norte, sendo que as formas amastigotas presentes nas células mononucleares são transmitidas para o animal receptor e conservam o seu potencial infectante, a manifestação da doença adquirida por transfusão sanguínea depende, tal como na infecção natural, do estabelecimento de um equilíbrio entre o parasita e as defesas imunológica e genética do hospedeiro (FREITAS et al., 2006).

Embora seja pouco frequente, a transmissão transplacentária é possível, já foi descrita a partir de cadelas grávidas infectadas transmitindo aos seus fetos durante o período de gestação e, tem sido estudada em laboratório, experimentalmente, utilizando ratos como modelo (SILVA et al., 2009b; ROSYPAL e LINDSAY, 2005).

A possibilidade de que a transmissão venérea pode ocorrer na ausência do vetor invertebrado, foi sugerida a partir da detecção de DNA de *Leishmania* spp. em lesões dos órgãos genitais e sêmen de cães naturalmente infectados, pois o parasita tem tropismo pelo aparelho genital masculino, nomeadamente epidídimo, prepúcio e glândulas penianas resultando na inflamação deste órgão, e que ao contrário das fêmeas, não foram observadas quaisquer tipos de lesões no seu aparelho genital, concluindo que a transmissão venérea é unidirecional, isto é, de machos infectados para fêmeas susceptíveis (DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2009a). Paz et al. (2010) referem que de todos os modos de transmissão secundários até o momento relatados, só a transmissão direta no cão, através do coito, foi comprovada.

1.2.4.4 Evolução

O ciclo biológico da espécie *L. (L.) i. chagasi* é complexo, pois se trata de um parasita difásico. Especificamente, completa o seu ciclo de vida em duas fases, necessitando de dois hospedeiros: a fase extracelular no vetor flebotomíneo, da espécie *Lu. longipalpis* e a fase intracelular no reservatório canino. Os parasitas apresentam-se em duas formas morfológicas as amastigotas e as promastigotas, que são encontradas nos cães e nos flebotomíneos, respectivamente (ZAVITSANOU et al., 2008).

Nos cães, os flebotomíneos se alimentam principalmente em áreas de pele com pouco pelo que facilita a ingestão de sangue, como o focinho, as orelhas, região periocular e regiões inguinal e perianal (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Na fase intracelular, formas amastigotas, que são esféricas e sem flagelo livre, parasitam o interior de células do SMF, principalmente macrófagos do cão. Durante o repasto sanguíneo em um cão infectado, a fêmea do flebotomíneo ao sugar o sangue vai ingerir macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo anterior do flebotomíneo ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas, que se reproduzem por divisão binária e se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (BANETH, 2010; ZAVITSANOU et al., 2008; BRASIL, 2006).

Na fase extracelular, as fêmeas do flebotomíneo infectadas ao realizarem um novo repasto sanguíneo, introduzem os seus aparelhos bucais na pele do cão e o conteúdo das glândulas salivares é inoculado juntamente com as formas promastigotas metacíclicas, que são longas, flageladas e extracelulares. Uma vez que o parasita tem acesso à epiderme do cão, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente por divisão binária ocupando todo o citoplasma. Esse processo determina o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo. Deste modo, o protozoário não fica confinado na pele, sendo transportado, através do sangue e linfa, o que permite a sua disseminação por todo o organismo do cão, mas, principalmente, até aos órgãos do sistema hemolinfático como o fígado, o baço, a medula óssea e os linfonodos. O parasita, ao estar presente na circulação sistêmica, pode ser ingerido novamente pelos flebótomos durante o repasto sanguíneo (BANETH, 2010; ZAVITSANOU et al., 2008; BRASIL, 2006).

1.2.4.5 Prevalência e Fatores de Riscos

A Leishmaniose visceral canina é uma zoonose endêmica em mais de 88 países e é de extrema importância em Medicina Veterinária e Saúde Pública, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Estima-se através de estudos epidemiológicos que a soroprevalência da LVC é alta na América do Sul, principalmente no Brasil, onde milhões de cães estão infectados pelo intenso

parasitismo cutâneo, tanto em animais soropositivos assintomáticos, como sintomáticos, contribuindo assim para a propagação da doença (CALABRESE et al., 2010; MOSHFE et al., 2009; BANETH, 2010). E, segundo Bouerdau (2009) a prevalência também se torna altamente dependente das condições ecológicas e climáticas, pela abundância de vetores.

No Brasil, durante muito tempo, a leishmaniose canina foi considerada uma doença limitada às áreas rurais, porém hoje em dia, a doença é bem instalada em grandes áreas urbanizadas, considerando que muitos fatores podem favorecer a propagação de leishmaniose canina, incluindo a circulação de cães entre áreas endêmicas e não endêmicas e mudanças na ecologia do vetor *Lutzomyia longipalpis*, que se adapta muito bem em ambientes modificados pelo homem (DANTAS-TORRES, 2009).

Atualmente, este novo cenário epidemiológico está se estabelecendo cada vez mais e, a doença vem se disseminando em áreas urbanas. Essa mudança no padrão de transmissão da doença deve-se principalmente à urbanização do vetor, à participação do cão como reservatório doméstico da *L. (L.) i. chagasi* e à degradação ambiental, com a destruição constante dos habitats naturais dos vetores e reservatórios, juntamente com o processo migratório da população para os grandes centros urbanos. Os programas de vigilância e controle da doença preconizam a realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), visando conhecer a situação epidemiológica da doença nas áreas com transmissão ativa ou com potencial de transmissão; além do controle do reservatório canino em extensas áreas, tendo um papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária (LAURENTI, 2009; COSTA-VAL et al., 2007; JULIÃO et al., 2007).

Dantas-Torres (2009) refere que vários estudos tentam avaliar os fatores de risco associados à infecção em cães no Brasil. Com relação ao sexo, em algumas áreas, existe uma maior prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* entre os machos quando comparado com as fêmeas, mas em outras não há associação entre sexo e soropositividade. Quanto à faixa etária, em algumas áreas, há uma maior soroprevalência em cães jovens (<1 ano), enquanto que em outras áreas cães mais velhos (1-6 anos) estão em maior risco de infecção, considerando que esta desigualdade aparente entre os estudos pode refletir a natureza local da leishmaniose canina. Assim sendo, este autor classifica como um importante fator de risco o estilo de vida do cão, pois, os cães de guarda que são mantidos fora de casa durante toda a noite estão mais expostos aos flebotomíneos e, portanto, estão em maior risco de infecção, em comparação com os cães de companhia que são mantidos dentro das casas. Enquanto que os cães que

vivem em áreas rurais são mais susceptíveis à infecção, pois, os flebotomíneos podem ser encontrados dentro das casas, em abrigos de animais e em áreas florestais. Outro fator que deve ser investigado é o estado nutricional dos cães e a susceptibilidade à infecção, que é um fator de risco conhecido para a leishmaniose visceral humana.

A prevalência global da leishmaniose visceral canina é difícil de calcular devido à quantidade limitada de dados publicados de alguns países, como a existência de diferenças metodológicas entre os estudos (por exemplo, tamanho da amostra e critérios de positividade) e as limitações inerentes de sorologia (por exemplo, a possibilidade de reações cruzadas). A maioria das informações sobre a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em cães são de inquéritos sorológicos realizados em diferentes regiões do Brasil, e cujos resultados variam de acordo com as características da população, bem como a metodologia empregada na avaliação, além dos fatores de riscos associados à infecção como sexo, faixa etária, raça, tamanho e tipo do pelame, estado geral, sintomatologia clínica e condições do peridomicílio onde a maior incidência parece estar associada a moradias próximas de matas e a convivência com outros animais domésticos e selvagens (DANTAS-TORRES, 2009; SILVA, et al., 2009c; AZEVEDO et al., 2008; BORASCHI e NUNES, 2007).

1.2.4.6 Prevalência no Brasil, de acordo com o diagnóstico sorológico, pelos métodos ELISA e RIFI

Estudos sobre a soroprevalência da infecção em cães é alta em áreas endêmicas, podendo afetar de 20 a 40% da população canina, porém a prevalência da doença clínica ocorre entre 3 e 10%, demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sintomas, o que dificulta o diagnóstico (GOMES, et al., 2008; BORASCHI e NUNES, 2007).

No Pará, Cardoso (2009) trabalhou selecionando duas comunidades no município de Juruti, Santa Maria, localizada na área periurbana com 28 cães e Capiiranga, localizada na área rural com 25 cães, a frequência de positivos na sorologia com o ELISA antígeno bruto com lisado de promastigotas e com os recombinantes (ELISA Hsp83 e ELISA rK39) foi inferior a 45% em cães das duas localidades.

Os dados fornecidos pela Secretaria do Estado de Saúde Pública do Pará referente aos municípios que se encontram em áreas consideradas endêmicas ou de risco e que encaminharam amostras de soro de cães para realização de exames sorológicos (ELISA e RIFI) para leishmaniose visceral canina, no LACEN-PA, nos anos de 2007 e 2008, foram tabulados por Feitosa (2009) e os resultados revelaram que a soropositividade nos municípios

do estado do Pará em 2007 foi de 11% e em 2008 foi de 18,3%, com um índice de positividade inferior a 20% apresentada na maioria dos municípios.

No estudo realizado por Jesus et al. (2011) na localidade Santa Maria, município de Barcarena, foram avaliados 320 cães e, os resultados mostraram prevalência de 37,5% (120/320) pela RIFI e 26,2% (84/320) por ELISA.

A frequência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. foi determinada por Schwanke et al. (2012) em 335 cães do município de Belém, através do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de IgG utilizando-se dois antígenos, antígeno do kit Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (ag-PRO) contendo formas promastigotas de *Leishmania* sp. e antígeno do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (ag-AMA) constituído por formas amastigotas de *L. infantum chagasi*. Das amostras analisadas, 9,8% (33/335) foram reagentes na IFI ag-PRO e 0,9% (3/335) reagiram na IFI ag-AMA.

Anticorpos contra *L. infantum chagasi* foram detectados por Damasceno et al. (2012) em 267 cães domiciliados nas comunidades rurais do município de São Domingos do Capim, classificado como área de transmissão intensa para o agente da LV em humanos. As análises sorológicas foram realizadas através de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 44,57% (119/267) dos cães foram reagentes.

Em Tocantins, Santos (2008) com o objetivo de conhecer a soroprevalência da LVC na zona urbana do município Piraquê, 140 amostras de sangue da população canina foram analisadas e a positividade obtida utilizando os testes ELISA e RIFI, foi de 35,5%. Santos et al. (2012) utilizaram em 90 amostras de sangue a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para o diagnóstico sorológico da frequência de positividade para *Leishmania* spp. em cães domiciliados no município de Araguaína, foram positivas 48 (59,3%) amostras.

Em Rondônia, no município de Monte Negro, Aguiar et al. (2010) utilizaram os testes de ELISA e RIFI na avaliação de 161 amostras de soro de cães da zona rural do município, dos quais quarenta e cinco cães (27,9%) reagiram no teste de ELISA e cinco (3,1%) na RIFI.

No Amapá, Cardoso et al. (2011) realizaram um levantamento do número de amostras positivas para LVC recebidas para diagnóstico no LACEN, no período de 2008 a 2010, 60 amostras sorológicas de cães com suspeita de LVC foram avaliadas, 02 (duas) foram reativas aos testes sorológicos de ELISA e RIFI.

Em Pernambuco, no município de Itamaracá, Santos (2006) reavaliou a situação da LVC neste município. Amostras de sangue foram coletadas de 199 cães domiciliados, de raça, sexo e idades variadas e analisadas pelo teste de imunoabsorção enzimática (ELISA), desses 4,5% (09/199) apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* major-like.

Na cidade de Paulista, região metropolitana do Recife, Dantas-Torres (2006c) analisou 322 amostras através da RIFI, 130 apresentaram-se positivas para a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp., o que corresponde a uma soroprevalência de 40,3%.

Com o objetivo de relatar as características clínicas dos cães com diagnóstico positivo de LVC, Albuquerque et al. (2007) analisaram 142 cães domiciliados na região metropolitana do Recife, 17,60% (25/142) apresentaram um ou mais sinais sugestivos da doença e foram submetidos a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* através do ELISA, dos quais 64% (16/25) dos animais apresentaram-se positivos.

Avaliando a prevalência no município de Tamandaré pelo ELISA, Barbosa (2010) revelou que dos 299 cães, 61 (20,4%) apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* chagasi.

Amostras provenientes do município de Petrolina foram analisadas por Santana et al. (2010), do total de 595, 115 (19,33%) apresentaram-se positivas ao teste ELISA.

No município de Garanhuns, Santos et al. (2010) com o objetivo de conhecerem a prevalência testaram 256 amostras de soros de cães pela RIFI e 41 (16%) foram positivas.

Na cidade de Araripina, Oliveira (2011) obteve 566 soros sanguíneos, oitenta e quatro reagiram positivamente através da RIFI, correspondendo a uma prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. de aproximadamente 10,25%.

A infecção por *Leishmania infantum* em caninos domésticos de Serrambi - município de Ipojuca, situado no litoral Sul e do município de Igarassu, região metropolitana Norte do Recife, foi detectada por Marques et al. (2012) quando utilizaram a Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos IgG anti-*L. infantum*, que das amostras analisadas foi constatada 57,14% (56/98) de positividade na área de Serrambi e 37,50% (12/32) em Igarassu.

No Rio Grande do Norte, na cidade de Mossoró, Amóra et al. (2006) avaliaram 198 cães pelo ELISA e RIFI. Dos 62 animais da zona rural, 45% foram positivos e dos 136 da zona urbana, 35% foram positivos. Um estudo de prevalência foi realizado por Matos et al. (2006) em 139 cães com sintomatologia clínica sugestiva de leishmaniose visceral atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), desses 39 (28%) foram positivos no ELISA e entre estes 58% estavam na faixa etária de 3 anos e eram provenientes da zona urbana da cidade de Mossoró.

Na Bahia, em Feira de Santana, a prevalência encontrada por Oliveira e Araújo (2003) foi de 0,6% na IFI. Em Camaçari, Julião et al. (2007) encontraram a prevalência de 21,7% no ELISA.

Em um inquérito sorológico realizado por Barboza et al. (2009) nos distritos de Itapuã, Cajazeiras e Pau da Lima, pertencentes ao município de Salvador, dos 811 cães analisados apenas 6 (0,7%) foram soropositivos no ELISA e RIFI.

Um estudo investigatório foi realizado por Silva et al. (2010) no distrito de Monte Gordo, localizado no município de Camaçari, situado na Região Metropolitana de Salvador. Foram avaliados 358 cães, o teste de ELISA identificou que 53 cães apresentaram positividade de anticorpos anti-Leishmania, representando uma soroprevalência de 14,8%.

No Maranhão, a prevalência da infecção canina foi registrada no município de São José de Ribamar por Guimarães et al. (2005), variando de 21 até 25% através do ELISA e RIFI.

Em São Luis, Abreu-Silva et al. (2008) analisaram 62 cães, 33 (51,61%) foram positivos na RIFI, sendo que 18 (36,68%) eram polissintomáticos, 9 (38,41%) oligossintomáticos e 6 (26,13%) assintomáticos.

Em São José de Ribamar, Dias et al. (2008) realizaram soroprevalência em 76 cães domiciliados e desses 28 (36,84%) foram positivos utilizando RIFI para o diagnóstico sorológico.

Em três vilas no município de Raposa, a soroprevalência foi realizada por Felipe (2009). Dos 138 cães, 66 (47,8%) apresentaram resultados positivos pela RIFI.

A soroprevalência de *Leishmania* spp. em cães de cinco localidades no Distrito do Tirirical no município de São Luís foi determinada por Barbosa et al. (2010), a análise da RIFI demonstrou que das 100 amostras avaliadas, 67 (67%) apresentaram-se positivas.

No Ceará, em Fortaleza, Rondon (2007) analisou duas populações de cães, os domiciliados oriundos da Unidade Hospitalar Veterinária da Universidade Estadual do Ceará e os de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses e encontrou 26,2% (197/750) de positividade nos domiciliados e 21,4% (135/631) nos de rua, utilizando para o diagnóstico o ELISA, com antígenos brutos solúveis *L. chagasi*.

Para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina de acordo com as suas formas clínicas, Queiroz Júnior (2011) detectou a presença de anticorpos anti-Leishmania através dos testes de IFI[®] e EIE[®] em 103 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses, Unidade Hospitalar Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará e de clínicas particulares na cidade de Fortaleza. A positividade foi de 79,6% (82/103) na IFI, variando com as formas clínicas, assintomáticos 71,4% (25/35), oligossintomáticos 67,7% (21/31) e sintomáticos 97,2% (36/37) e, no ELISA foi de 39,8% (41/103), também com variações, assintomáticos 2,8% (1/35), oligossintomáticos 25,85% (8/31) e sintomáticos 86,4% (32/37).

Na Paraíba, Vidal (2008) com o propósito de estimar a prevalência da LVC no município de Campina Grande, utilizou 500 amostras de soro de cães domiciliados que foram analisados pelo ELISA, 3% (15/500) foram positivos.

Em Alagoas, com o objetivo de calcular a prevalência em 425 cães domiciliados, provenientes da cidade de Maceió, Martins (2008) obteve 1,95% (08/425) de positividade através do teste ELISA.

Em Mato Grosso, Mestre e Fontes (2007) identificaram a doença em 41 municípios, com soropositividade de 9% em 40.000 cães examinados pelo ELISA e RIFI.

Na cidade Poxoréo, Azevedo et al. (2008) obtiveram a prevalência de 7,8% em 1.112 cães domiciliados.

Em uma avaliação epidemiológica realizada por Almeida et al. (2009), dos 468 cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá, 16 (3,4%) foram positivos no RIFI.

Novamente na cidade de Cuiabá, Almeida et al. (2010) pesquisaram 150 cães com suspeita clínica de LV, atendidos no Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, 56 (37,3%) sororeagentes a RIFI foram confirmados.

Um inquérito sorológico canino foi realizado por Carneiro e Tocantins (2011) com o objetivo de avaliar a ocorrência da LVC em dois bairros com condições socioeconômicas e ambientais distintas no município de Mirassol D'Oeste, através do ELISA e RIFI. A sorologia para os cães reagentes no bairro I foi de 8 (21,05%), dos 38 animais e no bairro II o número de cães reagentes correspondeu a 7 (18,42%), dos 38 animais.

Em Goiás, para a realização de um estudo na cidade de Goiânia, Azevedo et al. (2011) analisaram 214 cães, sendo 174 animais errantes capturados e mantidos no CCZ de Goiânia e 40 atendidos para consulta no HV/UFG, 20 (9,3%) mostraram-se positivos a RIFI.

Em Minas Gerais, França-Silva et al. (2003) observaram em Montes Claros o índice de positividade em 9,7% dos cães pela RIFI.

Também no município de Montes Claros, Monteiro et al. (2005) realizaram inquérito canino censitário, onde foram analisados todos os cães domiciliados em dez bairros da área urbana, sendo 4.795 animais examinados, dos quais 236 foram positivos para LVC, através da RIFI. A prevalência se distribuiu de forma variada nos bairros estudados, ficando em torno de 5% a taxa média de infecção do município.

No período de março de 1999 a maio de 2001, Silva e Santa-Rosa (2005) realizaram um levantamento de leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso, o ensaio detectou 22 cães reagentes à RIFI para *Leishmania* em 734 cães investigados.

A prevalência global de 1,4% da LVC no município de Pedro Leopoldo foi determinada através do ELISA e RIFI por Naveda et al. (2006).

No município de Varzelândia, Gomes (2007) realizou um estudo visando esclarecer a situação da Leishmaniose Visceral Canina, foram coletadas amostras sanguíneas de 571 cães distribuídos em 12 localidades do município, a prevalência encontrada foi de 10,86% no município, 14,33% em área rural e 6,4% nos conglomerados especiais, a sorologia utilizada foi o ELISA e IFI.

Em um inquérito epidemiológico realizado por Silva et al. (2008) no município Brumadinho, em 772 cães testados pela RIFI, a prevalência da LVC foi de 22,2% na localidade do Inhotim, 11,0%, em Piedade do Paraopeba, 12,3%, em São Conrado, 8,0% em Casa Branca e 8,5% na Cohab.

No Rio de Janeiro, em Barra do Guaratiba, durante os anos de 1995 a 1997, Cabrera et al., (2003) analisaram 365 soros de cães, 29% reagiram a Leishmaniose Visceral Canina pela técnica de RIFI, enquanto que Silva et al. (2005) observaram durante o período de 2001 a 2002, prevalência superior a 25% na RIFI neste mesmo município.

Com o objetivo de investigarem a situação sorológica desta zoonose no município de Campos dos Goytacazes, no período de dezembro de 2000 a dezembro de 2001, Távora et al. (2007) selecionaram 370 cães errantes, 6 (1,6%) foram positivos nos testes RIFI e ELISA.

Uma avaliação sorológica foi realizada por Figueiredo et al. (2009) em 177 cães (68 machos e 109 fêmeas) para detecção de anticorpos anti-Leishmania no bairro de Santa Rita de Cássia situado no município de Barra Mansa, região rural do estado, dos soros caninos testados pela técnica de IFI, 10% apresentaram reatividade sorológica e pelo teste de ELISA, 10,7% foram sororreatores.

Na região de Carapiá, Guaratiba, Figueiredo et al. (2010) investigaram a presença de anticorpos IgG anti-Leishmania através do IFAT e ELISA, em 305 amostras de soro de cães, dois critérios para interpretação dos resultados foram utilizados no IFAT, onde consideraram as amostras positivas nas diluições de 1:40 e 1:80 ou superiores, 111 (36,4%) foram positivas no IFAT (1:40), 58 (19%) no IFAT (1:80) e 19 (6,2%) no ELISA.

Em São Paulo, Camargo (2008) utilizou para realização de um estudo amostras de sangue de 100 cães capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Bauru, região endêmica, 82 (82%) foram reagentes na RIFI, 80 (80%) positivos no ELISA; porém das 100 amostras de sangue de cães recolhidos pela equipe do canil municipal de Botucatu, área não endêmica para a enfermidade, todas foram negativas ao RIFI, somente um

cão (1%) foi reagente ao ELISA, que se apresentou muito próximo ao ponto de corte estabelecido para reação.

No município de Ilha Solteira, Assis et al. (2010) utilizaram 34 cães com diferentes sintomas da LVC, classificados em polissintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos, os índices de positividade para os testes ELISA e RIFI foram de 65,0% e 56,0% respectivamente, sendo a maior positividade detectada nos cães polissintomáticos (92,0%), seguida pelos oligossintomáticos (57,0%) e assintomáticos (12,5%).

A ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania infantum syn chagasi* foi determinada por De Nardo et al. (2011) em amostras de soro de 584 cães de São José do Rio Preto, área não endêmica para a doença, cinco cães (0,86%) foram sororeagentes pela técnica de ELISA, a reação de imunofluorescência indireta foi realizada em 138 animais que possuíram densidades ópticas acima ou próximas ao ponto de corte do ELISA e evidenciou dois cães (1,45%) com títulos acima de 1:40.

No Paraná, Thomaz-Soccol et al. (2009) pesquisaram a ocorrência de leishmaniose visceral em cães com sinais clínicos compatíveis, procedentes de clínicas veterinárias das diferentes regiões do estado, encontraram 92%, dos 24 animais analisados, com sorologia positiva nas técnicas RIFI e ELISA.

Com o objetivo de determinarem a soroprevalência da LVC em cães enviados para eutanásia ao Centro de Controle de Zoonoses de São José dos Pinhais, Frehse et al. (2010) antes da eutanásia coletaram amostras de sangue de 364 animais para a detecção da presença de anticorpos contra *Leishmania sp.* através do ELISA e da RIFI, somente uma amostra foi positiva (0,0027%), reagente ao ELISA e negativa à RIFI, entretanto, o cão não apresentava sinais clínicos e era proveniente do distrito de Afonso Pena.

1.2.5 Resposta Imune

Nem todos os cães infectados por *L. (L.) i. chagasi* após a inoculação na derme, desenvolvem a doença. As respostas imunes iniciadas pelos cães no momento da infecção parece ser um dos fatores determinantes no desenvolvimento dessa infecção e na sua progressão de um estado assintomático para um estado sintomático. Considerando que os cães capazes de eliminar o parasita, resistir ou restringir a infecção, permanecendo constantemente assintomáticos, serão denominados "cl clinicamente resistentes", enquanto que os cães predispostos ao desenvolvimento da infecção e da doença sintomática serão considerados "susceptíveis" (BANETH, 2010).

O grau de severidade clínica e a evolução da doença estão relacionados ao equilíbrio das respostas imune celular e humoral no cão infectado, durante a infecção parasitária, o sistema imune controla tanto o número de parasitas presentes no organismo quanto à resistência à reinfeção, mas também pode induzir a doença associada ao parasitismo (MACHADO et al., 2007).

A resistência contra o parasita está associada com o desenvolvimento da proteção celular imunomediada, com baixos níveis ou ausência de anticorpos anti-Leishmania, enquanto que a susceptibilidade está associada com níveis elevados desses anticorpos (SILVA, 2007).

As células T desempenham papel muito importante, tanto diretamente por mediar respostas celulares, quanto indiretamente, na regulação e produção de anticorpos produzidos por plasmócitos que derivam de linfócitos B. A resistência à infecção (animais assintomáticos) dependerá da resposta Th1, a qual está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (INF- γ), o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 2 (IL-2 e IL-12), além de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Por outro lado, a ocorrência de lesões sistêmicas está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e a evolução da doença. O surgimento dos sinais clínicos em cães susceptíveis (sintomáticos) deve-se a capacidade de desenvolver uma resposta do tipo Th2, com proliferação de linfócitos B e das citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 10 (IL-10), que vão promover uma plasmocitose. Essa resposta leva a uma hipergamaglobulinemia, que contribui para a formação de imunocomplexos e, conseqüentemente leva a uma resposta humoral ineficiente para eliminar o parasita (IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007; BARBIÉRI, 2006).

Na leishmaniose visceral canina, as subclasses de IgG anti-Leishmania, IgG1 e IgG2, têm sido utilizadas como indicadores da evolução da doença como também do prognóstico, podendo isso caracterizar o padrão da resposta imune nos cães infectados, geralmente os altos títulos de anticorpos IgG1 anti-Leishmania estão associados a doença, enquanto os anticorpos IgG2 a uma infecção assintomática (MACHADO et al., 2007; SILVA, 2007).

1.2.6 Alterações Clínicas

A LVC é uma doença complexa, sistêmica, crônica e até mesmo fatal, caracterizada por alterações clínicas muito variáveis, envolvendo quase todos os órgãos, em consequência da multiplicidade de mecanismos patogênicos do protozoário, da diversidade de respostas

imunológicas desenvolvidas nos hospedeiros e do longo período de incubação, que pode variar de alguns meses até vários anos. A complexidade da doença faz com que, ainda hoje, mais de cem anos após sua descoberta, não haja completo consenso científico sobre o seu manejo (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BANETH et al., 2008).

Infecções de *L. (L.) i. chagasi*, em cães constituem um espectro em que a doença sintomática ou clínica representa um extremo e a infecção assintomática ou subclínica um outro extremo, visto que a resistência contra o parasita está associada com o desenvolvimento da proteção celular imunomediada, enquanto que a susceptibilidade está associada com níveis elevados de anticorpos. No entanto, mais de 50% dos cães soropositivos não desenvolvem sinais clínicos, permanecendo assintomáticos durante períodos de tempo variáveis e às vezes por toda a vida, que é uma característica importante, pois esses cães representam grande problema para a saúde pública, o que impossibilita a adoção de medidas adequadas de controle (SALZO, 2008; CARDOSO et al., 2007; MACHADO et al., 2007; REIS et al., 2006).

Mancianti et al. (1988), mediante exame clínico, classificaram os cães com LV em: assintomáticos, que não apresentam sinais e nem sintomas sugestivos de infecção; oligossintomáticos, nos quais se encontram apenas alguns sinais clínicos da doença, como linfadenopatia discreta, perda de peso e/ou pelo opaco e sintomáticos, onde todos ou alguns sinais graves da doença são evidentes. Ferrer (1999) refere que os cães com LVC geralmente apresentam-se com uma ou mais das nove principais alterações clínicas, como lesões da pele, perda de peso ou do apetite, linfadenopatia local ou generalizada, lesões oculares, epistaxes, claudicação, anemia, insuficiência renal e diarreia.

1.2.6.1 Alterações dermatológicas

As lesões dérmicas não são dependentes da resposta inflamatória a presença de *Leishmania* no local, pele clinicamente normal, também pode abrigar um grande número de parasitas e uma carga similar de *Leishmania* é encontrada na pele com lesões macroscópicas em comparação com o aspecto normal da pele de cães sintomáticos. A ferida inoculada é um nódulo simples ou múltiplo, periférico, eritematoso e achatado, ocasionalmente ulcerado na extremidade e, situa-se geralmente na face interna do nariz e das pinas da orelha (BOURDEAU, 2009; BANETH et al., 2008).

A diversidade de sinais dermatológicos é a alteração mais comum da LVC e as lesões de pele podem ser observadas sozinhas ou associadas com outros sinais clínicos e/ou anormalidades clínico-patológicas. Classicamente, as apresentações altamente sugestivas são:

dermatite não pruriginosa chamada "Dermatite esfoliativa" com ou sem alopecia localizada sobre a face (periocular e focinho), orelhas e membros ou generalizada; úlceras nas proeminências ósseas, junções muco cutâneas, patas, coxins e pinas da orelha; nódulos únicos ou múltiplos não dolorosos; dermatite proliferativa muco cutânea e dermatite papular. Outras manifestações cutâneas são onicogribose, despigmentação, paniculite, hiperqueratose digital e nasal; alopecia areata, semelhante ao pêfigo foliáceo de apresentação multiforme ou eritema são incomuns; pioderma estafilocócico, superficial ou profundo, como complicação, não é raro (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BOURDEAU, 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; BANETH et al., 2008).

1.1.6.2 Alterações dos Órgãos do Sistema Mononuclear Fagocitário

O aumento acentuado dos linfonodos é causado por um aumento no número e tamanho dos folículos linfoides e a marcada hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos da região medular do órgão. A carga parasitária nos gânglios linfáticos frequentemente não está correlacionada com o tipo e gravidade das lesões em outros órgãos (LIMA et al., 2004).

A esplenomegalia está associada com o aumento da celularidade dos monócitos e macrófagos e as alterações na estrutura da microvasculatura de veias e vênulas e aumento de fibras reticulares (SANTANA et al., 2008).

Os parasitas podem provocar lesões hepáticas, induzindo alterações na morfologia dos hepatócitos e conseqüentemente no metabolismo do órgão. A lesão hepática característica é a hepatite crônica proliferativa, em fases mais avançadas. Estes fenômenos proliferativos agravam-se, e a infiltração celular já instalada torna-se excessiva e difusa com formação de granulomas, levando ao aumento das enzimas hepáticas e, à manifestação de sintomatologia expressa por vômito, perda de peso, poliúria e polidipsia, ascite, entre outros. Geralmente só se observa lesão hepática evidente nas fases terminais da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; ALVAR et al., 2004).

1.2.6.3 Alterações Gerais

A maioria dos cães apresenta má condição corporal, com perda de peso que pode ocorrer mesmo que o apetite se mantenha podendo evoluir para o estado de caquexia, resultante do comprometimento renal, que é geralmente acompanhado de poliúria, polidipsia, vômito e diarreia (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MAIA e CAMPINO, 2008).

Os rins são afetados praticamente em todos os cães infectados e poliúria-polidipsia é um sinal frequente. A doença renal pode ser a única anormalidade aparente, podendo progredir de

proteinúria assintomática à síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica, com nefrite tubulointersticial, glomerulonefrite e amiloidose, frequentemente está associada à deposição renal de imunocomplexos. A disfunção renal pode proceder qualquer outro sinal clínico e azotemia, com o aumento sérico da creatinina e ureia, típico da insuficiência renal é evidente apenas quando a maioria dos nefróns é afetada, o que ocorre tardiamente durante a progressão da doença (SOLANO-GALLEGÓ et al., 2009).

A diarreia independentemente de ser originada a partir do intestino delgado ou grosso, foi incluída entre os sinais de LVC. A ocorrência tem sido quase sempre associada à insuficiência renal ou hepática crônica que pode desenvolver-se no curso da doença, porém a diarreia do intestino delgado tem sido atribuída à infiltração da mucosa intestinal pelas células parasitadas ou a caquexia. Anormalidades do intestino grosso são mais comuns do que se pensava (parasitas já foram obtidos em biópsias da mucosa intestinal por colonoscopia) resultante de uma colite ulcerativa crônica (ADAMAMA-MORAITOU et al., 2007).

As lesões musculoesqueléticas frequentemente estão presentes em cães infectados, apesar de leishmaniose ser raramente detectada como causa de claudicação. A poliartrite erosiva e não erosiva foram observadas no líquido sinovial com formas amastigotas de *Leishmania*, detectadas por microscopia. Os ossos geralmente têm lesões proliferativas periosteal e intramedular com frequente osteólise da cortical e medular. A atrofia muscular progressiva está associada não somente à doença em geral, mas também a uma polimiosite imunomediada crônica caracterizada pela presença de infiltrados mononucleares com formas amastigotas de *Leishmania*, vasculite neutrofílica, depósito de complexos antígeno-anticorpo no tecido muscular em conjunto com anticorpos anti-miofibras (BOURDEAU, 2009; BANETH et al., 2008; VAMVAKIDIS et al., 2000).

As lesões oculares podem ser uni ou bilaterais e localizam-se frequentemente no segmento anterior, consistem de uveíte, ceratoconjuntivite seca, conjuntivite, blefarite ou uma combinação destas, na ceratoconjuntivite seca, infiltrados inflamatórios localizados em torno dos canais lacrimais podem causar retenção da secreção e diminuição da produção de lágrimas (BRITO et al., 2006).

Os distúrbios hemostáticos como epistaxe, diarreia hemorrágica ou mesmo hematúria estão associados à ulceração da mucosa e alterações na hemostasia, incluindo anormalidades na agregação plaquetária, levando a trombocitopenia, que diminui a atividade do fator de coagulação e fibrinólise. A epistaxe profusa pode aparecer como o único sinal de apresentação da doença e pode ser uma causa de morte por perda de sangue incontrollável, o mecanismo subjacente envolve rinite piogranulomatosa ou mononuclear, (com ou sem

ulceração), trombocitopenia e hiperglobulinemia. A anemia está presente na maioria dos cães sintomáticos devido a insuficiência renal crônica ou diminuição da eritropoiese pela doença crônica, agravada por perda de sangue ou imunomediada pela destruição de eritrócitos (BOURDEAU, 2009; BANETH et al., 2008; CORTESE et al., 2006).

Considerando que as principais alterações da LVC são em órgãos ricos de células pertencentes ao SMF, tais como o linfonodos, baço, fígado e medula óssea, no entanto, a disseminação do parasita também ocorre em outros órgãos que não pertencem a este sistema, por exemplo, o coração e os pulmões, sendo que o comprometimento desses órgãos ainda permanece com alterações clínico-patológicas desconhecidas. Têm sido relatadas no coração, alterações no ritmo cardíaco, poliarterite necrosante, granulomas e miocardite não supurativa, como alterações respiratórias incluem dispneia, rinite, corrimento nasal muco catarral, epistaxe, estertores e pneumonite intersticial crônica (ALVES et al., 2010).

1.2.7 Diagnóstico

A LVC é uma doença na qual a infecção não é igual à doença clínica, devido à elevada prevalência de infecção assintomática. Isso faz com que o diagnóstico se torne um desafio para o clínico veterinário, patologista clínico e serviços de saúde pública e deve-se principalmente a três fatores: sintomas clínicos variáveis da doença comuns a outras enfermidades infecciosas que acometem o cão, alterações histopatológicas inespecíficas, e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (MARTINEZ et al., 2011; BANETH, 2010; BRASIL, 2006).

Segundo Miró et al. (2009) o diagnóstico geralmente é realizado por duas razões principais: (1) confirmar a “doença” em cães com sinais clínicos e/ou anormalidades clínico-patológicas compatível com LVC e (2) investigar a presença de “infecção” para estudos epidemiológicos, em cães que vivem em regiões endêmicas.

O diagnóstico clínico é complexo e representa um dos problemas mais significativos sobre a doença, por apresentar um pleomorfismo extraordinário de sinais clínicos, por esta razão, é importante separar infecção da doença, sendo necessária uma abordagem composta pelo diagnóstico clínico-patológico e exames laboratoriais específicos (BIGELI et al., 2012; PEÑUELA e VALENCIA, 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

História clínica pertinente, exame físico completo e vários exames de rotina, tais como exame hematológico, perfil bioquímico, exame de urina e eletroforese de soro têm sido considerados de valor limitado no diagnóstico da LVC por mostrar resultados inespecíficos,

porém podem ajudar a elevar o índice de suspeita para a doença, se tornando muito importante na avaliação do estado clínico do animal (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2008).

Com relação aos exames específicos utilizados como métodos de diagnóstico laboratorial, Maia e Campino (2008) referem que cada método tem vantagens e desvantagens, com diferentes níveis de sensibilidade, especificidade, custo e facilidade e, que esses parâmetros podem ser necessários na escolha, além do mais Peñuela e Valencia (2009) mencionam que é essencial compreender a base de cada método, suas limitações e suas interpretações clínicas e, consideram ainda que é recomendada a utilização de mais de um método de diagnóstico e, ainda Miró et al. (2009) reforçam que os métodos diagnósticos confiáveis são essenciais para a detecção de infecção por *Leishmania* em cães sintomáticos e assintomáticos.

Os métodos para confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina incluem: parasitológico, principalmente com a microscopia direta para detecção da presença de formas amastigotas do parasito em esfregaços corados das aspirações citológicas dos tecidos, além da cultura para isolamento do parasita a partir de amostras de tecido e a técnica de imunohistoquímica, para a identificação específica do parasita e o sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* ou antígenos específicos, sendo que os mais empregados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Mais recentemente, o molecular com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de DNA de *Leishmania* em amostras de tecido ou sangue (BANETH e AROCH, 2008; MOREIRA et al., 2007).

1.2.7.1 Método Parasitológico

O exame parasitológico direto é o método de diagnóstico para LVC mais antigo que começou a ser utilizado a partir dos anos 30 e permanece ainda como padrão ouro por causa da sua alta especificidade. Consiste na observação direta, através da microscopia, de formas amastigotas do parasita em esfregaços de aspirado de órgãos/tecidos infectados como linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue, que podem ser corados por Giemsa, Leishman ou Panótico. É um método conclusivo, considerado seguro, simples, rápido e pouco traumático, sendo que o parasita também pode ser observado em impressões citológicas realizadas em lesões da mucosa dérmica (LAURENTI, 2009; MIRÓ et al., 2009; PEÑUELA e VALENCIA, 2009). A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende da densidade parasitária, do tipo de material biológico

examinado e do número de campos microscópicos observados, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas, porém no exame de cães sintomáticos a sensibilidade é de aproximadamente 80%, sendo menos sensível em animais assintomáticos (BRASIL, 2006).

1.2.7.2 Método Sorológico

Uma das características da infecção por *L. (L.) i. chagasi* nos cães é a expressiva resposta imune humoral. A detecção de altos níveis de anticorpos específicos anti-*Leishmania* no soro está associado com o parasitismo elevado, indicando exposição à infecção, sendo conclusivo para o diagnóstico de LVC (BANETH e AROCH, 2008; MADEIRA et al., 2009; TASCA et al., 2009). A presença de níveis baixos de anticorpos possivelmente transitórios são detectados em cães que foram expostos, mas necessariamente não indica doença, sendo necessário confirmar ou excluir a leishmaniose por outros métodos diagnósticos, como citológico, histopatológico e PCR (BANETH e AROCH, 2008; MIRÓ et al., 2008).

Sorologia IgG específica para *Leishmania* é normalmente muito sensível, mas os resultados positivos estão relacionados com a infecção, e não necessariamente com a doença, sendo que a soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por pelo menos, dois anos (NUTTAL et al., 2010; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

De acordo com Ikeda-Garcia e Marcondes (2007) o diagnóstico da doença por métodos sorológicos, não deve ser realizado em animais com menos de 3 meses de idade, devido a presença de anticorpos maternos, pois pode resultar em uma sorologia positiva.

Muitos métodos sorológicos estão disponíveis, tais como fixação de complemento, hemaglutinação indireta, aglutinação em látex, aglutinação direta, imunoeletroforese, imunoprecipitação em gel, Western blot, imunofluorescência indireta e ELISA, com diferentes modificações tais como: Dot-ELISA, FML-ELISA, Fast-ELISA, BSM-ELISA, slide-ELISA (MEDEIROS et al., 2008; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

Apesar dos avanços dos métodos sorológicos, os problemas com a ocorrência de resultados falso-positivos têm sido relatados e, podem aparecer devido à reação cruzada em cães com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, erliquiose, rickettsioses e toxoplasmose (GOMES et al., 2008).

Embora com a grande variedade de métodos sorológicos desenvolvidos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no Brasil, até o momento os únicos aceitos e recomendados pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos

caninos amostrais e censitários, são os kits ELISA e RIFI produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos que utilizam antígenos complexos de *Leishmania major*-like, (ELISA *L. major*-like e RIFI *L. major*-like) e o kit para Diagnóstico do Calazar Canino - ELISA/S7, produzido pela Empresa Biogene, incubada no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP), que utiliza como antígeno a proteína recombinante HSP-70 (Heat Shock Protein), sendo o fragmento S7 da HSP-70 de *L. chagasi*. O ELISA é indicado para a triagem de cães suspeitos, sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororeagentes ao ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina. O material recomendado para o diagnóstico é o soro sanguíneo e, essas duas empresas estão devidamente registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BARICHELLO, 2010; BRASIL, 2006).

1.2.7.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta começou a ser utilizada a partir da década de 1960, é uma metodologia considerada como “padrão ouro” do diagnóstico sorológico, normalmente utiliza como antígeno promastigotas de várias espécies do gênero *Leishmania* fixadas em lâmina. É útil em inquéritos soroepidemiológicos, na prática clínica e no seguimento do tratamento, no entanto, apresenta várias limitações como a sua aplicação que requer um alto nível de habilidade e experiência técnica, instalações laboratoriais adequadas, diluições de soro seriadas, o que a torna trabalhosa. O primeiro passo para a realização do exame ocorre quando os antígenos fixados na lâmina são recobertos com diluições do soro canino a serem testados e os soros controle positivo e negativo, logo após a primeira incubação, realizam-se várias lavagens; o segundo passo ocorre quando os antígenos são recobertos pela adição de antiimunoglobulina canina conjugada (anticorpo anti-IgG de cão conjugado) marcado com isotiocianato de fluoresceína. Após a segunda incubação e novas lavagens, as lâminas são montadas com glicerina tamponada e lamínula e observadas em microscópio equipado com luz fluorescente, onde a reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada. O resultado é considerado positivo quando os parasitas exibem fluorescência verde homogêneo, enquanto os que exibem coloração vermelha fosca são considerados negativos (LEAL, 2009; MAIA e CAMPINO, 2008; MIRÓ et al., 2008; BRASIL, 2006; OLIVEIRA et al., 2005).

O título corresponde à maior diluição do soro onde se verifica a emissão de fluorescência e o limiar de positividade ou “cut-off” para distinguir resultados positivos e

negativos varia entre 1:40 e 1:60, consoante os laboratórios (SOLANO-GALLEGOS et al., 2009).

1.2.7.2.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A partir da década de 1970, inicia-se o uso dos testes imunoenzimáticos, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), assim como suas variações e, consiste em uma reação imunoenzimática para detecção de imunoglobulinas específicas no soro, utilizando como antígeno promastigota ou amastigota. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, útil para análises em laboratórios ou em aplicações de campo e triagem, permitindo o processamento de grande número de amostras simultaneamente num curto período de tempo e é facilmente adaptado para uso com diversos antígenos tanto purificado, como recombinante. Tem boa sensibilidade e especificidade e as possíveis reações cruzadas podem ser minimizadas pelo uso desses antígenos. A leitura automatizada elimina erros de interpretação e torna a execução do teste mais simples (LEAL, 2009; MAIA e CAMPINO, 2008; DOURADO et al., 2007).

Sua sensibilidade permite a detecção de baixos títulos de anticorpos no soro, que irão reagir com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro* e, baseiam-se na ligação do antígeno solúvel adsorvido em microplacas e do anticorpo presente no soro canino diluído. Os anticorpos específicos presentes no soro vão se fixar aos antígenos e a visualização da reação ocorre quando é adicionado um conjugado associado a uma enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos, caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido através de espectrofotometria. O resultado considerado reagente é aquele em que apresenta o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvios padrão do ponto de corte (BRASIL, 2006; GONTIJO e MELO, 2004).

1.2.7.2.3 Teste Imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®)

A imunocromatografia foi originada na década de 1990 com a união das técnicas imunoenzimáticas com a cromatografia (DOURADO et al., 2007).

Reithinger et al. (2002) referem que os testes imunocromatográficos rápidos para o diagnóstico da LVC foram recentemente desenvolvidos e são todos baseados em antígenos recombinantes, espécie-específicos, como K39 (rK39). De acordo com Bisugo et al. (2007), a proteína rK39 apresenta sequência idêntica em sete espécies de *Leishmania*, a conservação de uma sequência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epítomos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*,

sendo que a presença de anticorpos anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatado à reatividade com outros tripanossomatídeos.

Segundo Laurenti (2009), há poucos estudos sobre a utilização de teste imunocromatográfico rápido anti-rK39 no diagnóstico da LVC em inquéritos caninos. Porém, o Ministério da Saúde do Brasil, através do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, trocará o protocolo dos testes imunológicos combinados em uso pelo teste imunocromatográfico rápido, Dual Path Platform (DPP[®]) Leishmaniose Visceral Canina, que é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-Leishmania, possuindo uma tecnologia de alta sensibilidade, o que agrega precisão ao diagnóstico em sangue total, soro ou plasma, dispensando estrutura laboratorial e equipamentos, o que facilita o seu uso no campo e por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, desonerando, desta forma, o laboratório (INSTITUTO DE TECNOLOGIA E IMUNOBIOLOGICOS BIO-MANGUINHOS, 2012). Queiroz Júnior (2011) refere que o uso do DPP[®] pode ser um recurso para obtenção de resultados mais eficientes, precisos e confiáveis no diagnóstico da LVC.

O teste DPP[®] é realizado pela adição de 5 µL de sangue total, soro ou plasma ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, a seguir são adicionadas 2 gotas do tampão. Após 5 minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desaparecerão. A seguir coloca-se 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados é realizada 10 a 15 minutos após esta etapa, quando se avalia o resultado: negativo, aparecimento de uma linha vermelha ou positivo, duas linhas vermelhas (QUEIROZ JÚNIOR, 2011).

1.2.7.3 Método Molecular

Considerando que os métodos sorológicos disponíveis baseados na detecção de anticorpos anti-Leishmania não são inteiramente satisfatórios porque em tempo real não discriminam a doença e a infecção assintomática. Foi introduzido recentemente o mais sofisticado método para o diagnóstico da LVC, que é o molecular, do qual se destaca principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo ultimamente o mais utilizado em pesquisas, pois visa o diagnóstico e monitoramento da leishmaniose visceral canina, permitindo também identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasita a partir de diferentes tecidos, incluindo medula óssea, pele, aspirado de linfonodo e sangue (MANNA et al., 2009; GOMES et al., 2007; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007).

Alguns estudos já demonstraram que a PCR é mais sensível e específica do que os métodos sorológicos e parasitológicos, porém pode resultar em contaminação e resultados

falsos positivos. Além disso, falsos negativos também podem ocorrer, uma vez que os microrganismos não podem estar presentes em todos os tecidos, pois a sensibilidade acerca de 100% foi conseguida a partir de amostras de medula óssea, embora no sangue, gânglios linfáticos ou no LCR, a PCR é menos sensível (NUTTAL et al., 2010; WANG et al., 2011).

Este método baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicos presentes no parasito, sendo um método sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* sp. em ampla variedade de amostras (GOMES et al., 2008).

1.2.8 Controle e Profilaxia

De acordo com Brasil (2006), o Programa Brasileiro de Controle da Leishmaniose Visceral considera como base o controle dos vetores e o controle dos reservatórios domésticos. Porém, a complicação em aplicar esses controles se deve principalmente pela diversidade de vetores, parasitas, reservatórios e intervenções que variam muito de acordo com a epidemiologia da região. A correta identificação dos cães infectados constitui uma medida importante entre as estratégias de um programa de controle, pois a LVC é uma indicação certa de transmissão em uma área de ocorrência de leishmaniose quer pela alta prevalência da doença nos cães, quer pela presença de parasitas na pele (KILLICK-KENDRICK, 1999; MELO, 2004).

1.2.8.1 Controle dos Vetores

Para Nascimento et al. (2005), o controle vetorial pode ser mais efetivo que a eliminação de cães no combate à infecção, o que é reforçado por Miró et al. (2009) que referem que pode ocorrer a quebra no ciclo de transmissão da Leishmania e assim prevenir a ocorrência da doença, pois segundo Gramiccia (2011) esse controle tem dupla finalidade, proteger os cães da Leishmaniose Canina e, conseqüentemente, reduzir o risco de infecção humana.

Diversos compostos químicos têm mostrado efeito repelente ou inseticida no mosquito, com um grau variável de eficácia, que depende de fatores tais como o modo de ação do inseticida, a capacidade de se espalhar e permanecer ativo na pele e a específica susceptibilidade a picada da espécie de mosquito, os piretróides são atualmente os inseticidas mais amplamente utilizados devido à sua eficácia contra o mosquito e a baixa toxicidade para o hospedeiro canino (GRAMICCIA, 2011).

No Brasil, estudos realizados mostram que coleiras impregnadas de deltametrina têm potente efeito inseticida sobre os flebotômíneos e podem reduzir os riscos de infecção em

cães, pois o impacto dessa estratégia dentro de uma comunidade depende do número de cães usando a coleira. Porém, na realidade, o uso de coleiras impregnadas de deltametrina, considerando o seu custo, não é muito popular entre os muitos proprietários de cães que vivem em áreas rurais e suburbanas, devido às más condições sociais e econômicas, não lhes permitem pagar as necessidades básicas de vida dos mesmos, o que só poderia ser possível, se apoiado por autoridades locais de saúde pública (DANTAS-TORRES, 2009).

1.2.8.2 Controle dos Reservatórios Domésticos

No Brasil, a eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororeagentes e/ou com resultado parasitológico positivo, a confirmação do exame parasitológico canino se faz obrigatório somente nas áreas onde não há casos humanos, nas demais áreas deve-se proceder à eutanásia dos cães sororeagentes (BRASIL, 2006). No entanto, na maioria dos países, a eutanásia de cães é inaceitável, pelo fato desses animais serem considerados membros da família e, principalmente, pela ausência de evidências claras que justifique este ato, além de ser eticamente discutível, esta estratégia é cientificamente infundada, pois não reduz a transmissão, devido o impacto limitado, o que tem sido reconhecido pelo programa de controle nacional, pois no Brasil não impediu o aumento no número de casos humanos ou caninos (DANTAS-TORRES et al., 2012; DANTAS-TORRES, 2009; MIRÓ et al., 2008).

As possíveis razões para o fracasso dessa estratégia têm sido amplamente discutidas nos últimos anos e tem sido atribuída principalmente, a baixa sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos, a demora na retirada dos animais soropositivos, na desconfiança do diagnóstico e, conseqüentemente na resistência dos proprietários em entregar os cães sororeagentes (ROMERO e BOELAERT, 2010).

Segundo Dantas-Torres (2009) milhares de cães foram eutanasiados durante as últimas décadas no Brasil, com menor ou nenhum impacto sobre a doença, com isso estudos têm gerado resultados e conclusões diferentes, o que pode ser explicado por limitações metodológicas, incluindo a falta de normatização, amostras de menor tamanho, soroprevalência significativamente diferente em áreas de estudos, perdas diferenciais durante o acompanhamento e, falta de controle entre os grupos; outra característica importante que deve ser considerada é o fato de que muitos cães soropositivos podem estar realmente infectados por outros patógenos, como a *L. braziliensis*, pois os testes sorológicos utilizados no Brasil não permitem a diferenciação de espécies e, portanto, não devem ser usados sozinhos especialmente em áreas onde tanto a *L.(L.) i. chagasi* e *L. braziliensis* estão presentes, onde são necessários mais testes para confirmar o diagnóstico etiológico.

1.2.8.3 Profilaxia

Gramiccia (2011) refere que na proteção individual todos os cães saudáveis que vivem ou visitam áreas onde a leishmaniose é endêmica devem ser protegidos das picadas dos flebotômíneos, para evitar infecções por *Leishmania*, enquanto que na proteção em massa, considerando que os cães que receberam tratamento para a leishmaniose podem ainda infectar os flebótomos, deveria ser recomendado que qualquer cão infectado por *Leishmania* e que vive em áreas endêmicas de leishmaniose deve ser protegido das picadas dos flebotômíneos, como medida para reduzir o risco de infecção na população canina e humana.

Solano-Gallego et al. (2009) referem que algumas medidas preventivas podem ser tomadas pelo proprietário do cão, como mantê-lo dentro de casa durante o crepúsculo até o amanhecer; reduzir os habitats favoráveis aos mosquitos, como águas paradas; usar inseticidas no ambiente e usar repelentes de insetos diretamente no animal.

A abordagem mais recente disponível para a prevenção da Leishmaniose Canina é a vacinação, visto que três vacinas são atualmente licenciadas para uso em cães, com uma restrita à Europa e duas para o Brasil, estas vacinas podem induzir a proteção de longa duração contra a infecção, a doença grave e/ou morte (DANTAS-TORRES et al., 2012). As duas vacinas licenciadas para uso no Brasil, são: Leishmune® (Fort Dodge Animal Health) constituída por uma fração de glicoproteína de *Leishmania donovani*, apresentando 76-80% de eficácia e a Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal) que consiste em um adenovírus que expressa um antígeno A2 de *L. donovani* (DANTAS-TORRES, 2009).

O futuro do controle da Leishmaniose Canina consiste em uma abordagem integrada que inclui o uso de aplicação tópica de inseticidas, que pode prevenir novas infecções e reduzir a picada dos flebótomos em cães que já estão infectados e a vacinação eficaz contra *Leishmania*, que poderá evitar o estabelecimento da infecção introduzida pela picada dos flebotômíneos que escaparam do efeito inseticida, substituindo assim a eutanásia indiscriminada de cães soropositivos em áreas endêmicas (DANTAS-TORRES et al., 2012; MIRÓ et al., 2008).

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.; MACEDO, A. A.; MORAES-JÚNIOR, F. J.; DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; CALABRESE, K. S.; MORAES, J. L. P.; REBÊLO, J. M. M.; GUERRA, R. M. S. N. C. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotomíneos em uma área endêmica na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 197-203, set. 2008.

ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; RALLIS, T. S.; KOYTINAS, A. F.; TONTIS, D.; PLEVRAKI, K.; KRITSEPI, M. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: A prospective study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, n. 1, p. 53-57, jan. 2007.

AGUIAR, D. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; MACHADO, R. Z.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in rural dogs from the city of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 71-72, jan./mar. 2010.

ALBUQUERQUE, A. L.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, p. 78-84, nov./dez. 2007.

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 156-159, mar./abr. 2009.

_____; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, jul. 2010.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, sep. 2004.

ALVES, W. Controle da Leishmaniose Visceral baseado no reservatório canino. In: Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en Las Américas. **Organización Panamericana de Salud**, Rio de Janeiro, p. 94-98, 2006.

ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. S. P.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 3, p. 310-315, mar. 2010.

AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, nov./dez. 2006.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA JUNIOR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; STARKE BUZZETTI, W. A. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, jan./mar. 2010.

AZEVEDO, E. M. R.; DUARTE, S. C.; COSTA, H. X.; ALVES, C. E. F.; SILVEIRA NETO, O. J.; JAYME, V. S.; LINHARES, G. F. C. Estudo da Leishmaniose visceral canina no município de Goiânia, Goiás, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 159-168, abr./jun. 2011.

AZEVEDO, M. A. A.; DIAS, A. K. K.; DE PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Avaliação da Leishmaniose Visceral Canina em Poxoréu, Estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 3, p. 123-127, jul./set. 2008.

BANETH, G. Canine leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 35., 2010, Geneva. **Proceedings...** Geneva: Switzerland, 2010.

_____ e AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, n. 1, p. 14-15, jan. 2008.

_____; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, jul. 2008.

BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; FORTES-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; PAULA, E. V.; PRATA, A.; MONTEIRO, E. M.; DIAS, E. D. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American Leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais - Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 481-487, aug. 2004.

_____; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 5, p. 421-425, set./out. 2005.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, jul. 2006.

BARBOSA, D. S.; ROCHA, A. L.; SANTANA, A. A.; SOUZA, C. S. F.; DIAS, R. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; ABREU-SILVA, A. L. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 653-659, jul./set. 2010.

BARBOSA, M. A. G. **Prevalência, avaliação clínica e imunológica de cães (Canis familiares) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi (Cunha & Chagas, 1937) provenientes do município de Tamandaré, região litoral sul do estado de Pernambuco, Brasil.** 2010. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

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

_____; LEAL, D. C.; SOUZA, B. M. P. S.; CARNEIRO, A. J. B.; GOMES NETO, C. M. B.; ALCÂNATARA, A. C.; JULIÃO, F. S.; MOURA, S. A. B.; PERALVA, L. M. P.; FERREIRA, F.; FRANKE, C. R. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 434-447, abr./jun. 2009.

BARICHELLO, F. F. G. **Avaliação da resposta imunológica de cães vacinados com a vacina FML (Leishmune[®]) e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina por meio de dois métodos sorológicos: ELISA e RIFI.** 2010. 126 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P.; TELES, N. M. M. Diagnosis of Leishmania (Leishmania) chagasi infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 18-23, jan./fev. 2012.

BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L.; TANIGUCHI, H. H.; CUNHA, E. A.; SANTOS, A. A.; PESSOTO-JUNIOR, M.; KANETO, C. N.; CAMARGO, C. V. O.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDRADE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.

BORASCHI, C. S. S. e NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, p. 44-48, nov./dez. 2007.

BOURDEAU, P. J. Update on canine leishmaniosis: From infection to optimized management. In: EUROPEAN CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 23., 2009, Bled. **Proceedings...** Bled: Slovenia, 2009. p. 10-27.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; LAUS, J. L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina - revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 64, p. 68-74, set./out. 2006.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 79-83, mar./apr. 2003.

CALABRESE, K. S.; CORTADA, V. M. C. L.; DORVAL, M. E. C.; SOUZA LIMA, M. A. A.; OSHIRO, E. T.; SOUZA, C. S. F.; SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, New York, v. 124, n. 3, p. 253-257, mar. 2010.

CAMARGO, J. B. **Elucidação diagnóstica na Leishmaniose visceral canina para a vigilância epidemiológica e controle desta zoonose**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

CARDOSO, J. F. **Estratégias para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em ações de vigilância**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

CARDOSO, K. C. I.; SILVA, A. F.; BURMANN, A. R. P.; MAGALHÃES, D.; MONTEIRO, R. B. Prevalência da leishmaniose visceral canina no Estado do Amapá no período de 2008 a 2010. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 27.; REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, 15., 2011, Uberaba. **Anais ... Uberaba: MG, 2011. p. 201.**

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H. D. F. H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J. M.; RODRIGUES, M. Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 117, n. 1-2, p. 35-41, may. 2007.

CARNEIRO, A. P. e TOCANTINS, S. Leishmaniose Visceral Canina: fatores importantes na manutenção da doença no município de Mirassol D'Oeste-MT. **Revista UNIARA**, Araraquara, v. 14, n. 1, p. 127-139, jul. 2011.

CARVALHO, M. S. **Eco-epidemiologia da Leishmaniose visceral americana na zona da Mata Norte de Pernambuco**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.

COELHO, H. E.; CARVALHO, T. F.; ALBERTO, H.; FERNANDES, J. M.; SOUZA, K. B.; MAGALHÃES, A. O. C.; BARBOSA, C. H. G. Ocorrência de Leishmaniose visceral em um cão em Uberaba, Minas Gerais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, jan. 2011.

CORTESE, L.; PELAGALLI, A.; PIANTEDOSI, D.; MASTELLONE, V.; MANCO A.; LOMBARDI, P.; CIARAMELLA, P.; AVALLONE, L. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, Berlin, v. 53, n. 10, p. 546-548, 2006.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 232-242, mar./abr. 2011.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, n. 3, p. 636-643, nov. 2007.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. M.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, mar. 2005.

_____ e LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, n. 3-4, p. 320-325, jul. 2007.

DAMASCENO, Á. R.; SILVA, A. F.; PRADO, W. S.; CALDEIRA, R. D.; MORAIS, R.; FARIAS, D. M.; SILVA, L. C. O.; SAMPAIO JÚNIOR, F. D.; CAVALCANTE, G. G.; SCOFIELD, A. Pesquisa de *Leishmania infantum chagasi* em cães de áreas rurais de São Domingos do Capim, Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012, São Luis. **Anais...** São Luis: MA, 2012. p. 203.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, p.117-118, feb. 2006a.

_____. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 929-930, dec. 2006b.

_____. **Epidemiologia da Leishmaniose visceral no município de Paulista, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006c.

_____. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p.139-146, nov. 2007.

_____. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, mar. 2009.

_____ e BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, may./jun. 2006.

_____; LORUSSO, V.; TESTINI, G.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEIREDO, L. A.; STANNECK, D.; MENCKE, N.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; ALVES, L. C.; OTRANTO, D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 4, p. 857-860, mar. 2010.

_____; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine leishmaniasis in the old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, dec. 2012.

DE NARDO, C. D. D.; ROSSI, C. N.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* syn *chagasi* em cães de São José do Rio Preto, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 425-428, 2011.

DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; GUERRA, R. M. S. N. C.; CALABRESE, K. S.; LIMA, T. B.; ABREU-SILVA, A. L. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 3, p. 740-745, jul./set. 2008.

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions associated with Visceral Leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, Cary, v. 42, n. 5, p. 650-658, sep. 2005.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 205-214, set./out. 2007.

FEITOSA, V. T. **Levantamento sorológico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em cães no estado do Pará no período de 2007-2008**. 2009, 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2009.

FELIPE, I. M. A. **Distribuição espacial e soro prevalência da infecção por *Leishmania (L.) chagasi* em uma área endêmica no município de Raposa, Maranhão, Brasil**. 2009, 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2009.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1999. Barcelona, **Proceedings** ... Barcelona: Spain, 1999. p. 6-10.

FIGUEIREDO, F. B.; BONNA, I. C. F.; NASCIMENTO, L. D.; COSTA, T.; BAPTISTA, C.; PACHECO, T. M. V.; AMENDOEIRA, M. R. R.; MADEIRA, M. F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 141-145, mar./abr. 2009.

_____; MADEIRA, M. F.; NASCIMENTO, L. D.; ABRANTES, T. R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S. R. L.; SCHUBACH, T. M. P. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of igg in serum and eluate samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 193-196, jul./ago. 2010.

FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTE-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Importance of Lutzomia longipalpis in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, n. 3-4, p. 213-20, aug. 2005.

_____; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTE-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, feb. 2003.

FREHSE, M. S.; GRECA JÚNIOR, H.; ULLMANN, L. S.; CAMOSSI, L. G.; MACHADO, J. G.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 62-64, jan./mar. 2010.

FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. M. Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 159-167, apr. 2006.

GARCEZ, L. M.; CARDOSO, J. F.; CHAGAS, A. P.; MIRANDA, J. F. C.; SOUZA, G. C. R.; SOARES, D. C.; BEZERRA, L. M.; FRAIHA, H.; SHAW, J. J.; GOTO, H. Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 1, p. 107-116, mar. 2010.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, mar. 2007.

GOMES, L. V. **Prevalência da Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Varzelândia, Minas Gerais, Brasil, 2005.** 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

GOMES, Y. M.; CAVALCANTI, M. P.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, n. 1, p. 45-52, jan. 2008.

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

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 1, p. 23-30, sep. 2011.

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

IKEDA-GARCIA, F. A. e MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, p. 34-42, nov./dez. 2007.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA E IMUNOBIOLOGICOS. BIO-MANGUINHOS. **DPP® Leishmaniose Canina**, Fiocruz. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE. **International Code of Zoological Nomenclature**: the International Trust for Zoological Nomenclature, London, 1999, 306 p. Disponível em: <<http://www.nhm.ac.uk/hosted-sites/iczn/code>>. Acesso em: 20 ago. 2012.

JESUS, R. C.; MELO, C. C.; PIRES, R. N. B.; BRANDÃO, J. A.; MACHADO, R. S.; COELHO, R. N.; FERREIRA, L. J. C.; RAMOS, P. K.; CAMPOS, M. B.; CARNEIRO, L. A.; LIMA, L. V. R.; SILVEIRA, F. T. Avaliação da concordância diagnóstica entre a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação imunoenzimática (ELISA) na infecção canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* no Estado do Pará, Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 27.; REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, 15., 2011, Uberaba. **Anais ...** Uberaba: MG, 2011. p. 204.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA JR, E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, p. 319-324, ago. 2007.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 279-289, may. 1999.

LAINSON, R. e RANGEL, E. F. Ecologia das Leishmanioses. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Ed). **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. cap. 6, p. 311-336.

_____. *Lutzomya longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, dec. 2005.

_____. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, feb. 2006.

_____ e SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 10. ed., v. 5, London: Arnold, 2005. cap. 17, p. 313-349.

LANGONI, H. **Aspectos gerais da leishmaniose visceral canina e situação no Estado de São Paulo**, ago. 2008. Disponível em: <<http://cniia.inta.gov.ar/helminto/Congreso%20Brasil%202008/ASPECTOS%20GERAIS%20DA%20LEISHMANIOSE%20VISCERAL%20CA%E2%80%A6.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2012.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 67, p. 13-23, jul. 2009.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 69, p.14-18, set. 2009.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; DE MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 43-53, sep. 2004.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 1-2, p. 146-151, aug. 2008.

MACHADO, J. G.; HOFFMANN, J. L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, p. 50-58, nov./dez. 2007.

MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G. S.; NASCIMENTO, L. D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; PAULA, C. C.; BOGIO, A.; GOMES, M. C. A.; BESSA, A. M. S.; PASSOS, S. R. L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, London, v. 87, n. 2, p. 260-262, oct. 2009.

MAIA, C. e CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 274-287, dec. 2008.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine control: Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 82, n. 4, p. 566-567, jul./aug. 1988.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, London, v. 87, n. 1, p. 76-78, aug. 2009.

MARQUES, S. R.; MONTEIRO, M. F. M.; SANTANA, I. M.; COSTA, G. A.; TAVARES, J. P. C.; CRUZ, N. L. N.; GUERRA, N. R.; SANTOS, E. M. S.; SANDES, H. M. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Detecção de IgG anti-*Leishmania infantum* em caninos domésticos de Serrambi e Igarassu - Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012. São Luis. **Anais ...** São Luis: MA, 2012. p. 200.

MARTINS, I. S. **Aspectos epidemiológicos e de hemostasia na Leishmaniose visceral canina**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MARTÍNEZ, V.; QUILEZ, J.; SANCHEZ, A.; ROURA, J.; FRANCINO, J.; ALTET, L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 57, p. 1-5, apr. 2011.

MATOS, M. M.; FILGUEIRA, K. D.; AMORA, S. S. A.; SUASSUNA, A. C. D.; AHID, S. M. M.; ALVES, N. D. Ocorrência da Leishmaniose Visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 16, n. 1, p. 51-54, jun. 2006.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 13., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004. p. 41-45.

MEDEIROS, C. F. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. N. G.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, M. C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 33-40, jun. 2008.

MESTRE, G. L. C. e FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 1, p. 42-48, jan./fev. 2007.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 371-377, aug. 2008.

_____; OLIVA, G.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MORTARINO, M.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5-6, p. 397-404, oct./dec. 2009.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 147-152, mar./abr. 2005.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, apr. 2007.

MOSHFE, A.; MOHEBALI, M.; EDRISSIAN, G.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; KAZEMI, B.; JAMSHIDI, S.; MAHMOODI, M. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 112, n. 2, p. 101-105, nov. 2009.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; SOUZA, E. C.; SILVA, L. M.; LEAL, P. C.; CANTANHEDE, K. L.; BEZERRA, G. F. B.; VIANA, G. M. C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1801-1807, nov./dez. 2005.

NAVEDA, L. A. B.; MOREIRA, E. C.; MACHADO, J. G.; MORAES, J. R. C.; MARCELINO, A. P. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 988-993, mai. 2006.

NUTTALL, T.; HARVEY, R. G.; MCKEEVER, P. K. Enfermedades caracterizadas por la formación de costras y descamación. In: **Enfermedades cutáneas del perro y el gato**. Zaragoza: Servet, 2010. p. 198-201.

OLIVEIRA, D. M. S. **Distribuição da fauna flebotômica (Díptera: Psychodidae) ao longo de um gradiente rural-urbano em área endêmica para leishmaniose visceral no município de Barcarena-PA, Brasil**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

OLIVEIRA, E. N. **Soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães domiciliados na cidade de Araripina, sertão de Pernambuco**. 2011. 26 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

OLIVEIRA, L. S.; JULIÃO, F. S.; SOUZA, V. M. M.; FREITAS, D. S.; SOUZA, B. M. P. S.; PAULE, B. J. A.; AGUIAR, P. H. P.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 41-47, jan./mar. 2005.

OLIVEIRA, S. S. e ARAÚJO, T. M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 6, p. 1681-1690, nov./dez. 2003.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MICHALSKY, E. M.; VIANNA, A. C.; LIMA, M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 523-528, jan. 2010.

PEÑUELA, M. H. R. e VALENCIA, J. A. S. El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina: dilemas y retos. **Biosalud**, Manizales, v. 8, p. 105-116, 2009.

QUEIROZ JÚNIOR, E. M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

RANGEL, E. F. e VILELA, M. F. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, dez. 2008.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GUINCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, n. 1, p. 68-75, aug. 2006.

REITHINGER, R. e DAVIES C. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 289-90, jul. 2002.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, jul. 2002.

RESENDE, M. C.; CAMARGO, M. C. V.; VIEIRA, J. R. M.; NOBI, R. C. A.; PORTO, N. M. N.; OLIVEIRA, C. D. L.; PESSANHA, J. E.; CUNHA, M. C. M.; BRANDÃO, S. T. Seasonal variation of *Lutzomyia longipalpis* in Belo Horizonte, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 51-55, jan./fev. 2006.

ROMERO, G. A. e BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. e584, jan. 2010.

RONDON, F. C. M. **Estudo Transversal da Leishmaniose Visceral Canina na Cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

ROSYPAL, A. C. e LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 5, p. 1113-1115, oct. 2005.

SALZO, P. S. Aspectos Dermatológicos da Leishmaniose Canina. **Nosso Clínico**, São Paulo, v. 63, p. 30-34, mai./jun. 2008.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 515-524, oct. 2008.

SANTANA, M. A.; PIMENTEL, D. S.; MAIA, C. S.; RAMOS, R. A. N.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina no município de Petrolina. In: JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX, 10., 2010, Recife. **Anais ...** Recife: UFRPE, 2010.

SANTOS, C. A. C. **Percepção, epidemiologia e aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina em área urbana do Estado de Pernambuco**. 2006, 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

SANTOS, H. D. **Fatores associados à soropositividade para Leishmaniose visceral canina no município de Piraquê, estado do Tocantins, Brasil**. 2008. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

_____; MINHARRO, S.; GALVÃO, S. R.; BAILONA, G. H. C.; GEORGETTI, E. D. S.; FILHO, O. N.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Sorologia e diagnóstico parasitológico de *Leishmania* spp. em cães de Araguaína-TO, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012. São Luis. **Anais...** São Luis: MA, 2012. p.199.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 1, p. 41-45, jan./fev. 2010.

SCHWANKE, K.; SILVA, A. M. M.; PRADO, W. S.; BAHIA, M.; PACHECO, A.; LIMA, D. H. S.; ARAGÃO, S. K. S.; SILVEIRA, F. T.; CAVALCANTE, G. G.; SCOFIELD, A. A. Diagnóstico sorológico e molecular de *Leishmania infantum chagasi* em cães no município de Belém, Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012. São Luis. **Anais...** São Luis: MA, 2012. p.199.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 577-579, aug. 2006.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 324-328, jan./fev. 2005.

SILVA, D. C. B.; SILVA, D. C. B.; FREIRE, J. M.; OLIVEIRA, R. J.; DIAS, N. L. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Brumadinho, Minas Gerais, 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008. Gramado. **Anais...** Gramado: RS, 2008. p. 5.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, mar. 2009a.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropic - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, F. T. S.; SANTOS, J. T.; NETTO, E. M.; BAVIA, M. E.; NAKATANI, M.; SOUZA, F. D. P.; CARDIM, L. L.; CARNEIRO, D. D. M. T. Aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral canina no Distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 34, n. 4, p. 783-795, out./dez. 2010.

SILVA, M. R. e SANTA ROSA, I. C. A. Levantamento de leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso, Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 69-74, 2005.

SILVA, M. V. M. Leishmaniose Visceral Canina. In: SEMANA DA BIOLOGIA E ENCONTRO NORTE-MINEIRO DE BIÓLOGOS, 10., 2008, Montes Claros. **Anais ...** Montes Claros: Unimontes, 2008.

SILVA, R. M.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. C.; NOGUEIRA, Y. L. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 1044-1053, dez. 2009c.

SILVA, S. M. **Avaliação de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurinol, no tratamento da leishmaniose visceral canina.** 2011. 243 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

_____; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 1-2, p. 159-162, dec. 2009b.

SILVA, T. P. D. e SANTOS, J. P. Leishmaniose visceral canina em Bom Jesus, Piauí, Brasil: um relato de caso autóctone. **Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 709-716, 2011.

SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C. E. P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 143-147, jun. 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 1-17, oct. 2009.

_____; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; GAETANO OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 86, p. 1-16, may. 2011.

TASCA, K. I.; BUZETTI, W. A. S.; TENORIO, M. S.; PAULAN, S. C.; LIMA, F. L.; QUEIROZ, N. M. G. P.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NEVES, M. F.; NORONHA JR., A. C. F.; ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 27-33, jan./mar. 2009.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 4, p. 482-483, jul./ago. 2007.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 46-51, jul./set. 2009.

VAMVAKIDIS, C. D.; KOUTINAS, A. F.; KANAKOUDIS, G.; GEORGIADIS, G.; SARIDOMICHELAKIS, M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Record**, London, v. 146, n. 24, p. 698-703, jun. 2000.

VIDAL, I. F. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina em Campina Grande, Paraíba**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

WANG, J. Y.; HA, Y.; GAO, C. H.; WANG, Y.; YANG, Y. T.; CHEN, H. T. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 69, p. 1-8, may. 2011.

ZAVITSANOU, A.; KOUTIS, C.; BABATSIKOU, F. Leishmaniasis: an overlooked public health concern. **Health Science Journal**, Houston, v. 2, n. 4, p. 196-205, oct./dec. 2008.

2 SOROPREVALÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE COLARES, ESTADO DO PARÁ

2.1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), conhecida também como Leishmaniose Visceral Americana (LVA), ou calazar, é uma doença infecto-parasitária de caráter grave e crônico, de grande impacto na saúde pública, caracterizada por elevada taxa de morbidade e letalidade, cuja característica principal, e que compromete o seu controle, é a diversidade epidemiológica, em função da grande variabilidade de espécies hospedeiras e reservatórios, de vetores e de características ambientais que interagem e possibilitam a manutenção e difusão da enfermidade (LANGONI, 2008).

Na América do Sul a LVC é causada por um protozoário flagelado, intracelular obrigatório de células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) e que nos últimos anos recebeu a denominação de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Necessita de um hospedeiro intermediário invertebrado hematófago, como vetor, no Brasil, até o momento, duas espécies estão relacionadas com a transmissão, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* e de um hospedeiro vertebrado definitivo, como reservatório, sendo que no ambiente urbano o cão é o principal representante (LAINSON e SHAW, 2005; BRASIL, 2006).

Apesar da grande variedade de métodos sorológicos desenvolvidos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no Brasil, até o momento os únicos aceitos e recomendados pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, são os kits ELISA e RIFI produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos que utilizam antígenos complexos de *Leishmania* e o kit para Diagnóstico do Calazar Canino - ELISA/S7, produzido pela Empresa Biogene, incubada no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP), que utiliza como antígeno a proteína recombinante HSP-70 (Heat Shock Protein), sendo o fragmento S7 da HSP-70 de *L. chagasi* e, estão devidamente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). O ELISA é indicado para a triagem de cães suspeitos, sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororeagentes ao ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina, o material recomendado para o diagnóstico é o soro sanguíneo (ANDRADE et al., 2006; BRASIL, 2006).

A prevalência global da LVC é difícil de calcular devido à quantidade limitada de dados publicados de alguns países, a existência de diferenças metodológicas entre os estudos (por exemplo, tamanho da amostra e critérios de positividade) e as limitações inerentes de

sorologia (por exemplo, a possibilidade de reações cruzadas, principalmente com outras espécies da família Trypanosomatidae). A maioria das informações sobre a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em cães são de inquéritos sorológicos realizados em diferentes regiões do Brasil e, cujos resultados variam de acordo com as características da população, bem como a metodologia empregada na avaliação, além dos fatores de riscos associados à infecção como sexo, faixa etária, raça, tamanho e tipo do pelame, estado geral, sintomatologia clínica e condições do peridomicílio, onde a maior incidência parece estar associada à moradias próximas de matas e a convivência com outros animais domésticos e selvagens (DANTAS-TORRES, 2009; SILVA, et al., 2009; AZEVEDO et al., 2008; BORASCHI e NUNES, 2007).

O objetivo deste estudo foi determinar a soroprevalência da Leishmaniose Visceral Canina por meio do ELISA e RIFI, no município de Colares, região Nordeste do estado do Pará.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Comitê de Ética

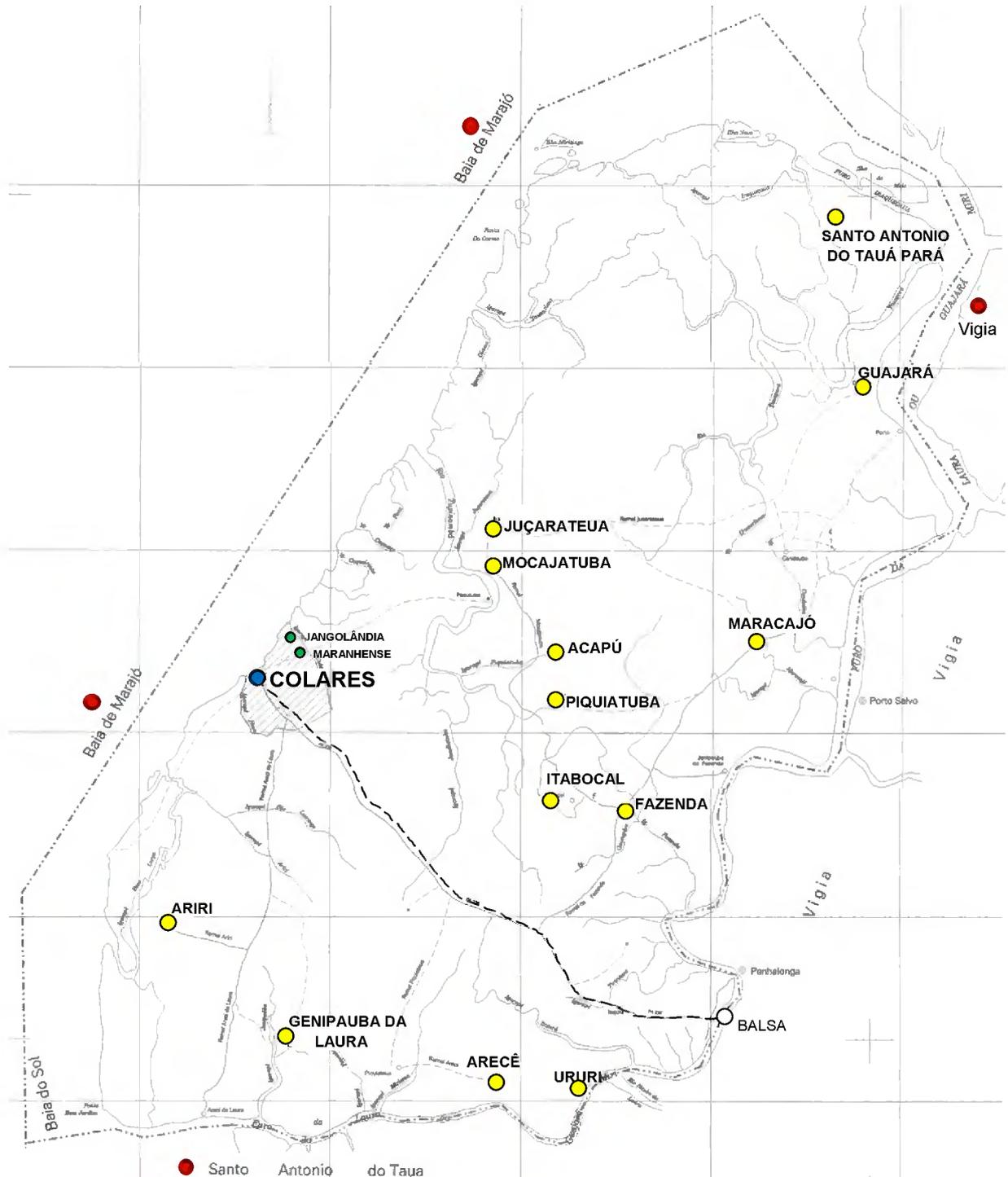
Esse estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), registrado no protocolo N° 48/11.

2.2.2 Área de estudo

O município de Colares, no estado do Pará, é uma ilha que tem o seu litoral banhado pela Baía de Marajó, pertence à Mesorregião do Nordeste Paraense e Microrregião do Salgado, distante a 90 km da capital Belém. A sede do município está localizada a 00° 55' 38'' de latitude Sul e 48° 17' 04'' de longitude a Oeste de Greenwich. Faz limite ao Norte com Baía de Marajó e município de Vigia, a Leste com município de Vigia, ao Sul com município de Santo Antônio do Tauá e a Oeste com a Baía de Marajó. A cobertura vegetal predominante é constituída de florestas secundárias e mangue. Apresenta clima equatorial amazônico, com temperaturas relativamente elevadas, com média de 26° C, o que é suavizado pela sua condição de ilha, apresentando uma extensa rede hidrográfica com rios e igarapés. Possui extensão territorial de 609.79 Km², população estimada em 11.382 habitantes, composta de 30% nos seis bairros na zona urbana da sede do município e 70% nas 22 localidades (vilas e povoados) na zona rural (IDESP, 2012). As localidades estudadas foram: Itabocal, Maranhense, Jangolândia, Fazenda, Acapú, Piquiatuba, Mocajatuba, Ururi, Aracê,

Guajará, Maracajó, Ariri, Juçarateua, Santo Antonio do Tauá Pará e Genipaúba da Laura (Figura 1).

Figura 1: Mapa do município de Colares, estado do Pará, indicando os limites geográficos, zona urbana, bairros estudados da zona urbana e localidades estudadas da zona rural.



Fonte: Adaptado IBGE - Censo 2000.

Legendas:

- Limites geográficos
- Zona urbana
- Bairros estudados da zona urbana
- Localidades estudadas da zona rural

2.2.3 Animais

Foram selecionados aleatoriamente para a coleta de sangue, 435 (quatrocentos e trinta e cinco) cães (*Canis familiaris*) domiciliados nos bairros e nas localidades da zona rural do município de Colares, de ambos os sexos, idade acima de quatro meses, com ou sem padrão de raça definida. Todos os cães foram examinados para verificar a presença de sinais clínicos sugestivos de LVC e foram classificados como sintomáticos quando apresentaram uma alteração clínica sugestiva da doença, tais como perda de peso, alterações cutâneas, alterações oculares, linfadenomegalia e onicogrifose. Por outro lado, cães sem qualquer sinal foram considerados assintomáticos.

2.2.4 Métodos Sorológicos

As análises das amostras de soro dos animais investigados foram realizadas no período de abril a maio de 2012, no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDP), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado na cidade de Recife - PE. Os anticorpos anti-*Leishmania* foram detectados através dos métodos sorológicos ELISA e RIFI. Para o ELISA foi utilizado o Kit para Diagnóstico do Calazar Canino - ELISA/S7[®] produzido por Biogene Indústria e Comércio Ltda. A reação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, sendo considerados reagentes os soros que apresentaram o valor de densidade óptica igual ou superior a três desvios padrões do ponto de corte. Para a RIFI, foram utilizadas lâminas de vidro contendo 12 poços, fixadas com antígenos de *Leishmania infantum*, procedentes do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz. A técnica foi realizada de acordo com Camargo (1974), considerando reagente o soro que apresentou fluorescência na titulação de 1:40, como preconiza o Ministério da Saúde, tomando-se como referência para as amostras reagentes e não reagentes os soros controle positivo e negativo, provenientes do LDP - UFRPE, que foram incluídos em cada lâmina. Todas as amostras de soro sanguíneo dos cães foram analisadas pelos dois métodos sorológicos ELISA/S7 e RIFI.

2.2.5 Análise Estatística

Os dados coletados foram armazenados no software Excel 2010.

As análises estatísticas foram realizadas de forma descritiva e em alguns casos foram aplicados o Teste de Qui-Quadrado e “Odds ratio” (OR) com nível de significância de 5%. Um Dendograma de agrupamento entre as localidades foi realizado através de análise de Clusters com distância Euclidiana, baseadas nas reações de ELISA, RIFI e ELISA + RIFI.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

2.3 RESULTADOS

Baseando-se nas reações sorológicas pelos métodos ELISA e RIFI para Leishmaniose Visceral Canina, foram consideradas sororeagentes as amostras que reagiram concomitantemente aos dois métodos sorológicos, as quais representaram 9,9% do total de 435 amostras dos cães, determinando assim a soroprevalência (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado das reações sorológicas para Leishmaniose Visceral Canina pelos métodos ELISA e RIFI em 435 cães do município de Colares, estado do Pará - 2013.

REAÇÕES	n	+	%
ELISA	435	186	42,8
RIFI	435	120	27,6
ELISA+RIFI	435	43	9,9

n (número total de animais avaliados); + (número de animais positivos); % (frequência)

A prevalência e variáveis sexo, faixa etária e classificação clínica associadas à soropositividade nas reações ELISA+RIFI para Leishmaniose Visceral Canina estão apresentadas na Tabela 2.

Observa-se que entre a variável sexo não houve prevalência significativa ($P > 0,05$). Contudo, na análise dos dados das variáveis faixa etária e classificação clínica foi comprovada uma prevalência significativa ($P < 0,05$), onde foi evidenciado que na faixa etária < de 2 anos os cães tem uma chance 7 vezes maior de serem soropositivos que os da faixa etária > de 2 anos, enquanto que na classificação clínica foi demonstrado que os cães sintomáticos tem uma probabilidade em torno do triplo de serem soropositivos em relação aos assintomáticos.

A variável raça não foi analisada estatisticamente, pois todos os cães soropositivos nas reações ELISA+RIFI para Leishmaniose Visceral Canina apresentavam-se sem padrão de raça definida.

Tabela 2: Prevalência e variáveis sexo, faixa etária e classificação clínica associadas à soropositividade nas reações ELISA+RIFI para Leishmaniose Visceral Canina no município de Colares, estado do Pará - 2013.

VARIÁVEIS	N	+ (%)	OR	IC 95%	P
SEXO					
MACHO	250	25 (10,0)	1,03	0,54-1,95	0,94
FÊMEA	185	18 (9,7)			
FAIXA ETÁRIA					
< 2 anos	236	24 (10,2)	6,98	3,47-14,04	0,0001*
> 2 anos	199	19 (9,5)			
CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA					
SINTOMÁTICOS	223	32 (14,3)	3,06	1,50-6,25	0,002*
ASSINTOMÁTICOS	212	11 (5,2)			

n (número de animais avaliados em cada variável); +(%) (número e porcentagem de animais soropositivos - ELISA+RIFI); OR (“Odds ratio”); IC (Intervalo de Confiança - 95%); P (Probabilidade)

* = significância a 0,05

A frequência dos sororeagentes nas reações ELISA e RIFI, baseando-se nas alterações clínicas observadas nos cães estão apresentadas na Tabela 3. Os cães que apresentaram pelo menos uma alteração clínica sugestiva de LVC, como perda de peso, alterações cutâneas, alterações oculares, linfadenomegalia e onicogribose foram considerados animais sintomáticos. Onicogribose e alterações cutâneas foram as que apresentaram maiores porcentagens, 23,3 e 14,4 %, respectivamente.

Tabela 3: Frequência dos sororeagentes no ELISA e RIFI, baseados nas alterações clínicas dos cães do município de Colares, estado do Pará - 2013.

ALTERAÇÕES CLÍNICAS	N	+	%
Perda de peso	40	04	10,0
Alterações cutâneas	132	19	14,4
Alterações oculares	10	01	10,0
Linfadenomegalia	11	01	9,1
Onicogribose	30	07	23,3

n (número total de animais); + (número de animais soropositivos); % (frequência)

A frequência dos animais que foram sororeagentes nas reações de ELISA, RIFI e ELISA+RIFI em um total de 15 localidades do município de Colares está demonstrada na

Tabela 4. Sendo que as localidades Juçarateua e Ururi tiveram as maiores porcentagens de sororeagentes no ELISA, 86,1 e 74,1%, respectivamente. Quanto aos sororeagentes na RIFI, as localidades Ariri e Genipaúba da Laura apresentaram maiores porcentagens, 55,1 e 48%, respectivamente. Enquanto que as localidades Juçarateua, Ariri e Guajará demonstraram as maiores porcentagens de cães sororeagentes (ELISA + RIFI), 30,5; 22,4 e 20%, respectivamente.

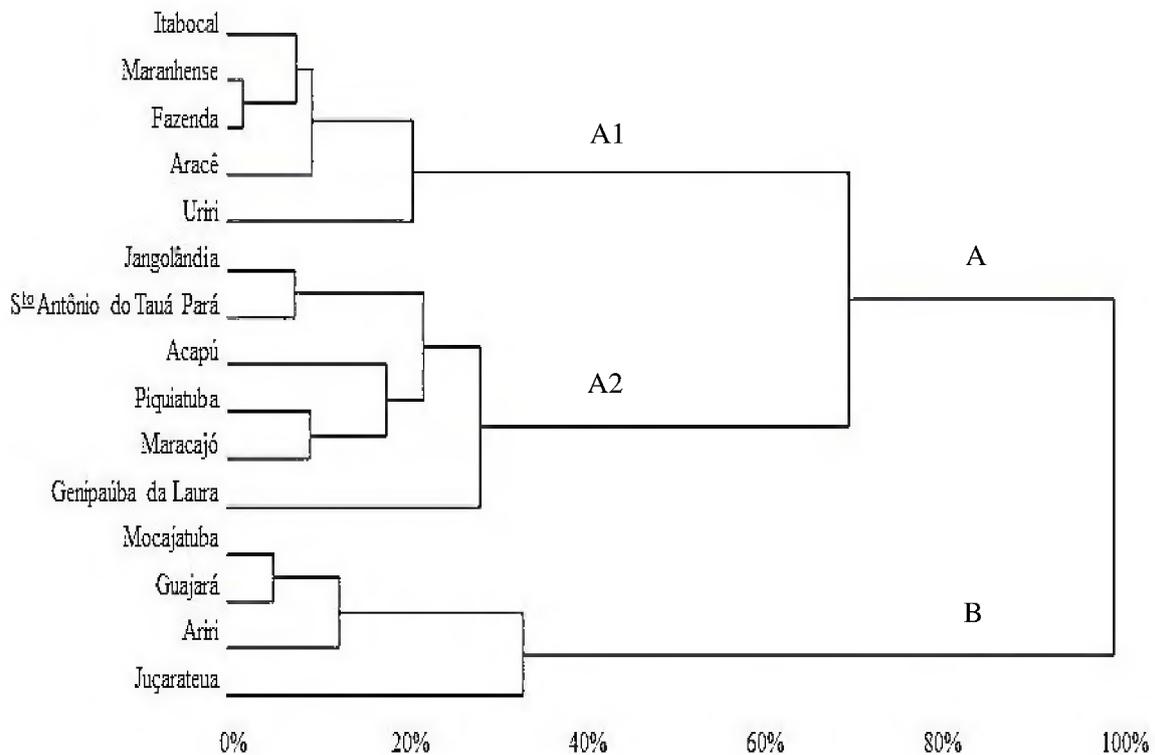
Tabela 4: Frequência dos cães sororeagentes baseados nas reações de ELISA, RIFI e ELISA+RIFI nas localidades do município de Colares, estado do Pará - 2013.

LOCALIDADES	n	ELISA		RIFI		ELISA+RIFI	
		+	(%)	+	(%)	+	(%)
Itabocal	27	14	(51,8)	02	(7,4)	01	(3,7)
Maranhense	39	18	(46,1)	--		--	
Jangolândia	21	09	(42,8)	03	(14,2)	02	(9,5)
Fazenda	31	14	(45,1)	01	(3,2)	--	
Acapú	09	01	(11,1)	01	(11,1)	01	(11,1)
Piquiatuba	14	03	(21,4)	04	(28,5)	01	(7,1)
Mocajatuba	31	15	(48,3)	13	(41,9)	05	(16,1)
Ururi	27	20	(74,1)	01	(3,7)	--	
Aracê	06	02	(33,3)	--		--	
Guajará	30	16	(53,3)	12	(40)	06	(20)
Maracajó	28	06	(21,4)	12	(42,8)	03	(10,7)
Ariri	49	21	(42,8)	27	(55,1)	11	(22,4)
Juçarateua	36	31	(86,1)	11	(30,5)	11	(30,5)
Santo Antonio do Tauá Pará	37	15	(40,5)	09	(24,3)	02	(5,4)
Genipaúba da Laura	50	01	(2)	24	(48)	--	

n (número total de animais avaliados); + (número de animais soropositivos); % (frequência)

Agrupando-se as localidades em um dendograma observa-se que existem dois grandes grupos (A e B) com 100% de confiança, sendo que o grupo A é subdividido em A1 e A2 com aproximadamente 70% de confiança. Algumas localidades dentro do grupo são geograficamente próximas ou não e encontram-se dentro de um mesmo ambiente favorável para o desenvolvimento da Leishmaniose Visceral Canina, corroborando assim, a análise de Cluster, que faz análise de conglomerados, sendo importante para se verificar os grupos de localidades relativamente semelhantes, ou seja, onde os cães têm maior probabilidade de serem soropositivos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Dendograma para demonstração gráfica com base na comparação das localidades que apresentaram cães sororeagentes ao ELISA, RIFI e ELISA+RIFI no município de Colares, estado do Pará - 2013.



2.4 DISCUSSÃO

O município de Colares é uma ilha e, de acordo com a Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA), faz parte do 2º Centro Regional de Saúde (CRS) junto com mais oito municípios e, nunca havia realizado inquérito sorológico canino para LVC.

No período de 2006 a 2011, seis municípios deste 2º CRS: Acará, Bujaru, Concórdia do Pará, São Caetano de Odivelas, Tomé-Açu e Vigia realizaram no LACEN-PA exames para o diagnóstico sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. pelas técnicas de ELISA e RIFI, onde foi registrado um total de 1.339 casos de LVC nesses municípios. Considerando que os cães são apontados como o principal reservatório doméstico do parasita e o município de Colares faz limite ao Norte e ao Leste com município de Vigia que, por conseguinte já registrou 29 casos de LVC, sendo, portanto um importante fator dentro do perfil epidemiológico da doença.

A avaliação da prevalência da LVC no município de Colares foi realizada através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando os métodos sorológicos ELISA e RIFI,

pois segundo Laurenti (2009) esses métodos constituem um instrumento importante no diagnóstico da LVC. Para tanto, foram seguidas as recomendações do Ministério da Saúde, que indica o ELISA para triagem e a RIFI para a confirmação dos cães sororeagentes ao ELISA, sendo que a utilização de duas técnicas na busca de um único diagnóstico permite a execução de uma sorologia confiável (BRASIL, 2006).

Neste estudo todas as amostras foram analisadas pelos dois métodos sorológicos e, para evitar o máximo da ocorrência de reações cruzadas, foi utilizado o Kit-ELISA S7 que tem uma proteína recombinante do antígeno *Leishmania chagasi* HSP-70, pois de acordo com Leal (2009) essas reações cruzadas podem ser minimizadas pelo uso de antígenos recombinantes ou purificados, assim Alves e Bevilacqua (2004) referem que a identificação desses antígenos, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos testes sorológicos, tem contribuído para melhorar a sensibilidade e a especificidade destes métodos. Nesse sentido, apenas os soros que reagiram aos dois métodos foram considerados positivos para a determinação da soroprevalência.

A prevalência de 9,9%, determinada através do ELISA e RIFI, no município de Colares, ainda que não seja uma área considerada endêmica para LVC, encontra-se dentro dos parâmetros já relatados para regiões endêmicas, pois de acordo com Alvar et al. (2004) a prevalência da LV clínica em cães sem profilaxia em áreas endêmicas está estimada entre 2 a 10%. Ferrer (1999) afirma que essa variação nos valores da prevalência pode acontecer principalmente devido ao estágio da infecção, número de amostras, natureza do antígeno e testes sorológicos empregados.

A soroprevalência encontrada neste estudo foi superior ao município de Campos de Goytacazes-RJ, onde foram selecionados 370 cães errantes, 6 (1,6%) foram positivos (TÁVORA et al., 2007) e, também a de três distritos do município de Salvador, que dos 811 cães avaliados, apenas 6 (0,7%) foram soropositivos (BARBOZA et al., 2009).

Entretanto, apresentou-se inferior aos municípios de São Domingos do Capim-PA, que obteve 44,57% (119/267) dos cães reagentes (DAMASCENO et al., 2012) e de Varzelândia-MG, com prevalência de 10,86% dos 571 cães analisados (GOMES, 2007).

Muitos estudos sobre prevalência da LVC já realizados no Brasil utilizaram para o diagnóstico sorológico somente o ELISA ou a RIFI, o que pode determinar um resultado bastante variável.

Assim, ao analisarmos a prevalência encontrada no município de Colares de 42,8% quanto à soropositividade somente no ELISA a mesma foi superior àquelas observadas nos

municípios de Petrolina-PE (SANTANA et al., 2010) e Barcarena-PA (JESUS et al., 2011), com índices de 19,33 e 26,2%, respectivamente.

Porém foi inferior a encontrada no município de Juruti-PA (CARDOSO, 2009) e de Bauru-SP (CAMARGO, 2008), com 45 e 82%, respectivamente.

Considerando o resultado da 27,6% de prevalência na soropositividade determinada na RIFI, esse valor foi superior ao encontrado em Belém-PA (SCHWANKE et al., 2012) e Araripina-PE (OLIVEIRA, 2011), onde tiveram como resultado 9,8 e 10,25%, respectivamente.

Contudo foi inferior aos municípios de Barcarena-PA (JESUS et al., 2011) e Paulista-PE (DANTAS-TORRES, 2006), que apresentaram 37,5 e 40,3%, respectivamente.

Dantas-Torres (2009) refere que vários estudos tentam avaliar os fatores de risco associados à infecção em cães no Brasil, principalmente aqueles inerentes ao cão, como sexo, faixa etária, raça, tamanho e tipo do pelame, estado geral e sintomatologia clínica e, mais ainda de que as discordâncias aparentes entre os estudos possam refletir na natureza local da leishmaniose visceral canina.

Com relação a variável sexo, os resultados aqui encontrados estão de acordo com Almeida et al. (2010) e Santos et al. (2010) que não observaram predisposição sexual. Todavia Julião et al. (2007) e Medeiros et al. (2008) observaram predisposição nos cães machos, enquanto que Amóra et al. (2006) encontraram um percentual maior entre as cadelas do meio rural.

Quanto a variável faixa etária, os dados aqui referidos estão em concordância com os de Dantas-Torres (2006) e Medeiros et al. (2008) onde observaram uma positividade sorológica estatisticamente significativa nos cães jovens, o que pode estar associado à imaturidade imunológica, tornando-os bastante vulnerável em contrair a infecção e evoluir uma doença sintomática, com a positividade sendo mais facilmente observada nas reações sorológicas. Porém, esse resultado discorda dos encontrados por Almeida et al. (2010) que descreveram ser mais frequente em cães adultos, como também aos de Santos et al. (2010) e Silva et al. (2010) de que não há predisposição quanto a idade.

A variável raça não foi analisada estatisticamente, pois todos os cães sororeagentes apresentavam-se sem padrão de raça definida, uma vez que Dantas-Torres (2009) refere que a maioria dos cães que vivem em áreas rurais e suburbanas são cães sem raça definida. Contudo em alguns estudos como os realizados por Medeiros et al. (2008) e Silva et al. (2010) onde esta variável foi analisada, não observaram significância estatística quanto à soropositividade.

Porém França-Silva et al. (2003) encontraram uma maior prevalência para os cães de raça Cocker Spaniel e Boxer.

E, no que se refere a variável classificação clínica, os cães foram classificados como assintomáticos e sintomáticos, quando apresentaram pelo menos uma alteração clínica sugestiva da doença e tiveram como parâmetros analisados a perda de peso, alterações cutâneas, alterações oculares, linfadenomegalia e onicogribose. Sendo demonstrado pelos cães sororeagentes uma expressiva significância estatística para a forma sintomática da LVC, concordando com os estudos realizados por Martins (2008) e Almeida et al. (2010) onde os cães infectados encontravam-se sintomáticos.

Todavia Baneth e Aroch (2008) referem que estudos populacionais em áreas endêmicas têm demonstrado que uma proporção da população canina desenvolve uma doença sintomática, outra tem infecção assintomática persistente, enquanto ainda outra é resistente à infecção ou intermitentemente resolve sem desenvolver sinais clínicos. Não obstante Moshfe et al. (2009) referem que estudos soroepidemiológicos da leishmaniose canina têm revelado um grande número de animais soropositivos assintomáticos, dessa forma, os cães assintomáticos infectados por *Leishmania*, bem como os sintomáticos, podem ter um papel importante na manutenção da infecção e, provavelmente, no estabelecimento do ciclo doméstico de transmissão do parasita nas áreas endêmicas de LV.

Quanto às alterações clínicas, considerando o que foi mencionado por Baneth (2010) onde os principais sinais clínicos observados associados à LVC são lesões dérmicas (com descrição de uma forma leve de dermatite), linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose e condição corporal deficiente, os cães do referido estudo foram avaliados na presença da maioria desses sinais como, perda de peso que foi assim identificada pelas informações dos proprietários e observada pelo estado de magreza e caquexia. Alterações cutâneas onde as condições principalmente de pelo sem brilho, com alopecia, dermatites, foram levados em consideração. Alterações oculares principalmente pela presença de secreção ocular. Linfadenomegalia que foi determinada quando na inspeção era observado um aumento dos linfonodos e confirmada pela palpação. Onicogribose que foi qualificada pelo crescimento anormal do tamanho das unhas.

As alterações clínicas mais frequentes entre os cães sororeagentes foram onicogribose e alterações cutâneas à semelhança do que Azevedo et al. (2008) e Dias et al. (2008) relataram em seus estudos.

O município de Colares apresenta um ambiente favorável para o desenvolvimento da LVC, 70% da população vive na zona rural e muitos moradores possuem baixos índices

socioeconômicos. As localidades mostraram na sua maioria as mesmas características, com habitações de pau a pique e madeira, com ausência de saneamento básico e coleta de lixo, localizando-se próximas das matas, rios e igarapés, possuindo abrigo e criação de animais domésticos, sendo bastante frequente observar a convivência de animais domésticos e selvagens no domicílio, o que segundo Boraschi e Nunes (2007) todos são fatores que favorecem a concentração de flebótomos proporcionando assim condições apropriadas para um maior risco de transmissão da doença.

A distribuição e o agrupamento das localidades que foram relativamente semelhantes à soropositividade encontrada no ELISA, na RIFI e/ou no ELISA+RIFI através do dendograma foi importante para classificá-las quanto às características que podem ser analisadas no que se refere à transmissão da LVC, pois segundo Brasil (2006) as taxas de prevalência encontrada em cada setor devem ser avaliadas, permitindo assim receber monitoramento, a fim de identificar as áreas prioritárias a serem trabalhadas.

2.5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo são a primeira confirmação da presença de anticorpos anti-Leishmania spp. em cães no município de Colares, estado do Pará, determinando uma soroprevalência para LVC de 9,9%, com cães reagentes confirmados no ELISA e RIFI. A frequência entre os dois métodos sorológicos foi maior no ELISA. A sorologia positiva não foi relacionada com a variável sexo, porém, está associada a faixa etária e classificação clínica. Os cães sintomáticos que apresentaram onicogribose e alterações cutâneas foram os mais frequentes. A distribuição das localidades em grupos que foram relativamente semelhantes à soropositividade encontrada foi fundamental para identificar as áreas que devem ser monitoradas, visto que, todas as localidades encontram-se dentro de um mesmo ambiente favorável para o desenvolvimento da doença, indicando que medidas de controle devem ser aplicadas na população canina a fim de evitar casos humanos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, jul. 2010.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, sep. 2004.

ALVES, W. A. e BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, jan./fev. 2004.

AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, nov./dez. 2006.

ANDRADE, C. R.; KIDO, E. A.; LUNA, L. K. S.; MELO, M. A.; ANDRADE, P. P.; BALBINO, V. Q. **Diagnóstico laboratorial das leishmanioses**. In: LEISHMANIOSES - MANUAL ON LINE. Gentrop. Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: <[http://www.ufpe.br/biomol/Microsoft%20Word%20-%20Apostila Leishmaniose _Formatada&Revista1.pdf](http://www.ufpe.br/biomol/Microsoft%20Word%20-%20Apostila%20Leishmaniose%20Formatada&Revista1.pdf)>. Acesso em: 28 jan. 2013.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 324 p.

AZEVEDO, M. A. A.; DIAS, A. K. K.; DE PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; NUNES, C. M. Avaliação da Leishmaniose Visceral Canina em Poxoréo, Estado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 3, p. 123-127, jul./set. 2008.

BANETH, G. Canine leishmaniasis. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 35., 2010, Geneva. **Proceedings...** Geneva: Switzerland, 2010.

_____ e AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, n. 1, p. 14-15, jan. 2008.

BARBOZA, D. C. P. M.; LEAL, D. C.; SOUZA, B. M. P. S.; CARNEIRO, A. J. B.; GOMES NETO, C. M. B.; ALCÂNATARA, A. C.; JULIÃO, F. S.; MOURA, S. A. B.; PERALVA, L. M. P.; FERREIRA, F.; FRANKE, C. R. Inquérito epidemiológico da leishmaniose visceral canina em três distritos sanitários do Município de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 2, p. 434-447, abr./jun. 2009.

BORASCHI, C. S. S. e NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, p. 44-48, nov./dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.

CAMARGO, J. B. **Elucidação diagnóstica na Leishmaniose visceral canina para a vigilância epidemiológica e controle desta zoonose**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, São Paulo, v. 10, n.1, p. 143-169, 1974.

CARDOSO, J. F. **Estratégias para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em ações de vigilância**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

DAMASCENO, Á. R.; SILVA, A. F.; PRADO, W. S.; CALDEIRA, R. D.; MORAIS, R.; FARIAS, D. M.; SILVA, L. C. O.; SAMPAIO JÚNIOR, F. D.; CAVALCANTE, G. G.; SCOFIELD, A. Pesquisa de *Leishmania infantum chagasi* em cães de áreas rurais de São Domingos do Capim, Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012, São Luis. **Anais...** São Luis: MA, 2012. p. 203.

DANTAS-TORRES, F. **Epidemiologia da Leishmaniose visceral no município de Paulista, estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

_____. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, mar. 2009.

DIAS, E. L.; BATISTA, Z. S.; GUERRA, R. M. S. N. C.; CALABRESE, K. S.; LIMA, T. B.; ABREU-SILVA, A. L. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 3, p. 740-745, jul./set. 2008.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: AN UPDATE, 1999. Barcelona, **Proceedings** ... Barcelona: Spain, 1999. p. 6-10.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VIEIRA, E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTE-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2-3, p. 161-173, feb. 2003.

GOMES, L. V. **Prevalência da Leishmaniose visceral canina na zona rural do município de Varzelândia, Minas Gerais, Brasil, 2005**. 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

INSTITUTO DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, SOCIAL e AMBIENTAL DO PARÁ (**IDESP**). Secretaria de Estado de Planejamento. Estatística Municipal - Colares, 2012. Disponível em: <[http://www.idesp.pa.gov.br/pdf/Estatística Municipal/Colares.pdf](http://www.idesp.pa.gov.br/pdf/Estatística_Municipal/Colares.pdf)>. Acesso em: 01 set. 2012.

JESUS, R. C.; MELO, C. C.; PIRES, R. N. B.; BRANDÃO, J. A.; MACHADO, R. S.; COELHO, R. N.; FERREIRA, L. J. C.; RAMOS, P. K.; CAMPOS, M. B.; CARNEIRO, L. A.; LIMA, L. V. R.; SILVEIRA, F. T. Avaliação da concordância diagnóstica entre a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação imunoenzimática (ELISA) na infecção canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* no Estado do Pará, Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 27.; REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, 15., 2011, Uberaba. **Anais ...** Uberaba: MG, 2011. p. 204.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA JR, E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, p. 319-324, ago. 2007.

LAINSON, R. e SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 10. ed., v. 5, London: Arnold, 2005. cap. 17, p. 313-349.

LANGONI, H. **Aspectos gerais da leishmaniose visceral canina e situação no Estado de São Paulo**, ago. 2008. Disponível em: <<http://cni.inta.gov.ar/helmintho/Congreso%20Brasil%202008/ASPECTOS%20GERAIS%20DA%20LEISHMANIOSE%20VISCERAL%20CA%E2%80%A6.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2012.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 67, p. 13-23, jul. 2009.

LEAL, C. R. B. Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 6, n. 69, p.14-18, set. 2009.

MARTINS, I. S. **Aspectos epidemiológicos e de hemostasia na Leishmaniose visceral canina**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MEDEIROS, C. F. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. N. G.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, M. C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 33-40, jun. 2008.

MOSHFE, A.; MOHEBALI, M.; EDRISSIAN, G.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; KAZEMI, B.; JAMSHIDI, S.; MAHMOODI, M. Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 112, n. 2, p. 101-105, nov. 2009.

OLIVEIRA, E. N. **Soroprevalência de anticorpos anti-Leishmania em cães domiciliados na cidade de Araripina, sertão de Pernambuco**. 2011. 26 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

SANTANA, M. A.; PIMENTEL, D. S.; MAIA, C. S.; RAMOS, R. A. N.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina no município de Petrolina. In: JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX, 10., 2010, Recife. **Anais ... Recife: UFRPE**, 2010.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos anti-Leishmania spp em cães de Garanhuns, Agreste de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 1, p. 41-45, jan./fev. 2010.

SCHWANKE, K.; SILVA, A. M. M.; PRADO, W. S.; BAHIA, M.; PACHECO, A.; LIMA, D. H. S.; ARAGÃO, S. K. S.; SILVEIRA, F. T.; CAVALCANTE, G. G.; SCOFIELD, A. A. Diagnóstico sorológico e molecular de *Leishmania infantum* chagasi em cães no município de Belém, Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012. São Luis. **Anais...** São Luis: MA, 2012. p.199.

SILVA, F. T. S.; SANTOS, J. T.; NETTO, E. M.; BAVIA, M. E.; NAKATANI, M.; SOUZA, F. D. P.; CARDIM, L. L.; CARNEIRO, D. D. M. T. Aspectos clínicos da Leishmaniose Visceral canina no Distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 34, n. 4, p. 783-795, out./dez. 2010.

SILVA, R. M.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. C.; NOGUEIRA, Y. L. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 1044-1053, dez. 2009.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 4, p. 482-483, jul./ago. 2007.

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I – DADOS SOBRE A PESQUISA**

Título da Pesquisa: Ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina no município de Colares, no estado do Pará.

Pesquisadoras: Márcia Janete de F. M. de Figueiredo - Aluna de Pós-graduação/UFRA (Mestranda) e Nazaré Fonseca de Souza - Professora Doutora/UFRA

A Leishmaniose é uma zoonose, doença grave, causada por um protozoário chamado *Leishmania* que atinge principalmente o homem e o cão. No Pará, muitos casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) têm sido registrados em vários municípios é até o momento não existe nenhum estudo a respeito da ocorrência de Leishmaniose em cães no município de Colares, esta pesquisa é muito importante por ser a primeira realizada sobre a sorologia da LVC em cães nos bairros e localidades das zonas rurais deste município. Objetivamos verificar a ocorrência de leishmaniose visceral canina no município de Colares, no estado do Pará, o que irá contribuir para o diagnóstico da leishmaniose no Estado e, também levantar informações sobre epidemiologia dessa doença. Mensalmente, será coletado sangue dos cães e aplicado questionário aos proprietários dos animais, que serão muito importantes na avaliação dos fatores de risco que podem estar envolvidos na transmissão da leishmaniose visceral canina. Os resultados da pesquisa serão encaminhados a Coordenação de Leishmaniose do Departamento de Controle de Doenças Transmissíveis por Vetores (DCDTV) da Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará e a Secretaria Municipal de Saúde de Colares, para indicar as ações a serem empregadas de acordo com a situação epidemiológica do município de Colares.

Fui informado, como proprietário do cão, de que tenho a liberdade de escolher entre participar ou não deste estudo, sem sofrer qualquer tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente, assim como, não terei nenhuma forma de despesa em fase alguma da pesquisa. Os dados fornecidos serão confidenciais e serão apresentados apenas

numericamente em divulgações científicas e mantidos no anonimato. Também poderei retirar o consentimento a qualquer tempo sem prejuízo algum.

Em caso de dano pessoal, provocado diretamente pela pesquisa, os participantes terão direito as indenizações legalmente estabelecidas pela Lei Nº 569, de 21 de dezembro de 1948; Lei Nº 11.515, de 28 de agosto de 2007, além do previsto no Artigo 927 do Código Civil de 2002 (Da obrigação de Indenizar).

Dentre os riscos e benefícios para a participação temos: 1º) a avaliação do animal sob o aspecto clínico; 2º) a contribuição do proprietário no estudo para a busca de um controle mais seguro da doença; 3º) o possível constrangimento do proprietário do cão nessa pesquisa; 4º) a submissão do proprietário à contenção do seu cão para a realização do processo de punção venosa, na qual os materiais utilizados estarão estéreis e a técnica será corretamente aplicada por um Médico Veterinário, a fim de evitar lesões e sofrimento desnecessários ao animal e 5º) a realização do processamento das amostras em laboratório universitário por profissionais devidamente capacitados, com o intuito de minimizar a possibilidade de erros.

Os materiais de procedimentos usados nas coletas de sangue, como também o material biológico coletado, serão descartados em caixa descartex e armazenados no depósito de lixo patológico do Centro de Saúde do município de Colares, até o seu devido destino.

Caso queira mais informações sobre o projeto poderá obtê-las com:

Márcia Janete de F. M. de Figueiredo - UFRA - Tel.: (091) 3210-5177/5130

Portanto, convido o Sr. (a) para colaborar com a pesquisa assinando o consentimento e respondendo ao questionário.

II. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ser esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar da presente pesquisa.

Colares, PA _____ de _____ de _____

Assinatura do proprietário do cão
RG ou CPF _____

Assinatura do pesquisador
Márcia Janete de F. M. de Figueiredo

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

QUESTIONÁRIO PARA PESQUISA DE CAMPO **PRONTUÁRIO Nº:** _____

PROJETO: OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE COLARES, NO ESTADO DO PARÁ.
MESTRANDA: MÁRCIA JANETE DE FÁTIMA MESQUITA DE FIGUEIREDO - UFRA
ORIENTADORA: PROFª. DRª. NAZARÉ FONSECA DE SOUZA - UFRA

1 - IDENTIFICAÇÃO:

Nome do Animal/Canino:	
Sexo:	Tamanho:
Idade:	Cor do pêlo:
Raça:	Comprimento do pêlo: curto (< 3 cm) (); longo (> 3 cm) ()
Nome do Proprietário:	
Endereço:	
Perímetro:	
Bairro/Localidade:	CEP:
Cidade/Estado:	Telefone:
Família: Idosos (); Adultos (); Crianças ()	

2 - PROXIMIDADE DA MORADIA COM A MATA: SIM (); NÃO ()/MATA: PRIMÁRIA (); SECUNDÁRIA ()

3 - ORIGEM DO ANIMAL: MUNICÍPIO DE COLARES (); OUTRO LOCAL _____

4 - VISITOU OU MOROU EM OUTRO LOCAL? SIM (); NÃO ()

QUAL: _____ / QUANTO TEMPO : _____

5 - NESSE LOCAL TINHA MOSQUITO? SIM (); NÃO (); NÃO SABE ()

6 - PASSOU PELO MENOS UMA NOITE FORA DA COMUNIDADE? SIM (); NÃO ()

ONDE: _____

7 - TEM ACESSO A RUA? SIM (); NÃO ()

8 - LOCAL ONDE PERMANECE DURANTE O DIA:

DENTRO DE CASA (); NO QUINTAL (); OUTRO () _____

9 - LOCAL ONDE DORME:

DENTRO DE CASA (); FORA DE CASA (); OUTRO () _____

10 - HÁ QUEIXA DE MOSQUITOS? SIM (); NÃO ()

11 - PERÍODO DE MAIOR QUEIXA: MANHÃ (); TARDE (); NOITE ()

12 - TEM ACESSO A ÁGUA NÃO TRATADA? SIM (); NÃO ()

13 - TEM ACESSO À LIXO? SIM (); NÃO ()

14 - TEM CONTATO COM OUTROS ANIMAIS DOMÉSTICOS? SIM (); NÃO ()

QUAL: _____ / QUANTOS: _____

15 - TEM CONTATO COM ANIMAIS SILVESTRES? SIM (); NÃO ()

QUAL: _____ / QUANTOS: _____

16 - AVALIAÇÃO DO ANIMAL:

ESTADO NUTRICIONAL: ÓTIMO (); BOM (); REGULAR (); PÉSSIMO ()

PRESENÇA DE LESÃO CUTÂNEA: ÚNICA (); MÚLTIPLA (); ULCERADA (); NODULAR ()

LOCAL DA LESÃO: _____

- SINTOMAS:

PERDA DE PESO (); ALTERAÇÕES CUTÂNEAS (); ALTERAÇÕES OCULARES (); LINFADENOMEGALIA ();

ONICOGRIFOSE ();

17 - RESULTADO DOS EXAMES/IMUNOLÓGICO PARA LVC:

ELISA: _____ / RIFI: _____

ANEXO 1 - Aprovação do CEUA



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 48/11

Título do Projeto de Pesquisa: **Ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina no Município de Colares, Estado do Pará.**

Pesquisador Responsável: **Prof. Dra. Nazaré Fonseca de Souza.**

Instituição: **Universidade Federal Rural da Amazônia.**

Data do Parecer: 09/03/12.

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

LIBERADO para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega neste CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 09 de março de 2012.

Rosa Helena de F. Chaves
MÉDICA VETERINÁRIA
CRMV/PA 2029

M.V. Esp. ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES
VICE-COORDENADORA DO CEUA/UEPA

ANEXO 2

Socorro Técnico

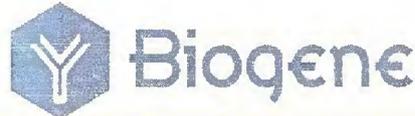
Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 3074-3778 ou por e-mail servio@biogene.ind.br.

Resp. Téc. Gilzane Dantas Nobrega
Médica Veterinária CRMV - PE - 3881

Produzido e Fabricador por:
Biogene Indústria e Comércio Ltda ME
Rua Costa Sepúlveda, 749
Engenho do Meio - Recife - PE
CEP 50.730-260
CGC.: 69.951.234/0001-10
Insc. Est.: 0198256-76
Fone/Fax: 81 - 3074-3778 ou 8888.9072
E-mail: servio@biogene.ind.br
MAPA Licença n°. 7434/2000
Indústria Brasileira



Validade e data de fabricação na embalagem



Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para uso veterinário

A **Biogene** é uma empresa de base biotecnológica instalada na incubadora de empresas da UFPE (POSITIVA). Seu principal objetivo é o desenvolvimento e a industrialização de produtos diagnósticos veterinários, dentro do moderno conceito da tecnologia do DNA recombinante.

O Teste de ELISA

A reação de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) é baseada na ligação de anticorpos específicos a antígenos fixados em um suporte plástico. Os anticorpos ligados são então reconhecidos por uma proteína conjugada a uma enzima (peroxidase), que permite a visualização da reação.

O ELISA/S7®

O **ELISA/S7®** tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - **ELISA/S7®** confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado^(1,2,3 e 4).

Apresentação

O kit é composto de cinco placas de ELISA prontas para o teste (sensibilizadas e neutralizadas) e de todos os reagentes necessários a realização de 480 reações.

Produto	Volume
Solução de Lavagem (PBS 10x)	100 ml
Solução de Lavagem (PBST 10x)	100 ml
Solução de Diluição	80 ml
Solução Citrato	60 ml
Solução de Parada (H ₂ SO ₄ - 2N)	50 ml
Revelador (TMB)	700 µl
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	400 µl
Soro Controle não Reagente (1:10)	100 µl
Soro Controle Reagente (1:10)	100 µl
Conjugado (PtnA - PO)	15 µl

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses nas condições de armazenagem indicadas nesta bula.

Transporte

O Kit **ELISA/S7®** pode ser transportado à temperatura ambiente, por até 10 dias, sem comprometimento da estabilidade de seus componentes.

Estabilidade e Conservação

Todos os reagentes são estáveis desde que mantidos em geladeira (4°C) até o período de vencimento indicado na embalagem.

Atenção

- Usar EPIs durante todas as etapas de execução do teste.
- É necessário um segundo soro controle não reagente (não fornecido no kit) para cálculo do ponto de corte.
- Não utilizar nenhuma solução gelada. As Soluções de Lavagem podem apresentar formação de cristais, que dissolvem facilmente no momento da diluição.
- As Soluções de Lavagem PBST e PBS estão 10x concentradas e deverão ser previamente diluídas em água destilada (completar cada volume para um litro). Verificar o pH 7,4 se necessário ajustar com NaOH.
- Nas lavagens manuais com pissetas, o jato de tampão deve ser forte e dirigido diretamente ao fundo do poço. Na lavagem com PBST ocorre a formação de bolhas: recomendamos uma 4ª lavagem só com PBS. As soluções devem ser desprezadas da placa invertendo-a de uma só vez.
- A diluição do conjugado e o preparo da solução reveladora só deverão ser feitos no momento do uso.
- Considerando que ocorrem perdas durante a pipetagem devem ser preparados volumes um pouco acima do mínimo necessário.
- Se a placa não for toda utilizada, as tiras restantes devem ser guardadas em sua embalagem original vedada e mantidas em geladeira.
- Nunca misture componentes de lotes diferentes.

Procedimentos**1. Diluição dos soros**

O volume de solução por poço é de 100µl. A diluição padrão da reação é de 1:100.

Os soros em teste devem ser diluídos em Solução de Diluição e incubados por pelo menos 2 horas a temperatura ambiente ou 12 horas na geladeira (4°C). Os soros hemolisados devem ser neutralizados (incubados por 20 minutos a 56°C).

a) Soros teste

As amostras podem ser diluídas a 1:100 (1µl do soro em 100µl da Solução de Diluição) ou alternativamente 1:10 (5µl do soro em 45µl da Solução de Diluição) e logo após 1:10 (10µl da primeira diluição em 90µl de Solução de Diluição).

b) Soros controles

Os soros controles pré-diluídos 1:10 devem ser diluídos mais 10x no momento do uso.

	Soro	Sol. de diluição	Volume final
Soro controle	10µl	90µl	100µl

2. Realização dos testes

- No primeiro poço (A1) colocar 100µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA (indispensável em alguns equipamentos).
- Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com PBST (veja tópico: Atenção c, d, e).
- Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (PtnA - PO). Esta solução deve ser preparada na hora, diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST (1:10.000). Descarte a sobre esta solução.
- Incubar por 30 minutos a T.A.

h) Lavar a placa 3 vezes com PBS.

- Preparar a solução de revelação conforme o quadro abaixo e distribuir 100µl por poço.

	Sol. Citrato	TMB	Água Oxigenada
1 tirinha	1 ml	10µl	5µl
¼ placa	5ml	50µl	25µl
1 placa	10ml	100µl	50µl

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

- Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- Acrescentar duas gotas ou 100µl por poço da Solução de Parada.
- Secar e limpar bem o fundo da placa antes da leitura.
- Efetuar a leitura em leitor de ELISA a $\lambda = 450$ nm.

Determinação do título das amostras reagentes

Para determinar o título realizar diluições seriadas das amostras reagentes a partir de 1:100.

Crítérios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles não reagentes devem ser sempre inferiores a 0,160 e as D.Os dos controles reagentes devem ser sempre superiores a 0,300.

Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. dos soros controles não reagentes e somar ao fator $R = 0,142$. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte 0,03.

Desempenho do teste

Com base em estudos realizados em parceria com as universidades UFPE, UFCG e UFRN, o kit ELISA/S7[®] apresentou especificidade média de 94,3% podendo alcançar 100%, enquanto que a sensibilidade média foi de 89% podendo alcançar 96,4%.

O Kit ELISA/S7[®] e as vacinas contra o calazar canino

Por ter como base um peptídeo recombinante, o Kit ELISA/S7[®] não reage cruzadamente com os anticorpos vacinais gerados pelas vacinas atualmente disponíveis no mercado nacional ⁽³⁾. Sendo assim, testes realizados com soro de cães vacinados continuam dando resultados negativos. A positividade só ocorre se o animal estiver realmente infectado.

Referências

- Andrade, C.R. e Andrade, P.P. (1995) - Recombinant *Leishmania* proteins in the diagnosis of human kala-azar. In "Research and Control of Leishmaniasis in Brazil", edit. S. Brandão Fo., FOC/CpqAm, Recife, 217 - 227.
- Andrade, P.P. e Andrade, C.R. (1995) - Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In "Stress Proteins in Medicine", edit. W. van Eden, Marcel Dekker Publish. Co., N. Y., EUA, 1985, pgs 308-326
- Andrade, P.P., Santos, E.S.C., Kido, E.A., Queiroz, I.M., Luna, L.K.S., Torquato, G.N., Balbino, V.Q. (1998) - Assessment of a recombinant *Leishmania* HSP70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. In "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz". Vol. 93, Suppl II, 217.
- Queiroz, I.M., Santos, E.S.C., Andrade, P.P. (1997) - Aumento e Estabilidade da Expressão de Proteínas Recombinantes de *L. chagasi* e *T. cruzi* para fins de Produção Industrial em Vetores Plasmidiais. Brazilian Journal of Genetics. Vol. 20 Suppl. III, 194.
- Santos, E.S.C., Andrade, P.P., Menz, I., Queiroz, I.M. (2007) - Discriminação sorológica entre animais infectados e vacinados pela vacina Leishmune[®] com o kit ELISA/S7 - Biogene[®]. Revista de Patologia Tropical, v 36, suplemento 2.