

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“SOROEPIDEMIOLOGIA DE *Leishmania (L.) chagasi* EM CÃES NO MUNICÍPIO
DE PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL.”

MARIANA CAETANO TEIXEIRA

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“SOROEPIDEMIOLOGIA DE *Leishmania (L.) chagasi* EM CÃES NO MUNICÍPIO
DE PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL.”

Autor: Mariana Caetano Teixeira

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva e patologia, Especialidade
Parasitologia no Programa de Pós-graduação
em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Orientador: Dr^a. Verônica Schmidt

Co-orientadora: Dr^a. Neusa Saltiel Stobbe

PORTO ALEGRE
M.V MARIANA CAETANO TEIXEIRA
ABRIL, 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Caetano Teixeira, Mariana
SOROEPIDEMIOLOGIA DE Leishmania (L.)
chagasi EM CÃES NO MUNICÍPIO DE PORTO
ALEGRE, RIO GRANDE DO
SUL." / Mariana Caetano Teixeira. -- 2014.
71 f.

Orientadora: Verônica Schmidt
Coorientadora: Neusa Saltiel
Stobbe.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2014.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Porto Alegre.
3. Sorologia. 4. cães. I. Schmidt, Verônica, orient. II.



UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Leishmania (L.) chagasi* EM CÃES NO
MUNICÍPIO DE PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL.

Aprovada em 25 de abril de 2014

APROVADA POR:

Dr^a Verônica Schmidt

Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Jerônimo Lopes Ruas (UFPel)

Membro da Comissão

Dr. Daniel Guimarães Gerardi

Membro da Comissão

Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Ecil e Nádía. Muito Obrigada pelo amor, educação e confiança que sempre recebi de vocês. Espero poder ser sempre motivo de orgulho.

Às minhas irmãs, Marcela e Bruna, por estarem sempre ao meu lado incondicionalmente. O amor e a parceria de vocês foi importante para a conclusão dessa longa etapa. Amo vocês.

À toda minha família, meu sincero agradecimento pela compreensão em todos os momentos difíceis de ausência e pelo incentivo de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Flávio Antônio Pacheco de Araujo, pela grande oportunidade, confiança e pela amizade que criamos. Obrigada!

Aos meus colegas do Laboratório de Protozoologia da UFRGS, meu sincero agradecimento pela ajuda de sempre, pelas orientações e pelo crescimento que conquistamos juntos.

Às minhas amigas da vida toda, um agradecimento mais do que especial. Vocês transformaram esse período em um momento mais alegre e divertido. São elas: Alice, Francine, Carolina, Fernanda, Latifa, Renata, Vanessa e muitas outras. Foi mais fácil com a companhia de vocês sempre ao meu lado.

Aos amigos que a UFRGS me presenteou. Levo vocês junto comigo para a vida toda. Obrigada pela amizade e pelo incentivo. Às minhas bolsistas Alessandra G. da Rocha e Juliana Bisol, muito obrigada pela parceira e pela oportunidade em ensinar e aprender. Obrigada também às amigas Fernanda Siqueira, Letícia Arruda e Juliana Herpich. Aos alunos que me ajudaram muito nas coletas, Renata, Ana e Eduardo, muito obrigado!

À professora Dra. Neusa Saltiel Stobbe, pela acolhida, pela confiança, orientação e pelo exemplo profissional. Muito obrigada de coração!

Agradeço imensamente a professora Dra. Verônica Schimdt, minha “nova” orientadora, pela calorosa acolhida, receptividade, atenção e ajuda para finalizar esse trabalho.

Agradeço a professora Valéria F. Marçal pela receptividade em seu laboratório e pela ajuda com a execução do ELISA. Aos funcionários do LACEN/RS, em especial a bióloga Raquel Ramos e a Ana I. Tartarotti pela ajuda.

Agradeço os funcionários e professores da UFRGS e do PPGCV desta Faculdade.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro na execução deste trabalho.

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses de caráter incurável que apresentam diversas manifestações clínicas no homem e tem o cão como seu principal reservatório no ambiente urbano. A Leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da parasitose e sua ocorrência tem aumentado no Brasil, apesar das ações dos órgãos de saúde pública. Até o ano de 2002, o Estado do Rio Grande do Sul era área indene para as leishmanioses humana e canina. Em 2003 foi registrado o primeiro caso humano da forma tegumentar e em 2006 e 2008 identificaram-se, respectivamente 3,5% e 30,5% de cães sororreagentes para *Leishmania* sp. em Porto Alegre/RS. Em 2009, foram confirmados os primeiros casos autóctones humanos de LV e caninos de Leishmaniose visceral canina (LVC) no município de São Borja/RS e registrada, pela primeira vez, a ocorrência do inseto vetor no estado. Em 2010, foi notificado o primeiro caso confirmado de LVC e identificados cães sororreagentes em Porto Alegre/RS. Tendo em vista a importância desta zoonose e as dificuldades de um diagnóstico confiável em cães, o presente estudo objetivou identificar aspectos epidemiológicos da LVC em cães em uma região com registros de casos no município de Porto Alegre/RS. Coletaram-se 300 amostras de sangue de cães desta região as quais foram testadas pelos métodos TR-DPP[®] e ELISA para diagnóstico de *Leishmania chagasi*. Um questionário epidemiológico foi aplicado durante entrevista com os tutores, contendo aspectos relativos à criação dos animais e fatores ambientais. Na área de estudo, observou-se presença frequente de lixo não acondicionado e saneamento básico precário nas moradias, além de extensas áreas de mata verde e pequenos sítios alternados com áreas urbanizadas. Verificou-se que 83% (250/300) dos cães não tinham raça definida, 58% (175/300) eram fêmeas, 78% (238/300) dormiam ao ar livre e 61% (183/300) conviviam com outras espécies animais. Clinicamente, observou-se que 90% (270/300) dos animais apresentavam infestação por ectoparasitos, 70% (210/300) apresentavam alterações dermatológicas, 24% (72/300) emagrecimento e anorexia e 22% (65/300) alterações oculares. Os resultados dos testes sorológicos foram 100% concordantes uma vez que as mesmas três amostras (1%) apresentaram reação positiva e as demais 297 (99%) foram negativas em ambos os métodos diagnósticos. Concluiu-se que, apesar da baixa prevalência de cães soropositivos para *L. chagasi*, existem condições de transmissão de LVC, com risco de LV para a população humana no município de Porto Alegre.

Palavras Chave: Leishmaniose Visceral, Cães, Diagnóstico Sorológico, Porto Alegre.

ABSTRACT

Leishmanioses are zoonoses of incurable character that present different clinical manifestations in the man and have the dog as its main reservoir in the urban environment. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the parasitosis and its incidence has been increasing in Brazil, despite the actions of public health authorities. To the year of 2002, the state of Rio Grande do Sul was unscathed to the human and canine Leishmanioses. In 2003, it was first recorded a human case of cutaneous leishmaniasis and in 2006 and 2008 were identified, respectively, 3.5% and 30.5% of seropositive dogs to *Leishmania* sp. in Porto Alegre/RS. In 2009, the first autochthonous human cases of VL and canine visceral leishmaniasis (CVL) were confirmed in the municipality of São Borja/RS and it was registered, for the first time, the occurrence of the vector insect in the state. In 2010 was reported the first confirmed CVL case and seropositive dogs were identified in Porto Alegre/RS. Given the importance of this zoonosis and the difficulties of a reliable diagnosis in dogs, this study goal was to identify epidemiological aspects of CVL and evaluate the performance of ELISA and TR-DPP® in the diagnosis of this disease in dogs on a region with records of cases in the city of Porto Alegre/RS. Blood samples were collected from 300 dogs of this region. An epidemiological questionnaire, containing aspects of care and management of the animals, was conducted during an interview with the owners. Within the study area, it was observed the frequent presence of unpacked garbage and poor sanitation in the homes, and large areas of green forest and small farms alternated with urbanized areas. It was found that 83% (250/300) dogs were of mixed breeds, 58% (175/300) were females, 78% (238/300) slept outdoors and 61% (183/300) coexisted with other animal species. Clinically, it was observed that 90% (270/300) of the animals had infestation by ectoparasites, 70% (210/300) had dermatological alterations, 24% (72/300) had weight loss and anorexia and 22% (65/300) had ocular disorders. The results of serological tests were 100% consistent since, in both diagnostic methods, the same three samples showed a positive reaction and the remaining 297 were negative. Despite the low prevalence of dogs seropositive for *L. chagasi*, it was concluded that there are conditions for the transmission of CVL, resulting in a risk of VL for the human population in the municipality of Porto Alegre.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, Dogs, Serological Diagnosis, Porto Alegre

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Definição	14
2.2 Histórico	14
2.3 Sistemática	14
2.4 Morfologia	15
2.5 Epidemiologia	17
2.5.1 Hospedeiros invertebrados	19
2.5.2 Hospedeiros vertebrados	20
2.5.3 Ciclo Biológico	21
2.5.4 Fisiopatogenia da LVC	22
2.5.5 Sinais clínicos nos cães	24
2.5.6 Métodos de Diagnóstico	26
2.6 Tratamento Canino	29
2.7 Medidas de Controle	30
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	44
CONCLUSAO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICE A	65
APÊNDICE B	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Forma promastigota de <i>Leishmania sp.</i>	16
Figura 2	Forma amastigota de <i>Leishmania sp.</i>	16
Figura 3	Vista lateral de flebotomíneo <i>Lutzomyia longiplapis</i> , principal vetor da LV.	19
Figura 4	Ciclo biológico do protozoário <i>Leishmania sp.</i>	21
Figura 5	Cão sintomático para LVC: A) apresentando emagrecimento severo; B) evidenciando aumento de linfonodo poplíteo.	25
Figura 6	A – Região metropolitana do município de Porto Alegre/RS; B- Distribuição dos bairros da cidade de Porto Alegre, com destaque para a região de estudo (círculo vermelho).	35
Figura 7	Área de estudo no município de Porto Alegre/RS, evidenciando o trajeto da Av. do Trabalhador: 1) Registro de cães soropositivos <i>Leishmania spp.</i> ; 2) Primeiro caso de LVC registrado no município.	36
Figura 8	Região da Lomba do Pinheiro, evidenciando a presença de cães errantes e de lixo em via pública.	39
Figura 9	Região do Bairro Lageado.	40
Figura 10	Cães que participaram do estudo evidenciando as condições de vida.	41
Figura 11	Características de uma residência amostrada: A) Presença de outras espécies de animais em uma das residências visitada; B) Galpão que servia de dormitório para os cães da propriedade.	42
Figura 12	Cartão do teste TR-DPP® evidenciando resultado positivo (T) em relação ao controle (C).	42
Figura 13	Placa de ELISA evidenciando a reação das amostras positivas.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentual

°C - Grau centígrado

µm - Micrômetro

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BR - Brasil

CCZS - Centro de controle de zoonoses

CEUA – Comissão de Ética no uso de Animais

CEVS - Centro Estadual de Vigilância em Saúde

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

ELISA - Ensaio imunoenzimático

FAVET- Faculdade de Veterinária

FEEPS - Fundação Estadual de Pesquisa e Saúde

FIOCRUZ - Fundação Instituto Oswaldo Cruz

hab - Habitantes

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN-γ - Interferon-gama

Ig - Imunoglobulina

IgG - Imunoglobulina G

IL-2 - Interleucina 2

IPB - Instituto de Pesquisas biológicas

Km² - Quilômetro quadrado

LACEN - Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral (humana)

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mm - Milímetros

Nº - Número

OMS - Organização Mundial de Saúde

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

RS - Rio Grande do Sul

SFM – Sistema Fagocítico mononuclear

TR-DPP® - Dual Path Platform- Bio-manguinhos

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

WHO - World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas primariamente uma zoonose podendo acometer o homem, quando este participa do ciclo de transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania*, transformando-se em uma antroponose. Atualmente, estão entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 2001; BRASIL, 2006; WHO, 2009).

São doenças causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Tripanosomatidae*, gênero *Leishmania*, que acometem o homem e diferentes espécies de mamíferos silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais (LEVINE et al., 1980; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; TASCA et al., 2009). Dependendo da espécie de *Leishmania*, assim como de outros fatores de seus hospedeiros, a manifestação clínica da doença pode ter características cutâneas, mucocutâneas ou viscerais (REY, 2008).

A leishmaniose visceral (LV) apresenta cerca de 500.000 novos casos humanos a cada ano (DESJEUX, 1996, WHO, 2009; BRASIL, 2003; DESJEUX, 2004) e a taxa de letalidade humana desta patologia pode alcançar até 100%, quando não tratada (SHARMA, 2009).

No Brasil, cerca de 3500 casos de LV humana foram notificados anualmente, com uma incidência média de dois casos por 100.000 habitantes e uma taxa de letalidade de 5,5 % nos últimos 12 anos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Em meados dos anos 1980, constatou-se uma mudança nos padrões epidemiológicos da LV, cuja ocorrência, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos (BEVILACQUA et al., 2001; MISSAWA et al, 2011). Esta dispersão da doença pode ser explicada por estar relacionada a fatores socioeconômicos que levaram um expressivo contingente da população rural a migrar para centros urbanos, contribuindo para as alterações epidemiológicas no complexo das Leishmanioses, como o surgimento de ciclos nitidamente urbanos, nos quais o cão se destaca como um dos elementos na cadeia de transmissão (ANDRADE, 1998, PEREIRA et al, 2008).

Devido a este fato, a LV passou a ser foco de preocupação para os órgãos de Saúde Pública (SILVA et al., 2011). Apesar das medidas de controle da infecção canina e humana já serem praticadas no Brasil há décadas, a ocorrência da LV tem aumentado, gradualmente, no país (LACERDA, 1994; BRASIL, 2003).

Até o final do ano de 2008, o estado do Rio Grande do Sul era considerado uma área indene para Leishmaniose Visceral humana e canina. No início do ano de 2009, foi confirmado pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) os primeiros casos autóctones da doença humana e canina no município de São Borja/RS (SOUZA et al., 2009). No mesmo município foi registrada pela primeira vez a ocorrência do inseto vetor no estado (*Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*). No mesmo ano foi notificada a ocorrência da doença em cães em mais seis municípios da região (Uruguaiana, Barra do Quaraí, Itaqui, Santa Maria e Porto Xavier) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2011).

Nos últimos dois anos, os municípios de Santa Cruz do Sul e Viamão, distantes da fronteira oeste, também apresentaram casos de Leishmaniose visceral canina (LVC), com confirmação através de provas sorológicas. Na cidade de Porto Alegre, em 2010, foi notificado o primeiro caso suspeito de LVC, confirmado logo após por testes sorológicos (TR-DPP e ELISA) e por técnicas de cultivo do protozoário. Outros cães soro reagentes foram identificados na mesma região da cidade. Foram realizadas capturas de flebotomíneos e identificada à presença das espécies *Nyssomya neivai*, *Migonemya mogonei* e *Pintomya fischeri*, sendo que as duas primeiras já foram incriminadas primária ou secundariamente na veiculação da *L. chagasi* no Brasil e em outros países (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010). Tendo em vista a importância desta doença na saúde pública e a recente identificação de sua ocorrência no Rio Grande do Sul, tornou-se imprescindível estudar sua epidemiologia na população canina de Porto Alegre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição

As leishmanioses são consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose. Atualmente encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL, 2006).

2.2 Histórico

As primeiras observações e a primeira descrição do protozoário foram realizadas por Borovsky, em 1898, na Rússia, em um paciente com a forma cutânea da doença. Em 1903, Leishman & Donovan, reconheceram o parasito nos casos de Leishmaniose Visceral (Calazar indiano) (PEREIRA et al., 2008). Segundo Rey (1991), foi Ross (1903) que em seus estudos denominou o parasito de *Leishmania donovani*.

Embora a descrição desses parasitos tenha ocorrido na transição entre os séculos XIX e XX, as infecções que eles ocasionam são conhecidas desde o ano 400 a.C e relatos detalhados de seu aspecto clínico datam do século V. A forma tegumentar desta parasitose é natural da América Latina, como atestam lesões características retratadas em peças de cerâmica e múmias pré-colombianas (VANNIER-SANTOS, et al., 2013).

2.3 Sistemática

Levine et al. (1980) descreveram a sistemática do gênero *Leishmania*:

Reino: Protista (Haeckel, 1866)

Sub-reino: Protozoa (Goldfuss, 1817)

Filo: Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963)

Sub-filo: Mastigophora (Deising, 1866)

Classe: Zoomastigophorea (Calkins, 1909)

Ordem: Kinetoplastida (Honigberg, 1963)

Sub-ordem: Trypanosomatina (Kent, 1880)

Família: Trypanosomatidae (Dofein, 1901)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Cerca de 30 espécies possuem potencial patogênico para o ser humano, das quais as mais importantes são:

- Sudgênero *Viannia* e *Leishmania* - *L.(V) major*, *L. (V) tropica*, *L. (V) mexicana*, *L. (V) braziliensis*, e *L.(L) amazonensis* – principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea ou a forma mais grave denominada mucocutânea.
- *L. (L) donovani*, *L.(L)infantum*, e *L. (L) chagasi* – responsáveis pela leishmaniose visceral.

Devido ao desenvolvimento de técnicas moleculares e a constatação de que a espécie *L (L) chagasi* é bioquimicamente e antigenicamente indistinguível da *L (L) infantum*, a tendência deve ser considerá-las como sendo o mesmo organismo (MAURICIO et al., 2001).

2.4 Morfologia

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear. Apresentam comportamento pleomórfico, e dois estádios são fundamentais no ciclo parasitário: promastigota e amastigota (NEVES, 2005).

A forma flagelada, denominada promastigota é alongada e apresenta um flagelo livre que emerge da região anterior (Figura 1). É a forma móvel do parasito e tem localização extracelular, sendo encontrada no tubo digestório do hospedeiro invertebrado e pode ser cultivada em diferentes meios de cultura. No citoplasma observa-se o núcleo que pode ser ovoide ou esférico situado na região central da célula (COURA, 2005). O núcleo é arredondado ou oval e está situado na região mediana. O cinetoplasto é geralmente ovoide e situa-se entre a extremidade da região anterior da célula. O tamanho das formas promastigotas é variável, mesmo dentro da mesma espécie, podendo medir entre 16,0- 40,0 x 1,5 x 3,0 µm, incluindo o flagelo, que

frequentemente é maior que o corpo do parasito. As promastigotas denominadas de metacíclicas, são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados, possuem flagelo muito longo, intensa mobilidade e são observadas livres nas porções anteriores do trato digestivo do inseto (NEVES, 2005).



FIGURA 1: Forma promastigota de *Leishmania sp.*

Fonte: <http://www.misodor.com/LEISHMANIOSE.php> > Acesso em 20/03/2014

A forma amastigota não possui flagelo livre, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, caracterizada como uma invaginação da membrana do parasito. O núcleo é grande e arredondado e o cinetoplasto tem forma de bastonete. Seu tamanho varia dependendo da espécie, podendo medir entre 1,5-3,0 x 3,0- 6,5 μ m (Figura 2). Este estágio do parasito é observado no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente nos macrófagos, dos hospedeiros vertebrados ou livres (MONTEIRO, 2012).

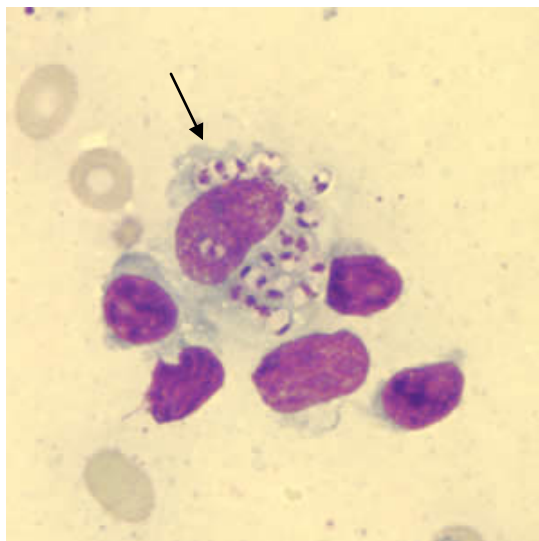


FIGURA 2: Forma amastigota de *Leishmania sp.*

Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/gallery.html#amasti1> > Acesso em 30/03/2014

2.5 Epidemiologia

Podem-se delinear dois ciclos epidemiológicos distintos para a leishmaniose visceral: o ciclo silvestre e o ciclo doméstico ou peri-doméstico. No ciclo epidemiológico silvestre estão envolvidos *Lutzomyia longipalpis* como vetor, e raposas como reservatórios. Ambos habitam nichos ecológicos ainda não perturbados pelo homem, como as áreas de floresta e sertão (LAURENTI, 2010).

O ciclo epidemiológico doméstico ocorre no ambiente rural ou periurbano onde está envolvido o flebotomíneo *L. longipalpis* como vetor, que se reproduz e se mantém no ambiente peri-domiciliar transmitindo a infecção para o homem e para o cão (TRAVI et al., 2001). Nessas condições, o cão tem papel importante na epidemiologia da doença, servindo de fonte de alimentação e de infecção para os insetos (BRASIL, 2006). Os cães têm sido encontrados infectados em todos os focos da doença humana e são considerados como o principal reservatório na cadeia de transmissão da LV no ciclo doméstico (SVOBODOVÁ et al, 2003). Os animais reservatórios, principalmente os cães, apresentam como característica o parasitismo cutâneo intenso, sendo comum também o isolamento do parasito no sangue. Por isso, constituem excelente fonte de infecção para os flebotomíneos, mantendo o ciclo da doença (GENARO, 2002). Além disso, os flebotomíneos se alimentam, por ordem de preferência, do sangue de aves, de cães e de humanos (NEVES, 2005).

A urbanização da leishmaniose visceral em várias cidades latino-americanas tem acontecido em decorrência do êxodo rural e formação de consequentes bolsões de pobreza urbanos (SANTAROSA:OLIVEIRA, 1997).

No Brasil, a migração indiscriminada da população rural para o meio urbano, acompanhada de seus animais domésticos como cães e gatos que podem se portar como reservatórios do parasita tem contribuído para o aumento do número de casos em áreas urbanizadas e em grandes cidades brasileiras como Campo Grande, Natal e Belo Horizonte, entre outras (JERONIMO et al., 2004; LAINSON & RANGEL, 2005; OLIVEIRA et al., 2006). A LV ocorre endemicamente em quase todo o território, e vem apresentando expansão e urbanização, porém muitos estudos ainda se fazem necessário

para o conhecimento da epidemiologia neste novo cenário (SATARORA:OLIVEIRA, 1997; GONTIJO;MELO, 2004; AZEVEDO et al., 2008).

A prevalência de anticorpos contra a espécie causadora da LVC é objeto de estudo em diferentes regiões do Brasil (Tabela 1), os resultados sorológicos variam de 1 a 38% (AZEVEDO et al., 2008; TASCA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; ASSIS et al., 2010). Estes valores podem variar com a região estudada, técnica de diagnóstico empregada e metodologia utilizada. A divergência de resultados entre exames sorológicos, possivelmente, ocorre em consequência dos diferentes protocolos utilizados nos diversos estudos publicados (METTLER et al., 2005).

Tabela 1 – Prevalência de anticorpos para *Leishmania (L.) chagasi* em cães, registradas em diversos inquéritos sorológicos no Brasil.

Estado	Frequência	Técnica	Referência
MT	22,1% 25%	RIFI* ELISA**	Almeida et al. (2012)
MT	7,8%	RIFI*	Azevedo et al. (2008)
MT	38%	RIFI*	Almeida et al. (2010)
SC	1,37%	RIFI*/ELISA**	Steindel et al. (2013)
BA	10,17%	ELISA**	Seixas et al. (2012)
BA	3,2% 6,7%	RIFI* ELISA**	Oliveira et al. (2010)
MG	10,6%	RIFI*/ELISA**	Borges et al. (2014)

*Reação de Imunofluorescência Indireta ** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

No estado do Rio Grande do Sul, os primeiros casos de leishmaniose humana datam de 2002, e foi confirmada a forma tegumentar da doença. No ano de 2007, o estado já era considerado uma zona de risco para a transmissão de Leishmaniose

Tegumentar para humanos (IESBICH, 2008). O primeiro caso autóctone de LV no estado foi no ano de 2008, no município de São Borja, no mesmo ano foi detectada a presença da *Lutzomyia longipalpis* no município (SOUZA et al., 2009). Levantamentos entomológicos na região identificaram a presença do vetor em alguns municípios (Barra do Quaraí, Uruguai, Itaqui e Porto Xavier). Neste mesmo período, cinco casos humanos da doença foram confirmados e um óbito foi registrado em São Borja (SOUZA et al., 2010).

Em estudos realizados em Porto Alegre/RS, pesquisadores analisaram amostras de 200 cães que residiam próximos a casos humanos confirmados de LTA e obtiveram uma positividade de 3,5% de amostras sororeagentes pelo método de RIFI (JESUS, 2006) e 30,5% pela técnica de ELISA (IESBICH, 2008); ambos os trabalhos utilizaram antígenos de *Leishmania spp.*

Porto Alegre registrou seu primeiro caso autóctone confirmado de LVC em agosto de 2010, quando foi identificado um canino no bairro Lageado (região peri-urbana do município), onde buscas entomológicas foram realizadas na região e não foi possível a identificação das espécies de flebotomíneos que possam estar envolvidas na transmissão (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), as áreas de transmissão para LV podem ser definidas em: área de transmissão, que são os locais com transmissão do protozoário, ocorrência do vetor e de casos humanos e caninos. As áreas sem casos ou silenciosas são os municípios sem registros de casos autóctones de leishmaniose visceral humana e canina, e as áreas com casos são aquelas onde ocorre o registro de pelo menos um caso autóctone de leishmaniose visceral humana ou canina. De acordo com essa definição, o Rio Grande do Sul hoje é classificado como área de transmissão (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2011) e o município de Porto Alegre pode ser considerado como área com casos, visto que já foram comprovados casos autóctones de LVC, mas não há registros de casos humanos até o momento.

2.5.1 Hospedeiros Invertebrados

Os vetores da leishmaniose visceral são flebotomíneos (Psychodidae: Plebotominae), conhecidos popularmente como mosquito palha ou birigui (BRASIL, 2006). No Brasil, especialmente duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Figura 3) (LAINSON et al., 1989;

MARCONDES, 2009). A primeira espécie é considerada a principal transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil, a *L. cruzi* foi como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (LAINSON et al, 1990; GALATI et al., 1996; SANTOS et al., 1998). No Brasil, a distribuição geográfica da *L. longipalpis* é ampla e parece estar em grande expansão territorial (BRASIL, 2003; BRASIL, 2006).



FIGURA 3: Vista lateral do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da LV. Fonte: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>> Acesso em 01/04/2014

Os flebotomíneos possuem tamanho reduzido, medindo aproximadamente de 1 a 3 mm de comprimento. Apresentam o corpo coberto por pelos e de coloração clara (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007). Possuem comportamento característico de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Possuem adaptação a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e com baixa incidência de luminosidade. Estes insetos preferem ambientes sombreados, com árvores e abundância de matéria orgânica (SOARES:TURCO, 2003). A espécie *L. longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variação de temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais, como galinheiros, canis, pombais e chiqueiros (DEANE e DEANE, 1955; NEVES, 2005; NOGUEIRA, 2007).

Algumas pesquisas demonstram que pulgas (*Ctenocephalides sp.*) e o carrapato (*Rhipicephalus sanguineus*) poderiam desenvolver formas promastigostas metacíclicas de *L. chagasi*. Nesses casos a contaminação ocorreria pela ingestão desses parasitos

artrópodes pelo cão (CERQUEIRA et al., 2000). A capacidade vetorial do carrapato *R. sanguineus* poderia ser favorecida pelas características epidemiológicas da LVC que permitem a estreita associação dos ectoparasitos com os cães infectados (SILVA, 2012)

2.5.2 Hospedeiros Vertebrados

Os hospedeiros vertebrados podem incluir uma grande variedade de animais: roedores, edentados, marsupiais, felinos, canídeos e primatas (homem) (BRESCIANI et al, 2010).

Nas áreas urbanas, o cão (*Canis familiaris*) pode ser considerado a principal espécie animal responsável pela manutenção do ciclo zoonótico (BRASIL, 2003; REY, 2008). A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem (PARANHOS et al., 1996; AZEVEDO et al., 2008; GONTIJO:MELO,2004). No ambiente silvestre, os reservatórios mais importantes são canídeos como o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), lobo guará (*Cerdocyon brachyurus*), cachorro vinagre (*Speothos venaticus*), as raposas (*Dusicyon vetulus*), o lobo (*Canis lupus*), e os marsupiais como os gambás (*Didelphis albiventris*) (BADARÓ e DUARTE, 1996; LAISON et al, 1990; FERREIRA et al., 2013).

A raposa tem uma grande importância na manutenção e disseminação do parasito, pois sendo de hábitos erráticos, anda longas distâncias procurando alimento, podendo se aproximar do peri-domicílio (DANTAS-TORRES, 2007).

2.5.3 Ciclo Biológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando-se entre o hospedeiro vertebrado e insetos vetores (Figura 4) (LAINSON:SHAW, 1988).

O ciclo evolutivo dos parasitos do gênero *Leishmania* compreendem uma fase nos hospedeiros invertebrados onde as formas promastigotas se multiplicam por divisão binária no tubo digestivo das fêmeas dos flebotomíneos, e outra fase nos hospedeiros vertebrados, reservatórios mamíferos, nos quais as formas amastigotas vivem e se

multiplicam, também por divisão binária, no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos (NEVES, 2005).

No organismo vertebrado, após a infecção inicial de neutrófilos o parasito é encontrado infectando preferencialmente as células do SFM (macrófagos/monócitos). Vários sistemas de receptor-ligante têm sido implicados na adesão e na internalização da *Leishmania* pelos macrófagos (VANIER-SANTOS et al, 2013). Dentro do fagossoma, o parasito se diferencia em amastigota para a sua sobrevivência fisiológica e inicia o processo de sucessivas divisões binárias. Quando os macrófagos estão densamente parasitados, rompem-se liberando as amastigotas para seguir o ciclo.

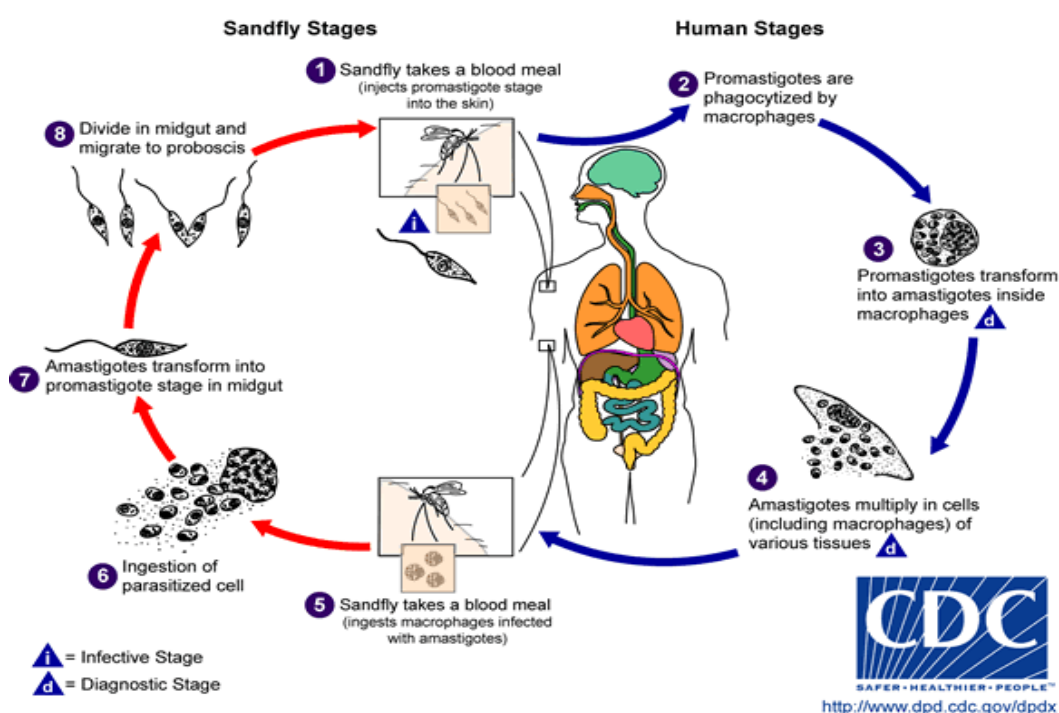


FIGURA 4: Ciclo biológico do protozoário *Leishmania sp.*

Fonte: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> Acesso em 30/03/2014

A infecção do inseto ocorre quando a fêmea pica o hospedeiro vertebrado para realizar o repasto sanguíneo e ingere macrófagos infectados por formas amastigotas. Esses macrófagos se rompem liberando as amastigotas, que se transformam rapidamente em promastigotas, multiplicando-se ainda no sangue ingerido que está envolto por uma matriz peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto (NEVES, 2005).

Ocasionalmente pode ocorrer a transmissão do protozoário sem o envolvimento do inseto vetor, este mecanismo pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea, transplantes ou por via transplacentária. Nos cães já foi comprovada a transmissão via

transfusão, visto que esta é uma prática cada vez mais comum na rotina clínica, alerta-se a necessidade de triagem severa nos doadores (FREITAS et al., 2006).

2.5.4 Fisiopatogenia da leishmaniose visceral canina

A diversidade dos fatores de virulência apresentados pelas diferentes espécies de *Leishmania* demonstram que esses protozoários adaptaram-se ao parasitismo intracelular por meio de mecanismos multifatoriais (VANIER-SANTOS et al., 2013). As estratégias empregadas pelas formas amastigotas de *Leishmania* para evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro mamífero são pouco conhecidas. Alguns trabalhos sugerem interiorização dos antígenos de membrana para o citoplasma após as promastigotas metacíclicas serem inoculadas pelo vetor (ALEXANDER et al., 1999). Outros sugerem que antígenos de virulência do parasita seriam os responsáveis pela evasão das defesas do hospedeiro, permitindo, desta forma, sua sobrevivência e possibilitando a ocorrência da doença (VANIER-SANTOS et al., 2013).

Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada do vetor. Após a inoculação pelos flebotomíneos na pele de cães susceptíveis, a maioria dos parasitos é eliminada por fatores do complemento (MOSSER; ROSENTHAL, 1992; PETERS et al., 1995). Em contrapartida, a saliva dos flebotomíneos apresenta efeito imunossupressor que parece facilitar a sobrevivência intracelular dos protozoários (VANIER-SANTOS et al., 2013).

Num segundo momento, ocorre a infecção de vísceras e eventualmente a disseminação na derme (SILVA, 2007). A presença das formas amastigotas nos órgãos provoca resposta inflamatória, inicialmente com predominância de neutrófilos e eosinófilos, que são seguidos por um grande número de macrófagos. Os linfócitos são observados posteriormente com a progressão da doença, e a inflamação se torna tipicamente granulomatosa (FERRER, 2002). Ocasionalmente, a amiloidose grave pode ser encontrada no baço, fígado e rins de cães acometidos. Além de células fagocíticas mononucleares e polimorfonucleares, as amastigotas de *Leishmania* podem infectar fibroblastos e células endoteliais, gliais e mesenquimais. A infecção de células que não sejam fagocíticas profissionais, tais como fibroblastos, pode ser parcialmente responsável por infecções *in vivo* prolongadas (VANIER-SANTOS et al., 2013).

A resistência do hospedeiro está associada com a ativação seletiva e diferenciação das células efectoras T helper (TH) CD4+ do tipo TH1, que secretam um

padrão de citocinas específicas, entre elas, IL-2 e IFN- γ (GRIMALDI; TESH, 1993; SILVA et al., 2013). Os cães infectados apresentam diminuição de células TCD4+ em comparação a animais saudáveis (MORENO; ALVAR, 2002; BARBIERI, 2006).

A resposta dos linfócitos T é a que exerce a maior influência na resposta contra a infecção. Como *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, as defesas do hospedeiro são dependentes da atividade dessas células, que se encontram reduzidas durante a infecção. Em contrapartida, ocorre a proliferação intensa de linfócitos B e a produção de anticorpos é abundante, porém deletéria e não promove proteção. Portanto, o aparecimento dos sintomas depende da imunocompetência do animal. Geralmente, a doença no cão é sistêmica e crônica, no entanto a evolução aguda e grave pode levar o animal ao óbito em poucas semanas. A imunossupressão ocasionada pelo parasito pode provocar infecções oportunistas que dificultam o diagnóstico conclusivo (SILVA, 2007). Em alguns animais há o desenvolvimento de resposta imune específica adequada e controle da infecção. Em outros há disseminação dos parasitos a partir da pele para linfonodos, baço e medula óssea; posteriormente pode ocorrer a disseminação para todo o organismo (FERRER, 2002).

Os níveis de isotipos de imunoglobulinas (Ig) na infecção natural e experimental por *L. chagasi* vêm sendo estudados por vários autores (QUINNEL et al., 2003; REIS et al., 2006; GARCIA, 2009). Estas pesquisas evidenciam que altos títulos de anticorpos apresentam-se como importantes biomarcadores para o monitoramento clínico e de densidade parasitária tecidual (REIS et al., 2006). Cães de área endêmica com altos títulos sorológicos são potenciais fontes de infecção para os insetos, pois além do parasitismo visceral, possuem alta carga parasitária na pele (SILVA et al., 2005).

2.5.5 Sinais Clínicos nos cães

A gravidade e a variedade de sinais clínicos da doença dependem do equilíbrio entre a resposta imune e virulência do parasito (OLIVEIRA et al., 2011). O período de incubação da doença é extremamente variável, podendo ser de alguns meses até anos (FERRER et al., 1999).

O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estado frágil e debilitado (Figura 5). Os sinais clínicos comumente observados nos cães são: linfadenomegalia, onicogribose, emaciação, queda de pelos, lesões ulcerativas, prurido, pelos opacos,

edema de patas, hiperqueratose, diarreia, ceratoconjutivite, esplenomegalia, dentre outros (SOLANO-GALLEGO et al., 2009b; ORDEIX et al., 2005; REIS et al., 2009). Alguns ainda podem desenvolver uma lesão específica no local da inoculação das formas promastigotas, o chamado *cancro de inoculação*. A onicogribose é um sinal marcante da doença canina, sendo observada em cerca de 25% dos cães com LV (CIARAMELLA et al., 1997). Alguns autores atribuem a onicogribose à ação do parasita na matriz ungueal e outros à ausência do desgaste natural das unhas devido à apatia do cão nos estágios mais avançados da doença (MARZOCHI et al., 1985). Nestes estágios mais avançados da doença, é possível observar, ainda, um quadro de disfunção renal relacionado às elevadas concentrações de imunocomplexos circulantes de IgM e IgA e à deposição destes nos glomérulos. A resposta humoral não é considerada competente para aferir resistência a infecção, sendo que esses animais apresentam a doença em progressão ativa (SILVA et al., 2013).

A anorexia é normalmente restrita a animais com insuficiência renal crônica. A fraqueza e a diminuição da atividade física podem ocorrer como consequência da anemia, atrofia muscular e/ou distúrbios locomotores. A febre intermitente é na maioria das vezes relacionada a doenças concomitantes como erliquiose, babesiose e infecções bacterianas (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Gomes et al., (2006) relatma que a prevalência da infecção em cães nas áreas endêmicas pode chegar a 50% ou mais, entretanto a prevalência da doença clínica ocorre entre 3 e 10% dos cães, o que demonstra que a maioria dos cães não desenvolve os sintomas, o que dificulta consideravelmente o diagnóstico. Em estágios avançados, observa-se também paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição evoluindo para a morte (FEITOSA et al., 2000; ALBUQUERQUE et al., 2007; SOLANO-GALEGO et al., 2009b).

Cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo e podem ser classificados da seguinte forma (CABRAL et al., 1998):

- Cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania sp.*
- Cães oligossintomáticos: presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pelo opaco.
- Cães sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjutivite e paresia dos membros posteriores (Figura5).

Ainda segundo os autores, cerca de 60% da população canina infectada não apresenta sintomas evidentes, sendo o restante, em sua maioria, casos pré-patentes, cuja infecção pode ou não evoluir para a fase patente.



Figura 5: Cão sintomático para LVC: A) apresentando emagrecimento severo; B) evidenciando no detalhe o aumento do linfonodo poplíteo.

Fonte: Veras et al., 2014

2.5.6 Métodos de Diagnóstico

A partir da suspeita clínica, a confirmação do diagnóstico pode basear-se em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (BANETH, 2006; MARCONDES et al., 2011; VERAS et al., 2014). Vários autores comentam que um teste eficaz deve ser capaz de confirmar uma suspeita clínica em um paciente, detectar a infecção assintomática, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples e de fácil execução, ter baixo custo e ser viável em laboratório ou adaptável a condições de campo e em especial detectar todos os cães infectados com o protozoário (COURTENAY et al., 2002; DOURADO et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008).

O diagnóstico inicial da leishmaniose é realizado pela avaliação de parâmetros clínicos e epidemiológicos, porém, para um diagnóstico definitivo, há a necessidade de exames que comprovem a presença do parasito. A especificidade e sensibilidade dos métodos dependem do tipo de antígeno utilizado, do tempo de infecção, da carga parasitária, e da resposta imune do hospedeiro. Há um grande número de testes com resultados falso-positivos e falso-negativos. Por esse motivo, os exames

complementares são de fundamental importância no diagnóstico definitivo da doença (CIARAMELLA et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; MOREIRA et al., 2007).

A confirmação diagnóstica pode ser feita através das técnicas parasitológicas (visualização direta do parasito) ou por métodos sorológicos e moleculares (FERRER, 1999; WHO, 2001). A especificidade do método parasitológico direto é de 100% e a sensibilidade pode ultrapassar 80% quando o material colhido é punção do linfonodo poplíteo ou de camada leucocitária da amostra sanguínea (BRASIL, 2006). Em animais assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes, podem ocorrer resultados falso negativo.

Historicamente, testes sorológicos utilizados no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral (ELISA e RIFI) baseiam-se na detecção de anticorpos específicos ao parasita nas amostras de soro de cães suspeitos de portarem a doença. Tais exames são baseados na utilização de extratos de proteínas dos parasitos, antígenos semipurificados ou purificados, apresentados sob a forma de proteínas recombinantes (CARVALHO et al., 2002; ALVAR et al., 2004). Animais infectados desenvolvem uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. A soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por pelo menos dois anos (FERRER, 1999; GARCIA, 2009). O cão torna-se fonte de infecção para os flebotomíneos aproximadamente 105 após a soroconversão (COURTENAY et al., 2002).

Muitos testes sorológicos estão disponíveis, tais como Fixação do Complemento, Hemaglutinação Indireta, Aglutinação em látex, Aglutinação direta, Reação de Imunofluorescência Indireta, ELISA e Western blot. As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são o TR-DPP[®] e ELISA, sendo este último o teste padrão ouro. Entre as principais desvantagens destes testes estão a incapacidade de detectar cães infectados antes da soroconversão e a possibilidade de ocorreres reações cruzadas com diversas outras enfermidades que infectam cães, tais como Babesiose canina, erliquiose canina e infecção por *Trypanosoma sp.* (HARRUS, 2002; FEITOSA, 2006; LUCIANO et al., 2009; LOPES et al., 2011; SILVA et al., 2011).

O teste de ELISA é utilizado principalmente para detecção de anticorpos, quando se deseja realizar um levantamento soropidemiológico prático, menos oneroso e rápido, no qual pode-se testar um grande número de amostras ao mesmo tempo. Este

teste apresenta sensibilidade que varia entre 71 e 100% e uma especificidade entre 85 e 100% (MELO, 2004). Os valores de sensibilidade e especificidade podem variar de acordo com o tipo sanguíneo empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e de mudanças no protocolo experimental padrão. As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da mesma família, mas também com outros organismos filogeneticamente distantes. Durante muito tempo se discutiu a possibilidade de reação cruzada de antígenos de *Leishmania chagasi* com *Trypanosoma cruzi* e *L. braziliensis* (DOURADO et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2009a). No entanto já foi demonstrada a ausência reatividade cruzada com antígenos de *Babesia canis* e *Ehrliquia canis* pelo ELISA e RIFI, sendo o que é importante uma vez que esta co- infecção com estes agentes é um achado muito comum em zonas endêmicas para LV (OLIVEIRA et al. 2008).

Técnicas de imunohistoquímica também apresentam bons resultados para o diagnóstico da LV, auxiliando as técnicas sorológicas de rotina (TAFURI et al., 2004).

O desenvolvimento de testes rápidos baseados em proteínas recombinantes (rk26 e rk39) para uso em testes de diagnóstico revolucionou a detecção da infecção da leishmaniose visceral canina, provando ser altamente sensível e específico, demonstrando um diagnóstico preciso da doença (CHAPPUIS et al., 2007; POUBEL, 2010; DOMINGOS, 2012). Segundo a Nota Técnica do Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis de dezembro de 2011 (Nº 01/2011), o teste rápido imunocromatográfico – TR-DPP[®] passa a ser o teste de triagem nos inquéritos caninos e o Ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste confirmatório (BRASIL, 2011). Este método imunocromatográfico apresenta vantagens e facilidades como a rapidez, praticidade e simplicidade. Pode ser realizado a partir de amostras de soro, sangue ou plasma e não exige equipamentos específicos para sua interpretação (RODRIGUES et al., 2013; VERAS et al., 2014).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se apresentado como um método rápido e altamente sensível para o diagnóstico de LVC e tem se mostrado útil também no acompanhamento de cães doentes (FERRER 2002), pois é um método com alta sensibilidade e especificidade (FISA et al., 2001). Essa técnica também parece capaz de distinguir infecção passada de recente (VERAS et al., 2014). Este método passou a ser usada com mais frequência para a identificação dos reservatórios de *Leishmania* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003).

Uma variedade de protocolos para detectar *Leishmania infantum* tem sido desenvolvidos e a técnica de PCR tem mostrado ser sensível e altamente específica para a detecção de infecções assintomáticas ou não provadas parasitologicamente (AOUN et al., 2009). A utilização de metodologias moleculares permitiu o desenvolvimento de novas abordagens e a determinação de correlações filogenéticas existentes entre as espécies (POGUE et al., 1995; ALVARENGA, 2012).

A combinação de técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de maior número de animais positivos para LV em áreas endêmicas (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Em suma, os métodos diagnósticos por sorologia, por suas características próprias, são os de eleição e são largamente empregados pela sua fácil e rápida execução, bem como sua confiabilidade em certas condições, como as de campanhas de saúde pública, onde são examinados grandes contingentes populacionais. O teste parasitológico é o método conclusivo de diagnóstico da doença; é considerado o padrão confirmatório. Por meio dele, faz-se a detecção e a identificação do parasita a partir de biópsias ou aspirados de tecidos. Outras técnicas, como a imunohistoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) também são utilizadas, porém, não têm a praticidade de serem empregadas em triagens de campo (TAFURI et al., 2001; TAFURI et al., 2004).

Na LVC é difícil a correlação de sinais clínicos, carga parasitária e sorologia, pois, os títulos elevados de anticorpos na RIFI nem sempre estão correlacionados com os sinais clínicos e o grau de parasitismo nem sempre está associado aos sintomas (MADEIRA et al., 2004; SOUZA et al., 2004). Braga et al. (1998), observaram em seus experimentos que o ELISA utilizando soro de cão, mostrou-se 4,6 vezes mais sensível que RIFI do eluato de papel filtro, pois detectaram maior número de cães precocemente infectados. Mesmo assim, ainda é um desafio a existência de um teste de fácil acesso a população que apresente, paralelamente, especificidade e sensibilidade elevadas (ROURA et al., 1999).

2.6 Tratamento Canino

O tratamento de cães assintomáticos e oligossintomáticos resulta em altas taxas de recuperação clínica, bem como impede o desenvolvimento da doença (GRADONI, 2002). A eliminação do parasito nos órgãos e tecidos, especificamente na pele, tem sido considerada a melhor forma de controle da doença (VOULDOUKIS et al., 1996).

Os fármacos de escolha utilizadas frequentemente para o tratamento da LVC são: antimoniato de metil glucamina, anfotericina B e alopurinol. Vários outros compostos incluindo pentamidinas, aminosidinas, miltefosina, metronidazol, e cetaconazol, estão sendo investigados como agentes antileishmania em cães, porém, sem apresentar ainda resultados satisfatórios (BANETH et al., 2001).

A utilização do Antimoniato de N-metil Glucamina, distribuído pelo Ministério da Saúde, para o tratamento da Leishmaniose canina, foi proibida pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária por meio do parecer técnico nº. 299/2004 da Advocacia Geral da União (BRASIL, 2004).

A utilização de imunossuppressores, em especial os glicocorticóides, na terapia da leishmaniose visceral canina tem sido amparada com objetivo de deprimir a imunidade humoral por meio da redução na produção de anticorpos e restringir os efeitos causados pelo depósito de imunocomplexos nos órgãos e tecidos (DENEROLLE et al., 1996).

No Brasil, é proibido o tratamento da LV em cães, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), considerando a existência de risco de indução à seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos (BRASIL, 2008). No entanto, nos últimos anos, o tratamento canino, utilizando outros princípios ativos que não os indicados para tratamento humano, tem sido realizado no Brasil e em outros países, como medida adicional para o controle da doença com implicações diretas na prevalência humana (ALVAR et al., 1994; MORITZ et al., 1999; BANETH et al., 2001).

Devido ao tratamento oneroso e pouco eficaz dos cães infectados e à inexistência de uma vacina que garanta proteção total, a eliminação de animais soropositivos tem sido utilizada como forma de controle da doença em vários países (MADEIRA et al., 2006). As vacinas caninas já registradas no Brasil apresentam algum efeito protetor contra a leishmaniose visceral canina, mas nenhuma delas foi propriamente avaliada como medida de controle da leishmaniose humana (PARRA et al., 2007).

2.7 Medidas de Controle

O controle da leishmaniose visceral canina baseia-se na detecção dos animais infectados, seguido do seu sacrifício e no combate ao vetor transmissor (BRASIL, 2003). Tal controle, entretanto, é uma tarefa difícil devido à grande variedade de espécies do parasita, além disso, a leishmaniose apresenta-se como uma doença zoonótica que é mantida, em sua grande maioria, em ciclos naturais envolvendo vetores e reservatórios silvestres. Há também, a capacidade de adaptação do parasita que, mesmo na ausência de seu reservatório natural, pode sobreviver em outros hospedeiros presentes em seu habitat (DESJEUX, 1992; KAMHAWI et al., 2000).

As estratégias de controle, até então utilizadas, estão centradas e dirigidas unicamente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia em cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados. Entretanto, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentam efetividade para redução da incidência da doença, determinando a necessidade de reavaliação das ações propostas pelo poder público (BRASIL, 2006).

O enfoque dado para eutanásia dos cães tem demonstrado ser ineficaz e dispendioso (DYE, 1996; DIETZE, et al., 1997; COSTA, 2001; COURTENAY, et al., 2002; GONTIJO; MELO 2004). A eliminação de cães soropositivos, dentre as medidas de controle da leishmaniose, é a que apresenta menor suporte técnico-científico, uma vez que existem vários pontos conflitantes nesta ação (COSTA, 2001). Ainda com relação a eutanásia dos cães como controle de reservatório, devemos lembrar do profundo impacto que esta medida causa, considerando a relação homem-cão na sociedade e tendo em vista que muitos cães se transformaram em verdadeiros “membros” da família, sendo o sacrifício de cães com sorologia positiva e na maioria das vezes assintomático, torna-se cada vez mais inaceitável e de difícil execução para as autoridades de saúde pública (DOMINGOS, 2012).

Em contrapartida, Nunes et al., (2010), concluíram ao analisar as taxas de leishmaniose humana no município de Araçatuba/SP, que o procedimento de eutanásia em cães pode estar intimamente ligado a redução das taxas de casos humanos da doença. Essa diferença de achados demonstra a importância de mais estudos que avaliem o real papel do cão na manutenção da doença e o risco para a infecção humana.

Nas áreas endêmicas, um tratamento rápido dos cães infectados, controle dos cães errantes e sem domicílio, ação contra insetos vetores constituem os métodos recomendados (FRASER, 2008).

O programa oficial de controle da Leishmaniose visceral canina preconiza que as medidas sejam direcionadas a população humana e canina e ao vetor; e incluem medidas proteção individual aos humanos, saneamento básico, controle da população de cães errantes, vacinação da população canina e uso de coleiras impregnadas a base de Deltametrina a 4% (BRASIL, 2006).

O sistema de vigilância deve ser permanente e utilizando os recursos humanos e financeiros de forma extensiva. A possibilidade de transmissão da LV por cães assintomáticos, os problemas de padronização dos métodos de diagnóstico, os resultados contraditórios e a dinâmica populacional canina, onde os animais eutanasiados são rapidamente substituídos por outros cães que podem adquirir a infecção em um curto espaço de tempo, são fatores que contribuem para inefetividade do programa de controle da doença (COSTA et al., 2007).

Um candidato em potencial para uma vacina contra leishmaniose visceral, deverá favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 CD4+, mas esta resposta também é dependente da dose do antígeno e da via de inoculação (KAUR et al., 2008). É preciso considerar também a importância do adjuvante na eficácia e duração da resposta imune, uma vez que vacinas lipossomais são muito eficazes na proteção contra LV em camundongos BALB/c (RAVINDRAN et al., 2010).

As vacinas caninas já registradas no Brasil apresentam algum efeito protetor contra a leishmaniose visceral canina, mas nenhuma delas foi propriamente avaliada como medida de controle da leishmaniose humana (PARRA et al., 2007).

Uma das vacinas comercializadas e registradas no Brasil é a Leismune[®]. O laboratório usa tecnologia de uma fração glicoproteica purificada, a fucose-manose ligand (FML). Este antígeno está presente na superfície do parasita ao longo de seu ciclo de vida, fato este que assegura uma alta proteção e imunogenicidade para cães (BORJA-CABRERA et al., 2002; LIMA et al., 2010). Esta vacina foi capaz de inibir a penetração de formas promastigotas e amastigotas em macrófagos de camundongos *in vitro* (LIMA et al., 2010). Borja-Cabrera et al. (2008), conseguiram demonstrar alta taxa de eficácia da vacina Leismune[®], atingindo até 98% de soropositividade para FML em cães vacinados.

Outra vacina contra Leishmaniose visceral canina disponível no mercado é a Leish-Tec[®], e segundo informações do manual técnico, ela promove respostas imune celular, humoral, parasitológica e clínica dos cães imunizados com o antígeno recombinante A2, associado ao adjuvante saponina.

O antígeno A2 é uma proteína formada por múltiplas cópias de unidade de 10 aminoácidos, expresso preferencialmente em formas amastigotas da *L. (L) chagasi*. A inibição da expressão de A2 em formas amastigotas resulta na perda da virulência do protozoário (Manual Técnico, 2012).

Em um estudo realizado pela UFMG, animais imunizados com a Leish-Tec[®] apresentaram níveis de anticorpos da classe IgG2 anti-A2 significativamente maiores, indicando a indução de resposta TH1. No mesmo estudo, os cães imunizados apresentaram altos níveis de IFN- γ e IgG2 específicos à A2, permitindo a diferenciação sorológica entre animais vacinados e animais infectados, um requisito importante para uma vacina contra LVC. Estes animais vacinados mantiveram-se negativos na sorologia de rotina realizada por RIFI e ELISA (GRIMALDI et al., 2012).

3 OBJETIVO

Objetivo geral:

- 1) Estudar a epidemiologia da Leishmaniose visceral canina em uma região do município de Porto Alegre/RS com registro de caso da doença.

Objetivos específicos

- 1) Conhecer o perfil da população canina e das condições ambientais onde foi diagnosticado o primeiro casos de LVC no município de Porto Alegre/RS.
- 2) Identificar caninos sororeagentes para *Leishmania (L.) chagasi* em região com registro de caso.
- 3) Avaliar comparativamente o desempenho das técnicas de ELISA e TR-DPP® para o diagnóstico sorológico de LVC em região com registro de caso da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

A cidade de Porto Alegre está localizada na mesorregião metropolitana, possui uma população de 1.409,551 habitantes (Censo IBGE/2012) e uma área total de 470, 25 km² (Figura 6A). Atualmente pode ser dividida em 78 bairros, com características bem distintas. Para este estudo, foi selecionada uma área da cidade (Figura 6B) que se localiza ao longo da Avenida do Trabalhador, com 19km de extensão e população média de 150 mil habitantes (PREFEITURA, 2013). Esta área (Figura 7) inicia no bairro Agronomia, onde foram registrados os primeiros cães soropositivos para *Leishmania* spp (JESUS, 2006; IESBICH, 2008) e se estende até o bairro Lageado, onde foi registrado o primeiro caso de LVC no município de Porto Alegre.

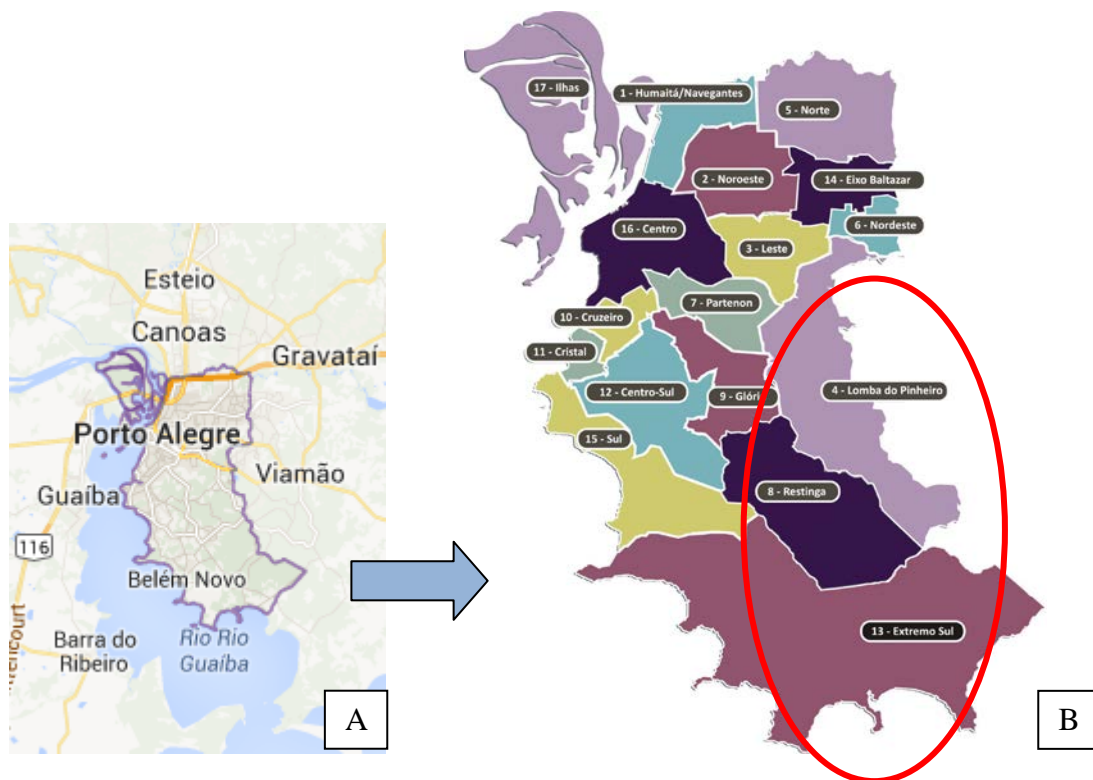


FIGURA 6: A – Região metropolitana do município de Porto Alegre/RS; B- Distribuição dos bairros da cidade de Porto Alegre, com destaque para a região de estudo (círculo vermelho).

Fonte: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/smg/default.php?reg=1&p_secao=76
Acesso em 01/04/2014

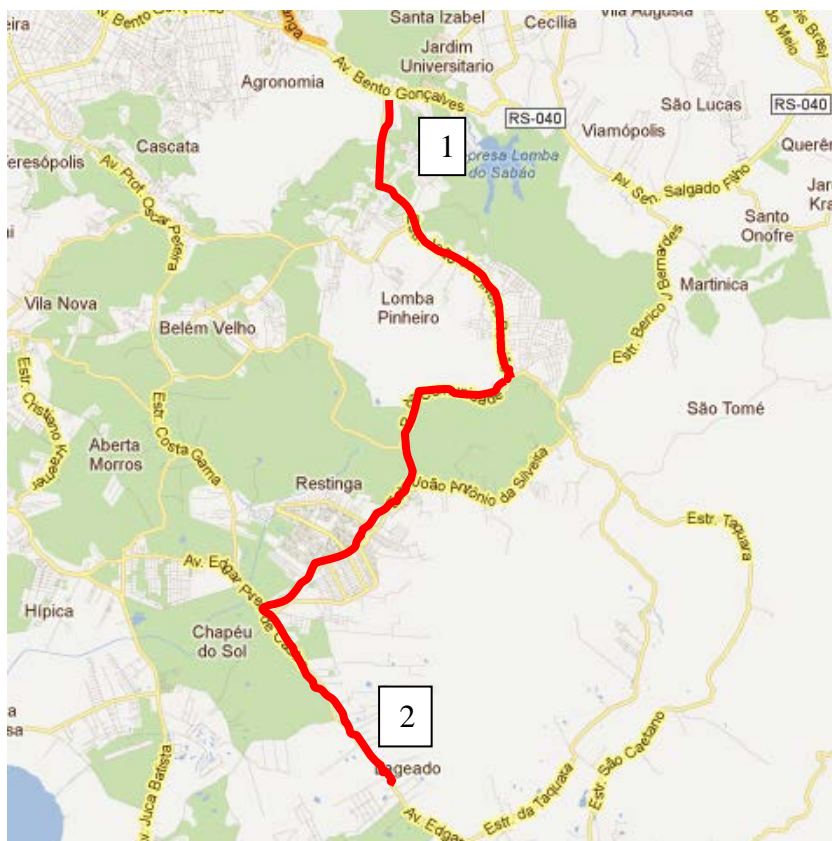


FIGURA 7: Área de estudo no município de Porto Alegre/RS, evidenciando o trajeto da Av. do Trabalhador: 1) Registro de cães soropositivos *Leishmania spp.*; 2) Primeiro caso de LVC registrado no município.

Fonte: <http://www.googlemaps.com> > Acesso em: 20/03/2012

Amostragem

Utilizou-se amostragem não probabilística (THRUSFIELD, 2004), por conveniência, sendo o aceite do proprietário em participar do estudo e permitir a coleta de soro sanguíneo do cão o fator de inclusão, resultando em 300 cães amostrados. O período de coleta das amostras foi de setembro de 2012 a setembro de 2013. Foram necessárias visitas prévias à localidade para contatar os tutores dos animais e agendar o procedimento. As amostras de sangue foram obtidas através de venóclise da veia jugular e acondicionadas em tubos com e sem anticoagulante em caixa de isopor refrigerada. Posteriormente as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Protozoologia da UFRGS onde foi feita a centrifugação para obtenção de soro e plasma. As amostras foram identificadas individualmente e mantidas congeladas a menos 20°C em tubos do tipo Eppendorf. Todos os tutores autorizaram a coleta e assinaram um termo de Livre Consentimento, com esclarecimentos a respeito da doença e dos procedimentos realizados (APÊNDICE A). Todos os animais foram contidos de forma

segura com mordação ou focinheira de tecido. Foi utilizada seringa descartável de 5ml para a coleta com agulha do tipo 25x7. De acordo com o guia de severidade dos procedimentos científicos utilizado como padrão pela CEUA/UFRGS, ao qual esse projeto foi submetido, os pesquisadores avaliaram como leve o grau de severidade deste procedimento.

Dados relativos a idade, raça, sexo, local de origem, avaliação clínica dos animais e observações do ambiente foram registrados em fichas de identificação individuais. (APÊNDICE B)

Diagnóstico sorológico

Utilizaram-se duas técnicas para diagnóstico de Leishmaniose visceral canina, as quais são descritas a seguir. Este trabalho foi realizado em parceria com o Laboratório Central do Estado (LACEN/RS) e o Laboratório de Imunologia da UNESP/Araçatuba-SP.

O teste rápido *Dual Path Platform* (TR- DPP® - Leishmaniose visceral Canina), patenteado pela Chembio Diagnostics e desenvolvido pelo Instituto Biomanguinhos/Fiocruz (FUNED, 2010), foi executado no Laboratório Central do Estado (LACEN/RS).

O Teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado conforme Lima et al. (2005). Foi utilizado antígeno solúvel lisado de *L.(L.) chagasi* na concentração de $5\mu\text{g.ml}^{-1}$, diluído em tampão carbonato. O anticorpo secundário utilizado para revelar a reação foi imunoglobulina de coelho anti IgG de cão conjugada a peroxidase (Sigma®,USA). As amostras foram testadas em duplicata e a densidade ótica (DO) utilizada como ponte de corte foi de 0,270. A leitura foi realizada imediatamente após o bloqueio com ácido clorídrico a 16%, em espectrofotômetro com filtro de 490nm.

Os controles positivos eram provenientes de área endêmica e confirmados por isolamento do parasito. O controle negativo era proveniente de cães saudios, não infectados e de áreas livres de LVC.

5 RESULTADOS

Caracterização da área de estudo

Os bairros inclusos na área de estudo apresentam regiões residenciais bem definidas e grandes áreas comerciais, desde grandes indústrias até pequenos comércios. Em grande parte do trajeto, foi possível verificar a vulnerabilidade social desta região da cidade. Observou-se com grande frequência a presença de lixo mal acondicionado e falta de saneamento básico nas moradias. Foi possível observar um grande número de casas e pequenos sítios e extensas áreas de mata verde entre as residências, muito semelhante ao observado em áreas rurais desta região do Estado. No percurso de 19 km entre o ponto inicial das coletas e o ponto final, pode-se observar alguns locais com densidade populacional maior, presença de comércio local intenso e grande população de cães errantes (Figura 08). E no outro extremo da região estudada (Bairro Lageado), foi possível observar uma localidade onde predominam sítios e pequenas propriedades rurais. (Figura 09). Neste bairro, foi possível verificar deficiência de saneamento básico, lixo exposto na rua ou em locais inadequados.



FIGURA 8: Região da Lomba do Pinheiro, localizada no início da Avenida do Trabalhador, evidenciando a presença de cães errantes e de lixo em via pública.
Fonte: Mariana Teixeira – Arquivo Pessoal , 2013



FIGURA 9: Região do Bairro Lageado, localizado no final da Avenida do Trabalhador, onde se observa a predominância de área de transição de mata.

Fonte: Mariana Teixeira – Arquivo Pessoal , 2013

Caracterização da população canina

Por meio da análise dos questionários epidemiológicos realizados durante as visitas para coleta de sangue, foi possível observar as seguintes características da população canina estudada.

A maioria dos cães coletados neste estudo foi classificada como mestiça ou sem raça definida (250/300). Esta característica é bem marcante na população canina da região. Os números mínimo, máximo e médio de cães por residência foram um, vinte e dois e seis, respectivamente. Com relação ao gênero dos animais participantes do estudo, destacou-se a presença de fêmeas (175/300) em relação aos machos, característica essa também observada nas residências como um todo (Figura 10).

A idade mínima, média e máxima dos animais coletados neste estudo foi de nove meses, 5,5 e 16 anos, respectivamente. Optou-se por não realizar a coleta em cães com idade inferior a seis meses, visto que a LVC é uma enfermidade que atinge geralmente animais com idade superior a cinco anos (BRASIL, 2006).

Com relação ao hábito de vida dos cães, 78% (238/300) dormiam em canis ou no pátio de suas moradias, 61% (183/300) dos cães conviviam com outras espécies de

animais no mesmo terreno como galináceos, equinos, felinos e suínos. Em quase 60% (24/41) dos domicílios foi relatada a ocorrência de roedores no ambiente (Figura 11).

Setenta e dois por cento dos proprietários (216/300) relataram no questionário que os cães não recebiam acompanhamento veterinário de rotina. A observação clínica que a maioria dos animais revelou que 90% (270/300) apresentava infestação por ectoparasitos (pulgas e/ou carrapatos) no ato da coleta. Foi possível identificar nos animais durante as coletas, vários cães com sinais clínicos e/ou características observadas em casos de LVC, como: alterações dermatológicas como seborreia, alopecia local ou generalizada, prurido em diferentes níveis em 70% (210/300) dos animais; emagrecimento progressivo e falta de apetite em 24% (72/300); alterações oculares em 22% (65/300); além de alguns relatos de alterações no sistema locomotor e articulares.



FIGURA 10: Cães que participaram do estudo evidenciando as condições de vida.
Fonte: Mariana Teixeira – Arquivo Pessoal, 2013.



FIGURA 11: Característica de uma residência incluída no estudo: A) Presença de outras espécies de animais; B) Galpão que servia de dormitório para os cães da propriedade.

Fonte: Mariana Teixeira – Arquivo Pessoal, 2013.

Resultados sorológicos

Das 300 amostras submetidas à técnica de TR-DPP[®], apenas três (1%) amostras formam reagentes, sendo consideradas como positivas (Figura 12). Estas mesmas três amostras também foram às únicas a apresentarem reações positivas quando submetidas a técnica de ELISA. A densidade ótica (DO) média de cada amostra foi 1,322; 0,630 e 0,590 (Figura 13). As demais amostras (297/300) foram negativas para ambas as técnicas realizadas no estudo, revelando concordância de 100% entre as técnicas.



FIGURA 12: Cartão do teste TR-DPP[®] evidenciando o resultado positivo (T) em relação ao controle (C).

Fonte: Mariana Teixeira – Arquivo Pessoal, 2013.

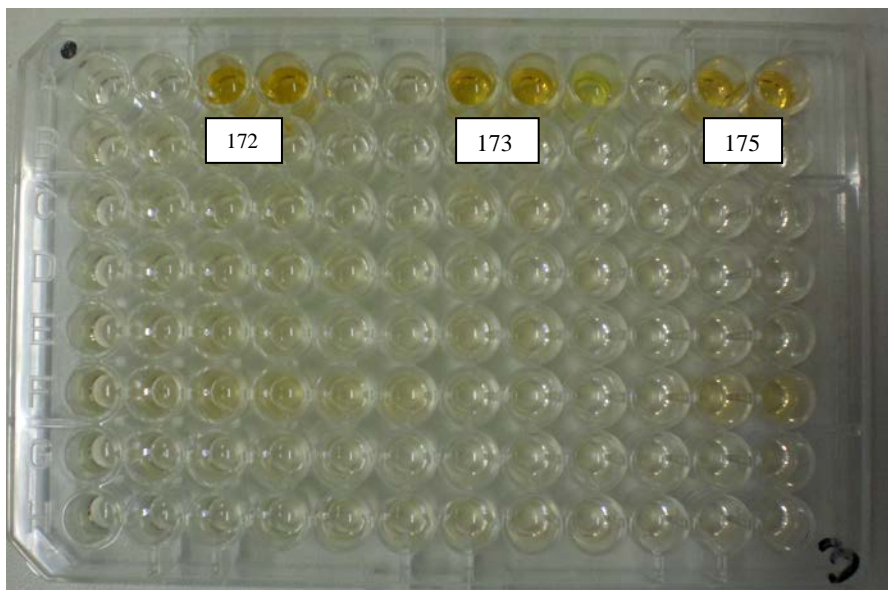


FIGURA 13: Placa de ELISA apresentando as reações das amostras positivas.
Fonte: Mariana Teixeira – Arquivo Pessoal, 2013.

Os três animais positivos eram provenientes do Bairro Lageado, e residiam na mesma propriedade. Dois animais eram fêmeas e uma amostra de macho. Os cães eram das raças Golde Retriever (uma fêmea) e Pitbull (um macho e uma fêmea) e as idades de quatro, sete e cinco anos, respectivamente.

A região onde esses cães residiam já havia apresentado um caso anterior de LVC no município de Porto Alegre, e ficava distante cerca de 2 km dos casos iniciais. O local onde estes cães eram mantidos apresentava grande área de transição de mata verde, presença de outras espécies de animais (equinos e felinos), e em comparação com muitas outras residências visitadas, era um local limpo, sem acúmulo de sujeira ou matéria orgânica evidente e os cães recebiam cuidados e acompanhamento veterinário.

Dos três animais positivos, somente um apresentava sinais clínicos que poderiam indicar suspeita de LVC no ato da coleta. Este animal era uma fêmea da raça Pitbull, com cinco anos de idade e DO média de 1,322 no teste de ELISA. O tutor relatou que esta fêmea apresentava emagrecimento progressivo fazia alguns meses, que já havia sido diagnosticada para babesiose canina e respondido bem ao tratamento realizado pelo veterinário. Não foi identificado nenhum outro sinal clínico nos animais no momento da coleta. O tutor não fazia uso de nenhum produto para controle de pulgas/carrapatos/mosquitos, por segundo ele não ter problemas pela época do ano (inverno).

5 DISCUSSÃO

A presença de cães portadores de LVC no município de Porto Alegre representa risco potencial para a saúde pública, uma vez que estes animais atuam como fonte de infecção para os vetores flebotomíneos (TRAVI et al., 2001; STEINDEL et al, 2013).

Com relação a característica observada na área de estudo, pode-se constatar uma grande falta de infraestrutura básica na região. Costa et al. (2005) avaliaram a influência dos serviços e saneamento básicos da cidade de Teresina, PI e observaram maior risco de infecção humana quando da ausência de rede de esgoto e coleta de lixo regulares. Todos esses fatores, segundo Borges et al. (2014), podem contribuir para a manutenção e ocorrência de LV canina e humana. Estes autores ao realizarem trabalho no município de Juatuba/MG, observaram uma prevalência próxima a 50% em bairros onde era observado deficiência de saneamento básico, ruas não pavimentadas e população de baixa renda, características essas observadas em toda a região observada no presente estudo, com maior ênfase no bairro do Lageado.

As características da população canina da região estudada demonstram a existência de diversos fatores de risco, normalmente, associados ao incremento da chance de infecção de humanos e cães em áreas endêmicas de LV, tais como: a predominância de machos, (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001) o animal ter o hábito de dormir do lado de fora da residência humana (ZAFFARONI et al., 1999; COURAVITAL et al., 2011); e o relato frequente da ocorrência de roedores (SVOBODOVÁ et al., 2003). Neste estudo os cães que reagiram positivamente na sorologia pernoitavam fora do domicílio e na residência havia o relato da ocorrência de roedores pelo proprietário.

Almeida et al. (2012), em estudo realizado no município de Cuiabá (MT), verificaram que fatores relacionados ao hábito dos cães dormirem fora do domicílio e terem livre acesso a rua seriam fatores importantes para a infecção para leishmaniose visceral. Cães de zona rural teriam 1,9 vezes mais chances de contrair a infecção que cães de zona urbana. Visto que os três animais positivos neste estudo residiam em uma zona urbana, porém com características de ambiente rural, propicia um número maior de hospedeiros de outras espécies animais e ambientes favoráveis para a manutenção da população de flebotomíneos.

Os animais machos são geralmente preferidos face aos aspectos econômicos e de segurança para o seu tutor (GARCIA et al, 2009). Esta característica populacional não foi observada neste estudo, uma vez que a maioria dos cães coletados foi do gênero feminino. Devido ao baixo índice de animais soropositivos na amostragem do presente estudo, não foi possível avaliar a influência do sexo do animal sobre o resultado sorológico. Entretanto, alguns autores não detectaram influência desta característica sobre o resultado sorológico (SEIXAS et al., 2012).

Feitosa et al. (2000) relataram maior positividade em animais entre três e seis anos de idade. Esta predisposição etária de cães adultos pode ser explicada pelo longo período de incubação da doença (SEIXAS et al. 2012). Neste estudo a média de idade dos cães soropositivos foi de 5,3 anos, estando na faixa etária mais predisposta à manifestação da doença. Este dado requer um estudo mais detalhado e com amostragem maior, visto que cães jovens são caracterizados por imaturidade imunológica, o que teoricamente o tornaria mais susceptível a infecção (SEIXAS et al., 2012).

Neste estudo, o elevado número de cães que apresentavam sinais clínicos considerados compatíveis com LVC, os quais, no entanto, apresentaram resultados negativos nos testes diagnósticos utilizados (CABRAL et al., 1998). Este quadro pode ser justificado pelo fato de que os sinais clínicos de LVC não são patognomônicos, o que significa que os sinais observados neste estudo poderiam estar relacionados a outras enfermidades (BRASIL, 2006). A grande carência socioeconômica observada na região, a falta de acompanhamento veterinário relatado pelos tutores, o elevado número de cães observados em algumas residências também podem contribuir para a transmissão e disseminação de outras patologias e ectoparasitos associados aos sinais clínicos observados.

Os sinais clínicos que podem ocorrer nos cães com infecção por *Leishmania sp.* (ALMEIDA et al., 2005; AGUIAR et al., 2007; STEINDEL et al., 2013), não foram observados nos cães sorologicamente positivos neste estudo; à exceção de uma cadela que apresentava, segundo o tutor, dificuldade em ganhar peso.

Alguns autores estimam que os casos assintomáticos representem 50% a 60% do total de animais infectados (ALVAR et al., 2004; MACHADO et al., 2007), Esta informação reforça a importância da utilização de novas técnicas que identifiquem reservatórios e vetores em programas de investigação epidemiológica (KATO et al., 2010).

A prevalência observada neste estudo (1%) está bem abaixo das observadas por outros autores quando pesquisaram a ocorrência de *Leishmania sp.* em cães no município de Porto Alegre/RS e obtiveram 3,5% de amostras positivas por meio da técnica de RIFI (JESUS, 2006) e 30,5% utilizando ELISA (IESBICH, 2008). Essa diferença na ocorrência de positividade pode ser explicada pela especificidade apresentada pelo antígeno utilizado no presente estudo (*Leishmania chagasi*).

Em áreas endêmicas no Brasil, como em Poxoréo/MT (7,8%), Cuiabá/MT (8,4%), Itaipu/RJ (11,9%) e Araçatuba/SP (12%) foram observados valores de soropositividade superiores as obtidas neste estudo (AZEVEDO et al., 2008; MADEIRA et al., 2000; CAMARGO-NEVES et al., 2001; ALMEIDA et al., 2009). Em regiões endêmicas para LVC, é possível observar prevalências nos animais entre 60-80%, e mesmo apesar da alta prevalência de infecção, os animais podem ser assintomáticos ou apresentar quadros de intensidade variável (LACHAUD et al. 2002). Uma detalhada avaliação clínica seguida de testes altamente sensíveis são eficazes para a identificação de cães com LVC, tanto em áreas endêmicas como em áreas silenciosas (VERAS et al., 2014). Segundo Sasaki et al. (2011), a utilização de associação de mais de uma técnica como ferramenta para o diagnóstico de LV, aumenta a eficácia do processo.

O encontro da LVC em Porto Alegre/RS gera grande preocupação, devido à falta de conhecimento da real dispersão da doença, dinâmica de transmissão na área, conhecimento do vetor, reservatórios silvestres e até mesmo em relação à população canina que está sendo exposta ao risco de infecção. Este desconhecimento pode contribuir para a expansão abrupta da doença diferentemente do que ocorre em regiões endêmicas (BORGES et al., 2014). Tal fato também pode estar se repetindo em outras cidades do Brasil, principalmente devido ao desenvolvimento e ampliação das redes rodoviárias, da popularização das viagens o que aumenta o trânsito de pessoas e seus animais domésticos intensificando assim, o risco de dispersão, não só da LVC, mas como de outras doenças infecciosas para áreas não endêmicas.

Os primeiros casos da ocorrência de LVC em Florianópolis/SC ocorreram em três cães com sintomatologia clínica compatível (FIGUEIREDO et al., 2012). Utilizando os métodos de RIFI e ELISA, observou-se 1,37% de cães soropositivos naquela cidade (STEINDEL et al., 2013). Os valores são semelhantes aos observados neste estudo, e é importante salientar que Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram os últimos a apresentarem casos caninos dentro do território nacional, o que comprova a

expansão da LVC. Na região oeste do estado do Rio Grande do Sul, onde foram identificados os primeiros casos de LCV, Tartarotti et al., (2011) constatou 20,8% de positividade em cães utilizando o método de ELISA, colocando em evidência grande importância para o trânsito de animais na região e para todo o estado.

Algumas ferramentas poderiam reduzir esse tipo de dispersão, como: o controle mais rígido do trânsito de cães de áreas endêmicas, implementação do diagnóstico sorológico obrigatório, notificação compulsória de casos caninos positivos. Além disso, medidas educativas para sensibilizar tutores de cães e veterinários da rede pública e privada também contribuem na tentativa de minimizar esse problema (FIGUEIREDO et al., 2012).

Neste sentido, é de extrema importância que a vigilância entomológica e epidemiológica voltadas para LVC sejam implementadas nas áreas indenes, com intuito de detectar a presença do vetor e/ou a enzootia canina antes da instalação do ciclo antropozoonótico, auxiliando a adoção de ações que visem impedir a ocorrência da doença em humanos e a preparação dos serviços de saúde e da população para combater o problema.

Tendo em vista que a técnica de ELISA é o teste de referência e que o teste TR-DPP[®] está sendo implantado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de LVC, a comparação de desempenho de ambos os procedimentos é imprescindível para estudos epidemiológicos.

Em estudo realizado com cães no município de São Pedro/SP, onde os casos de LV são recentes, observou-se uma concordância de 74,53% entre os resultados positivos e de 68,7% entre os negativos das de ELISA e TR-DPP[®] (OLIVEIRA et al., 2010). Embora no presente estudo apenas três amostras tenham apresentado resultados positivos, foi possível verificar uma concordância dos resultados tanto nas amostras positivas, quanto nas negativas.

Em estudo realizado com cães em Cuiabá/MT, o teste TR-DPP[®] demonstrou ser um bom preditor de doença e infecção para LVC, apresentando os melhores resultados de sensibilidade e especificidade quando comparado aos testes de ELISA e RIFI (De SANTIS et al., 2013). De Lima et al. (2010), utilizando o TR-DPP[®] para o diagnóstico em cães, obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 92% para LVC. Entretanto, em estudo realizado em área endêmica para LVC, observou que o kit TR-DPP[®] teve melhores resultados para detectar animais positivos sintomáticos (98%) do que assintomáticos (47%) (GRIMALDI et al., 2012). Esse resultado é extremamente

importante, visto que cães assintomáticos tem importante papel na transmissão zoonótica.

Alguns autores relatam que o teste de ELISA que utiliza parasitos inteiros ou lisados brutos, podem apresentar falhas e alguns resultados insatisfatórios como reações cruzadas com outros parasitos (VERAS et al., 2014). No presente estudo foi utilizado esse molde de antígeno (lisado), e os resultados concordantes com o teste de cartão demonstraram-se plenamente satisfatórios. A existência de reações cruzadas com outros agentes não foram investigadas, mas fazem parte das perspectivas da pesquisa. Uma alternativa para contornar esse problema seria a utilização de antígeno baseado em frações do parasito, como o ligante fucose-manose (FML) (CANDIDO et al., 2008).

O conjugado anti-IgG de cão utilizado reconhece a cadeia pesada do anticorpo que pode apresentar variações de sequencia de aminoácidos em diferentes espécies ou mesmo em diferentes isotipos de uma mesma espécie (SILVA et al., 2005; GARCIA, 2009). Outra opção seria utilizar a Proteína A como conjugado da reação, visto que possui alta afinidade pelos anticorpos de classe IgG presentes no soro de animais em resposta a reação (LIMA et al, 2005). Segundo Alvarenga (2012), determinar a diversidade genética permite traçar a dispersão do parasito, auxilia no desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, terapêutica e vacinas, todos esses de grande importância para o controle da LV.

Seixas et al. (2012), realizaram estudo no litoral norte da Bahia, uma área de transmissão ativa do protozoário e ao analisarem possíveis fatores de risco para a infecção, concluíram que idade, sexo e raça não teriam influencia sobre a positividade dos animais, porém a procedência dos animais pode influenciar.

Importante salientar que os felinos também podem participar no ciclo da LV e precisam ser melhor estudado sobre sua importância epidemiológica (SERRANO et al., 2008). Em estudo realizado no município de Araçatuba/SP, Bresciani et al. (2010), evidenciaram a necessidade de mais pesquisas em felinos com relação a sua resposta imune diferenciada frente ao parasito. Este fato ganha importância pela observação de felinos errantes na região de Porto Alegre investigada no presente trabalho.

Embora em 2011 a comercialização e o uso das vacinas contra LVC tenha sido deferida pelo MAPA (BRASIL, 2011), este método ainda é controverso, uma vez que não foi comprovado por meio do xenodiagnóstico, que cães vacinados não são transmissores da enfermidade a vetores. Silva et al. (2012) relata a ocorrência de um cão submetido ao protocolo de vacinação de acordo com fabricante, e o mesmo foi

diagnosticado com LVC, apresentando formas amastigotas no aspirado de lifonodos.

Devido a grande expansão que a LV demonstrou nos últimos anos, os estados da região sul do Brasil ganharam destaque frente ao Ministério da Saúde, ganhando reforços com relação à vigilância epidemiológica em regiões consideradas indenes e na identificação de casos suspeitos e posterior notificação (FREHSE et al., 2010). Se faz necessário que esses esforços continuem, para que novos casos suspeitos sejam identificados e se faça a devida relação com a ocorrência dos flebótomos.

Na região dos casos positivos, ainda não existe o relato da presença da *L. longipalpis* ou *L. cruzi*, esse fato reforça a grande necessidade de mais estudos na região para conseguir comprovar o flebótomo participante do ciclo.

A realização de inquéritos sorológicos em cães, como neste trabalho, pode ser considerada de grande valia para o controle do reservatório canino. Esta identificação de casos serve como ferramenta para direcionar as ações profiláticas necessárias (BRASIL, 2006; BORGES et al., 2014).

CONCLUSÕES

- A população canina estudada é criada em condições que favorecem a ocorrência de Leishmaniose visceral canina.
- Embora a prevalência de anticorpos contra *Leishmania (L.) chagasi* observada seja baixa, existe ambiente propício para transmissão deste protozoário entre cães e a população humana no município de Porto Alegre, RS.
- Embora os resultados das técnicas de ELISA e TR-DPP® tenham sido concordantes nas condições deste experimento, o baixo número de amostras soropositivas não permitiu concluir sobre o seu desempenho comparativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de ehrliquiose canina com antígenos brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciencia Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007.

ALBUQUERQUE, A.L. ARAGÃO, F.R.; FAUSTINO, M.A.G.; GOMES, Y.M.; LIRA, R.A.; NAKASAWA, M.. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, v.71, n.1, p. 78-80, 2007.

ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUSA, V.R.F.; CRUZ, F.A.C.S.; DAHROUG, M.A.A.; FIGUEIREDO, F.B.; MADEIRA, M.F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.21, n.4, p.359-365, 2012.

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

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V.; SOUZA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 227-232, 2005.

ALVAR J., CANAVATE C., MOLINA R., MORENO J., NIETO J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n.3, p. 1–88. 2004.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZI, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological followup after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.88, n.4, p.371-378, 1994.

ALVARENGA, J.S.C. Utilização da técnica de RAPD-PCR para estudos de variabilidade genética de amostras de *Leishmania (L) chagasi* isolados de casos humanos e reservatórios caninos, em Belo Horizonte-MG. **Revista Científica**, v.1, n.1, 2012.

ANDRADE, L. S. Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, estado do Amazonas, Brasil. Rio de Janeiro, RJ. **Tese (Doutorado)** - Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 1998. 125p.

AOUN. O.; MARY, C.; ROQUEPLO, C.; MARIE, J.L.; TERRIER, O.; LEVIEUGE, A.; DAVOUS, B. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (Western blotting, Elisa) and parasitemia levels by PCR quantification. **Veterinary Parasitology**, vol.166, n.1, p. 27-31, 2009.

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

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**, v.17, n.3. p. 123-127, 2008.

BADARÓ, R; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose visceral (Calazar). IN:VERONESE, R.; FOCACCI, R. **Tratado de Infectologia**, São Paulo:Atheneu, v.2, p.1234-1259, 1996.

BANETH, G. Leishmaniasis. IN: Greene, C.E. **Infections Diseases**. 3 ed. Canada: Elsevier, 2006 p.686-689.

BANETH, G.; HOFFMAN, O.; JAFFE, C.L.; STRAUSS, D.; SCHNUR, L.F.; EISENBERGER, S.B.; JACOBSON, R.L.; WARBURG, A. Allopurinol treatment diminishes the infectivity of dogs leishmaniasis to *Lutzomyia longipalpis* sand flies. **Isr. Vet. Med. Assoc.**, v.56, n.2, p.55-60, 2001.

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

BEVILACQUA, P.D.; PAIXÃO, H.H.; MODENA, C.M.; CASTRO, M.C.P.S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53, n.1, p.1-8, 2001.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.H.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v.162, n.2, p.108-120, 2001.

BOLETIM EPIDEMIOLOGICO DA SECRETARIA DA SAUDE/RS – **Centro Estadual de Vigilância em Saúde**. v. 13, n.1, 2011.

BOLETIM EPIDEMIOLOGICO DA SECRETARIA DA SAUDE/RS – **Centro Estadual de Vigilância em Saúde**. ano XII, n.44, 2010.

BORGES, L.F.N.M.; LOPES, E.G.P.; FREITAS, A.C.P.; SILVA, M.X.; HADDAD, J.P.A.; SILVA, J.A.; NICOLINO, R.R.; SOARES, D.F.M. Prevalencia e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.44, n.2, p.352-357, 2014.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI-SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML- Quil A saponin vaccine in na endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v.20, p.3277-3284, 2002.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; BAUER, F.S.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; MORGADO, A.A. Immunogenicity assay of the Leishmune[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 26, p.4491-4997, 2008.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.F.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E.A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. Wild and synantropic hosts of *Leishmania (Vianna) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**,v. 97, p. 291-296, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral** – Brasília:Ministério da Saúde, 137p.2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília:Ministério da Saúde, 120p. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília:Ministério da Saúde, 2 ed., 2007.

BRESCIANI, K.D.S.; SERRANO, A.C.M.; MATOS, L.V.S.; SAVANI, E.S.M.M.; D'AURIA, S.R.N.; PERRI, S.H.V.; BONELLO, F.L.; COELHO, W.M.D.; AOKI, C.G.; COSTA, A.J. Ocorrência de *Leishmania spp.* em felinos do município de Araçatuba, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.19, n.2, p.127-129, 2010.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**. v.76, p.173-180, 1998.

CAMARGO-NEVES, V.L.; KATS, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPINDOLA, R.M.F.; CRU. O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** v.17, n.5, p.1263-1267, 2001.

CÂNDIDO, T.C.; PERRI, S.H.V.; GERZOSCHKWITZ, T.O.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.175-181, 2008.

CARVALHO, F. A. A.; CHAREST, H.; TAVARES,C.A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E.P.; RABELLO,A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, p. 289-295, 2002.

CERQUEIRA, E.J.L., SILVA, E.M.; MONTE-ALEGRE, A.F. Considerações sobre pulgas (Siphonaptera) da raposa *Cercocyon thous* (Canidae) da área endêmica de

leishmaniose visceral de Jacobina, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.1, p.91-93, 2000.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR,S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral Leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.11, p.873-882, 2007.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.141, n.21, p.539-543, 1997.

COSTA, C.H.N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.2, p.223-228, 2001.

COSTA, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F. Canine leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v.174, n.3, p.636-643, 2007.

COSTA, C.H.; WERNWCK, G.L.; RODRIGUES, L. JR.; SANTOS, M.V.; ARAUJO, I.B.; MOREIRA, S.; GOMES, R.B.; LIMA, S.S. Household structures and urban services: neglected targets in the controle f visceral leishmaniosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitoly**. v.99, n.3, p.229-236, 2005.

COURA, J.R, **Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias**. 1 ed. São Paulo:Guanabara, vol I, 2005.

COURA-VITAL,W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; BRAGA, S.L.; MORAES, M.H.F.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infecrion of dogs from urban área of Brazil as identified by molecular methods. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.8, 2011.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectioueness in a Cohort of Brazilian Dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infection Diseases**, n.186; p.1314-20, 2002.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservois of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v.149, n.3-4, p.139-146, 2007

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Rio de Janeiro: **Serviço nacional de educação sanitária**, 161 p., 1955.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados do estado do Ceará. **Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo**, São Paulo, 1956, 162p.

DE SANTIS, B.; SANTOS, E.G.B.; SOUZA, C.S.F.; CHAVES, S.A.M. Performance off DPPTM immunochromathographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animals Science**, v.50, n.3, p.198-205, 2013.

DESJEUX P. Human Leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Organization Statistics Quarterly**, 45: 267-275. 1992.

DESJEUX P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinical Dermatology** 14:417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** v.27, p. 305-318, 2004.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, p.1240-1242, 1997.

DOMINGOS, I.H. Teste Rápido TR-DPP[®] no contexto do diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral canina. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2012, 86p.

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

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.2, p.125-130, 1996.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. IN: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006. Jaboticabal, **Anais...**, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006, p.9-14.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, P.R.B.; LARANGEIRA, D.F.; OLIVEIRA, L.S.; MALTA, M.C.C.; GOMES, M.C.; BASTOS, B.L.; PORTELA, R.W.; BARROUIN-MELO, S.M. Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.4, p.528-534, 2013.

FERRER, L. Canine Leishmaniosis: evaluation of the immunocompromised patient. IN: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8., 2002, GRANADA. **Proceedings....** Disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653>

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. IN: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet, 1999. p.6-10.

FIGUEIREDO, F.B.; LIMA JUNIOR, F.E.F.J.; TOMIO, E.; INDÁ, F.M.C.; CORREA, G.L.B.; MADEIRA, M.F. Leishmaniose Visceral Canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. **Acta Scientia Veterinaria**, v.40, n.1, p1-4, 2012.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária**. 9 ed., São Paulo:Roca, p. 543-544, 2008.

FREITAS, E.; MELO, M.N.; COSTA-VAL, A.P.; MICHALICK, M.S.M. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potencial for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.13, p.159-167, 2006.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Leishmaniose. Doenças Parasitárias. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2002.

GALATI, E.A.B.; NUNES, V.L.B.; DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; CRISTALDO, G.; ESPINDOLA, M.A.; ROCHA, H.C.; GARCIA, W.B. Estudo dos flebotomíneos (DIPTERA, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública São Paulo**, v.30, n.2, p.115-128 1996.

GARCIA, A.M.; REBELO, J.M.M.; CALDAS, A.; GOMES,R.; VINHAS,V.; BARRAL,A.; SILVA, A.A.M.; COSTA, J.M.M. História natural da infecção causada por *Leishmania chagasi* em cães (*Canis familiares*) domiciliados em área endêmica da ilha de São Luis – Maranhão, Brasil. **Gaz. Médica Bahia**, v.79, n3, p 147-155, 2009.

GARCIA, F.A.I. Avaliação das subclasses de IgG em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos ou não a tratamento, e em animais vacinados contra a doença. **Tese** (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, São Paulo, 2009, 122p.

GRAMICCIA, M.; GRANDONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n.11-12, p 1169-1180, 2005.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo:Atheneu. 2002. P.36-53.

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**, v. 31, p. 26-36, 2006.

GOMES, A.C.; PAIM, G.V.; OTTATI, S.M.; COUTINHO, S.G.; REICHMANN, M.L. & SCAPOLAN, H.B. 1987. Observações sobre a importância epidemiológica do cão na

Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo. In: **Anais do I Congresso Brasileiro de Zoonoses** (Rio de Janeiro). P. 69.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: **International Canine Leishmaniasis Forum**, 2002, Sevilla, Spain. Proceedings...Sevilla, Spain, 2002. p.7-14.

GRIMALDI JR. G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GRIMALDI, G.JR.; TEVA, A.; FERREIRA, A.L.; SANTOS, C.B.; PINTO, I.S.; AZEVEDO, C.T.; FALQUETO, A. Evolution of a novel chromatografic immunoassay based on Dual Path Platform technology (DPP CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p.54-59, 2012.

HARRUS, S. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v.86, n.4, p.361-368, 2002.

IESBICH, M.M.P. Avaliação de amostras de soro canino para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), em áreas de baixa endemicidade/Porto Alegre/RS através de Métodos Diagnósticos Laboratoriais Imunológicos e Biomoleculares. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, 98p.

JERÔNIMO, S.M.B.; DUGALL, R.F.; BRAZ, C.; CHENG, G.R.; MONTEIRO, E.T.; NASCIMENTO, D.R.; MARTINS, T.M.; KARPLUS, M.F.; XIMENES, C.C.; OLIVEIRA, V.G.; PINHEIRO, W.; PEREIRA, J.M.; PERALTA, J.; SOUZA, I.M.; MEDEIROS, R.D.; PEARSON, T.L.; BURNS, E.W.; PUGH, M.E. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis, in northeast Brazil. **Scand. J. Infect. Dis.** v.36, p. 443-449, 2004.

JESUS, J.R. Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania spp.* através da reação de Imunofluorescência Indireta em população canina da região da Lomba do Pinheiro, cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, a partir de casos autóctones humanos de Leishmaniose Tegumentar. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 80p.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E.; SACKS, D. Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v.290, p.1351-1354, 2000.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CACERES, A.G.; UEZATO, H.; MIMORI, T.; HASSHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal Environment Research Public Health**. v.7, p.814-826, 2010.

KAUR, S.; KAUR, T.; GARG, N.; MUKHERJEE, M.; RAINA, P.; ATHOKPAM, V.

Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4+ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v.103, p.1413–1419, 2008.

LACERDA, M.M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.8, n.3, p.489-495, 1994.

LACHAUD L., MARCHERGUI-HAMMAMI S., CHABBERT E., DEREURE J., DEDET J.P., BASTIEN P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAINSON R. & RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: A review. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100(8), p. 811-827, 2005.

LAINSON R., SHAW J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitology Human**, v. 63(2), p. 134-145, 1988.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. IN: Service N.W. (Ed). **Demography and vector- Borne Diseases**. Boca Ranton: CRC Press, p.85-106, 1989.

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

LAURENTI, M.D. Patologia e patogenia das leishmanioses. **Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo**, 2010, 140p.

LEISHMUNE. Manual técnico de leishmaniose visceral canina. Campinas: Fort Dodge,

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**, 1ed. Iowa State University Press, 1980, p.414.

LIMA, V.M.F.; IKEDA, F.A.; ROSSI, C.N.; FEITOSA, M.M.; VASCONCELOS, R.O.; NUNES, C.M. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN- γ levels occur in dogs vaccinated with Leishmune[®] in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol Immunopathol**. v.135, p.296-302, 2010.

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

LOPES, M.G.; MENDONÇA, I.L.; FORTES, K.P.; AMAKU, M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora*

caninum and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.111-114, 2011.

LUCIANO, R.M.; LUCHESIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.46, n.3, p.181-187, 2009.

MACHADO, J.G.; MORAES, J.R.C.M.; COSTA, R.T.; NASCIMENTO, E.; MOREIRA, E.C. Comparação dos resultados dos métodos de imunofluorescência indireta e ELISA indireto no diagnóstico sorológico da Leishmaniose visceral realizada pelos laboratórios de Belo Horizonte, MG, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.1, p.47-51, 2007.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; LEAL, C.A.; MARZOCHI, M.C.A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 8, p. 440-444, 2004.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C.A.; MELO, C.X.; CONFORT, E.M.; MARZOCHI, M.C.A. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.138, n3-4, p.366-370, 2006.

MADEIRA, M.F.; SERRA, C. M.; UCHOA, C.M.; DUARTE, R.; CRUZ, D.A.; PERDOMO, C.C. Leishmaniose canina: avaliação sorológica de 310 cães na região de Itaipu, Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v.16, n.2, p.568, 2000.

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

MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009. 557p.

MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; GOMES, A.A.D.; SILVA, A.R.S.; VIEIRA, R.F.C.; CAMACHO, A.A.; QUINNG, J.; CHANDRASHEKARG, R. Validation of *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.175, n.1, p. 15-19, 2011.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, supl. 2, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M.C.A.; SABROZA, P.C.; TOLEDO, L.M.; MARZOCHI, K.B.; TRAMONTO, N.C.; RANGEL-FILHO, F.B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro- Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, n.4, p.432-446, 1985.

MAURICIO I.L., GAUNT M.W., STOTHARD JR., MILES M.A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology** 122:393–403, 2001

MAIA-ELKHOURY ANS et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p.2941-2947, 2008.

METTLER, M.; GRIMMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and get tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dog. **Journal Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5515-5519, 2005.

MICHALICK, M.S.M. O gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARD, P.M, VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11^oed. São Paulo:Atheneu, 2005, p.41-46.

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

MONTEIRO, C.C. O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada. **Mestrado** (Dissertação) – Fundação Oswaldo Cruz, 2012, 71p.

MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.R.; LAURENTI, M.D. Comparision os parasitological, immunological and molecular methods fot the diagnosis of leishmaniosis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3, p.245-52, 2007

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: epimiological risk and the experimental model. **Trends Parasitology**, v.18, p.399-405, 2002.

MORITZ, A.; STEUBER, S.; GREINER, M. Clinical follow-up after treatment of canine Leishmaniasis. **Tokai J. Exp. Clin. Med.**, v.23, p.279-283, 1999.

MOSSER, D.M.; ROSENTHAL, L.A. *Leishmania* – macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biol.** v.4, p. 315-322, 1992.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana** 11ed. São Paulo:Atheneu, 2005, 494p.

NOGUEIRA, F.S. Avaliação clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por Leishmaniose visceral, submetidos à terapia com Anfotericina B. **Tese** (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, 2007, 119p.

NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; DA SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVEZ-FILHO, J.; PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v.170, p.131-133, 2010.

OLIVEIRA, A.P.; FREIRE, M.P.; HIRAMOTO, R.M.; TOLEZANO, J.E.; CASTELLÃO, K.G; TANIGUCHI, H.H.; PRATTI, A.N. Análise comparativa de três diferentes testes sorológicos empregados na detecção da Leishmaniose visceral em cães, **Revista Saúde**, v.4; 2010.

OLIVEIRA, J.G.; NOVAIS, F.O.; OLIVEIRA, C.I.; CRUZ, A.C.; CAMPOS, L.F.; ROCHA, A.V.; BOAVENTURA, V.; COSTA, J.M.; BARRAL, A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.94, p.55-59, 2006.

OLIVEIRA, T.M.F.S.; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.7-11, 2008.

OLIVEIRA, T.M.E.S.; VASCONCELOS, E.J.R.; NAKAGUI, A.C.H.; DEFINA, T.P.A.; JUSI, M.M.G.; BALDINO, C.D.; CRUZ, A.K.; MACHADO, R.Z. A novel A2 allele found in *Leishmania (leishmania) infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n.1, p.42-48, 2011.

ORDEIX, L. SOLANO-GALLEGO, L.; FONDEVILA, D. Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 187-191, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANCA-SILVA.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M. Impacto do controle canino sobre a epidemiologia da leishmaniose visceral canina e humana no Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.5, p.510-517, 2001.

PARANHOS, M.S.; FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.C.; GRIMALDI JR, G.; CARVALHO, L.P.; OLIVEIRA, A.J.S. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniosis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, 55:39-44, 1996

PARRA, L.E.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; SOUZA, L.O.; PALATNIK DE-SOUSA, C.B. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine** 25:2180–2186, 2007.

PEREIRA E.F. A. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Paraná state of southern Brazil, **Experimental Dermatology**, v. 17, n.12, p. 1024-1030, 2008.

POGUE, G.P.; KOUL, S.; LEE, N.S.; DWYER, D.M.; NAKHASI, H.L. Identification of intra- and interspecific *Leishmania* genetic polymorphisms by arbitrary primed polymerase chain reactions and use of polymorphic DNA to identify differentially regulated genes. **Parasitology Research**, v.81, n.4, p.282-290, 1995.

POUBEL, S. B. Variabilidade genética de isolados de *Leishmania infantum* x *L. chagasi* procedentes de várias regiões do Brasil. **Mestrado** (Dissertação) – Universidade Federal do Paraná, 2010, 75p.

RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; DAS, A.; ALI, N. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis. **BMC Microbiology**, v.10, p.181, 2010.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, 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**, v.81, p.68-75, 2006.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.128, p.87-95, 2009.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008, 330p.

RODRIGUES, R.D.; SOUZA, R.R.; GOMES, L.R.; JUNIOR, L.M.S.; SILVA, A.L.D.A.; MEDEIROS, A.A. Leishmaniose Visceral Canina – Diagnóstico parasitológico: relato de caso. **Vet. Not., Uberlândia**, v.19, n.1, p.1-6, 2013.

ROURA, X. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Vet Rec**, v. 144, p. 262-264, 1999.

SANTAROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v.2, n.11, 1997.

SANTOS, S.O.; ARIAS J. RIBEIROA.A.; HOFFMANN M.P.; FREITAS R.U.; MALACCO M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, p. 315-317, 1998.

SASSAKI, C.Y ; COLODEL. M.M.; FERREIRA, I.; NOGUEIRA, F.S.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H.; ROCHA, N.S. Comparison of different diagnostic tests in dogs uninfected and naturally infected with visceral leishmaniasis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. V. 17, n. 3, p.348-352, 2011.

SEIXAS, M.M.; JUNIOR, J.T.M.; FRANKE, C.R.; BARROUIN-MELO, S.M. Positividade para Leishmaniose visceral canina: existem fatores caninos que contribuem? **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.36, n.2, p.358-367, 2012.

SERRANO, A. C. M.; Nunes, c.m.; SAVANI, E.S.M.; DÚRIA, S.R.N.; BONELLO, F.L.; VASCONCELOS, R.O.; LIMA, V.M.F.; BRESCIANI, K.D.S. Leishmaniose em

felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. **Clínica Veterinária**, n. 76, p. 36-40, 2008.

SHARMA, U.; S. SINGH, Immunobiology of leishmaniasis, **Indian J Exp Biol**, v.47, p. 412-423, 2009.

SILVA, A.R.S.; MACEDO, A.A.; MOROZ, L.R.; FERNANDES, R.R.; RODIGHERI, S.M.; GOMES, A.A.D. Caso alóctone de leishmaniose visceral canina, no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.769-774, 2012.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública**, v.21, n.1, p. 324-328, 2005.

SILVA, D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C.; SOUZA, C.M.; FIGUEIREDO, F.B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, n.179, p.257-261, 2011.

SILVA, D. F. P. Inquérito Sorológico de leishmaniose Canina na cidade de Rio Verde-GO. **Mestrado** (Dissertação) – Universidade de Rio Verde, Goiás, 2007, 54p.

SILVA, K.L.O.; SANTOS, D.P.; COELHO, N.M.D.; SILVA, D.C., OKAMOTO, A.C.; GAETTI-JARDIM JUNIOR, E. Vacinas contra Leishmaniose: Uma revisão. **Arch Health Invest**, v.2, n.4, p.18-28, 2013.

SILVA, V.M. Estudo de *Rhipicephalus sanguineos* (Acari:Ixodidae) como potencial vetor de Leishmaniose visceral canina no Distrito Federal. **Mestrado** (Dissertação) – Universidade de Brasília. 2012, 139p.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S.J. *Lutzomya longipalpis* (Diptera:Psycodidae:Phlebotominae): a review. **Caderno Brasileiro de Ciências**, v.75, n.3, p.301-330.

SOLANO-GALLEGO, L. RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; SOUZA, A.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; CAMACHO, A.A. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29.; n.2, p.150-152, 2009a.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.1-18, 2009b.

SOUZA, B. M. P. S. et al. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 5, p. 31-40, 2004.

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

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

STEINDEL, M.; MENIN, A.; EVANGELISTA, T.; STOCO, P.H.; MARLOW, M.A.; FLEITH, R.C.; PILATI, C.; GRISARD, E.C. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.4, p.490-496, 2013.

SVOBODOVÁ, M.; VOTÝPKA, J.; NICOLAS, L.; VOLF, P. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. **Microbes and Infection**, v.5, n.5, p.361-364, 2003.

TAFURI, W.G.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALIK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes em paraffin-embedded canine tissues. **J Immunol Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

TAFURI, W.G.L.; OLIVEIRA, O.; MELO, M.R.; MICHALIK, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmanioses: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TARTAROTTI A.L.; DONINI, M.A.; ANJOS, C.; RAMOS, R.R. Vigilância de reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**, v.13, n.1, p.3-6, 2011.

TASCA, K.I.; BUZETTI, W.A.S.; TENORIO, M.S.; PAULAN, S.C.; LIMA, F.L.; QUEIROZ, N.M.G.P. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.1, p.27-33, 2009.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; ELVIA, O. Canine visceral leishmanioses in Colombia: relationship infestivity for sand flies. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 64:119-124, 2001.

VANNIER-SANTOS, M.A.; COSTA, J.; SOUZA, W. *Leishmania spp.* e Leishmanioses. In: SOUZA, W. **Protozoologia Médica**. Rio de Janeiro: Rubio. 2013, 382p.

VERAS, P.S.T.; FRAGA, D.B.M.; SALCÀ, M.S.; GUEDES, C.E.S. New advances in the diagnosis of canine visceral Leishmaniasis. Leishmaniasis – In: CLABORN, D.M. **Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. 2014. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment>. Acesso em 20/03/2014.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.40, n.1, p.253- 256, 1996.

ZAFFARONI, E.; RUBAUDO, L.; LANFRANCHI, P.; MIGNONE, W. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). **Veterinary Parasitology**, v.81, p.11-19, 1999.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (who). Leishmaniasis: the global trend. Geneva, jan. 2009.

APÊNDICE A

Termo de Livre Consentimento

Este projeto tem por objetivo estudar a prevalência de soropositivos para *Leishmania (L.) chagasi*, em uma amostra representativa da população de cães de Porto Alegre. O parasito é causador da Leishmaniose visceral, doença que afeta animais silvestres, domésticos e o homem. É transmitida por um flebotomíneo conhecido como Mosquito Palha, Birigui ou Cangalhinha. O parasito pode estar “alojado” no organismo de alguns animais de estimação, sem que os mesmos apresentem qualquer sinal ou sintoma da doença, e estes tornam-se então um risco de transmissão para os seres humanos. Na realização deste estudo será necessária a coleta de sangue de cão selecionado, visando realização de exames laboratoriais para diagnóstico de soropositividade da doença. Estes exames não implicam em custos para o proprietário do animal, assim como, não implicam em risco de vida para os animais.

A partir destas informações, aceito o convite de participar dessa pesquisa e autorizo a coleta de sangue do cão selecionado para que se processem os exames necessários.

Isto posto, declaro que fui informado satisfatoriamente sobre os objetivos e justificativas dessa pesquisa e sobre o risco, procedimento e benefícios envolvidos na realização da mesma. As informações que eu fornecer permanecerão confidenciais e só serão utilizadas com objetivo científico, podendo eu retirar do estudo o cão pelo qual sou responsável a qualquer momento.

Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Porto Alegre, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do entrevistado

M.V Mariana Caetano Teixeira
Pesquisadora Responsável. CRMV/RS 8970

11- GPS: Latitude 'S'

--	--	--	--	--	--	--	--

Longitude 'W'

--	--	--	--	--	--	--	--

12-UF:

R	S
---	---

Dados do Animal

13- Raça: -SRD -Outros:

14- Sexo: -Macho -Fêmea

15- Tipo de Pelagem: -Curto -Longo

16- Cor Predominante da Pelagem:

17- Cor secundária da pelagem:

18- Vacinação: -Não -SIM -Contra Leishmaniose

19- Idade: -Até 12 meses -Acima de 1 ano até 7 anos -Acima de 7 anos

20- Uso de Medicamento: -Sim -Não

21 - Qual Medicamento:

MÉDICO VETERINÁRIO RESPONSÁVEL PELA COLETA																																							
22- Nome:																																							
23-Número do CRMV:																							25- O Médico Veterinário atua como... <input type="checkbox"/> -Servidor Municipal <input type="checkbox"/> -Veterinário Privado <input type="checkbox"/> -Servidor Estadual <input type="checkbox"/> -Voluntário <input type="checkbox"/> -Militar																
23- Telefone:																																							
24: Assinatura ou Rubrica:												_____																											

SINAIS E SINTOMAS

26- Estado Geral: - - -
 -Bom -Regular - Ruin -

27- Desidratação: - - - -
 -Ausente -Leve - Severo

28- Mucosas: - - - - - - - - - -
 -Hipocoradas -Normocoradas - Hiperêmicas -Ictéricas

29- Perda de Apetite:
 -Sim -Não

30- Emagrecimento:
 -Sim -Não

31- Caquexia:
 -Sim -Não

32- Apatia:
 -Sim -Não

33- Distúrbios Urinários:
 -Sim -Não

34- Alopecia Local:
 -Sim -Não

35- Alopecia Generalizada:
 -Sim -Não

36- Epistaxe:
 -Sim -Não

**37- Descamação Cutânea
Furfurácea**
 -Sim -Não

38- Pêlo Opaco:
 -Sim -Não

39- Úlceras Crostosas:
 -Sim -Não

40- Onicogribose:
 -Sim -Não

**41- Paresia dos Membros
Posteriores:**
 -Sim -Não

**42- Dor à Palpação
Renal:**
 -Sim -Não

**43- Alterações
Oftálmicas:**
 -Sim -Não

**44- Edema de
Membros:**
 -Sim -Não

45- Esplenomegalia:
 -Sim -Não

46- Adenite:
 -Sim -Não

47- Hepatomegalia:
 -Sim -Não

48- Artralgia:
 -Sim -Não

49- Outras Localizações de Lesões:

INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

50- Onde Nasceu o Animal: - - - - -

- Residência -

-Outra - Qual?

51- Onde foi criado o animal? - - - - -

- Residência -

-Outra - Qual?

52- O cão desloca-se: Não Sim - Onde? - - - - -

53- Domicílio:

- Área Urbana

-Área Rural

-Região de Mata

54- Ambiente do Animal

-Dentro de Casa

-Quintal

-Acesso a Rua

55- Convive com Outros Animais

-Sim -Não

Quais?

56- Algum Morador com Leishmaniose Visceral?

-Sim -Não

Quantos?

57- Algum Caso Já Confirmado de Animal com Leishmaniose Visceral?

-Sim -Não

Residência: Sim Não

Vizinhança: Sim Não

58- O Animal Continua na Residência?

-Sim -Não

Qual o Destino?

TIPO DE MATERIAL COLETADO

59- Biópsia:

-Pele da Orelha -Lesão

-Pele da Escápula -Não Coletado

Aspirado de Medúla Óssea

Aspirado Ganglionar

60- Sangue:

-Sim -Não

61- Material de Necrópsia:

Baço Fígado

Outros:

OBSERVAÇÕES: TRANSPORTE DE MATERIAIS

62- Soro: Enviá-lo Resfriado ao Laboratório

63- Material de Necrópsia ou Biópsia: Enviá-lo congelado ao laboratório

Observação: Outras possibilidades de conservação devem ser pré acordadas com o laboratório

SOLICITAÇÃO AO LABORATÓRIO

64- [] Sorológico

65- [] Parasitológico

66- [] Tipificação de Leishmania

Dúvidas: Entrar em contato com CEVS - fone: 3901 1108 ou LACEN - fone: 3288 4040