

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Veterinária

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO RIO GRANDE DO SUL
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Alessandra Guizzo da Rocha

Porto Alegre

2012/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

Leishmaniose Visceral Canina no Rio Grande do Sul
Revisão Bibliográfica

Autor: Alessandra Guizzo da Rocha

Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Flávio Antônio Pacheco de Araújo

Coorientador: Mariana Caetano Teixeira

PORTO ALEGRE

2012/1

RESUMO

Os agentes causadores da Leishmaniose Visceral são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, do subgênero *Leishmania*, com três espécies principais: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, e *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Sendo a última espécie responsável pela doença nas Américas e considerada por alguns autores espécie semelhante a *L.(L.) infantum*. Assim, respeitando regras de prioridade o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum*. No Brasil, duas espécies de flebotomíneos estão relacionadas com a transmissão deste protozoário *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Os principais reservatórios da doença em áreas urbanas são os cães (*Canis familiaris*), raposas e marsupiais, estão vinculados na manutenção em ambientes silvestres. A transmissão se dá pela picada das fêmeas de insetos flebotomíneos. O diagnóstico é baseado nos achados clínico-epidemiológicos e laboratoriais. O Rio Grande do Sul era considerado área indene para LV até novembro de 2008, quando foi notificado um caso suspeito de LVC em um cão proveniente do município de São Borja. Com a autoctonia comprovada deste caso, houve desencadeamento de investigação epidemiológica em outros municípios, registrando a presença de *L. longipalpis*, casos caninos com sorologia reagente e caracterização de *L. chagasi* em amostras biológicas caninas em alguns desses casos. O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão de literatura sobre a leishmaniose visceral canina e a ocorrência desta zoonose no estado do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

The causative agents of visceral leishmaniasis are trypanosomatid protozoa of the genus *Leishmania*, subgenus *Leishmania*, with three major species: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. As the last species responsible for disease in the Americas, considered by some authors similar species *L. (L.) infantum*. Thus, priority rules respecting the name would be synonymous with *infantum chagasi*. In Brazil, two species of sandflies are related to the transmission of this protozoan *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi*. The main reservoirs of the disease in urban areas are dogs (*Canis familiaris*), foxes and marsupials, are bound to maintain in wild environments. Transmission is by the bite of female phlebotomine insects. Diagnosis is based on clinical and epidemiological and laboratory. The Rio Grande do Sul was considered harmless to LV area until November 2008 when it was reported a suspected case of LVC in a dog from the municipality of San Borja. With this proven autochthonous case was triggering epidemiological investigation in other cities, registering the presence of *L. longipalpis*, canine cases with positive serology and characterization of *L. chagasi* in canine biological samples in some of these cases. The aim of this paper is to review the literature on canine visceral leishmaniasis and the occurrence of this zoonosis in Rio Grande do Sul

Dedico este trabalho à toda equipe do Laboratório de Prozoologia, em especial, ao professor Flávio Antônio Pacheco de Araújo por me oportunizar estágio no Protolab – UFRGS e à MV Mariana Caetano Teixeira, que me mostrou e me ensinou com tanto carinho o encanto da Protozoologia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mosquito Palha (<i>Lutzomyia longiplapis</i>).....	13
Figura 2	Forma Promastigota.....	15
Figura 3	Forma Amastigota	15
Figura 4	Manifestações clínicas da LVC.....	24
Figura 5	Classificação dos municípios do RS em relação à LVC	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	10
3	HISTÓRICO.....	12
4	VETOR.....	13
5	CICLO BIOLÓGICO.....	15
6	FORMAS DE TRANSMISSÃO.....	16
6.1	Transmissão vertical ou transplacentária.....	17
6.2	Transmissão venérea.....	17
6.3	Transmissão por transfusão sanguínea.....	18
7	PATOGENIA.....	19
8	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	22
9	DIAGNÓSTICO.....	25
9.1	Diagnostico clínico.....	26
9.2	Diagnostico parasitológico.....	27
9.3	Diagnostico sorológico.....	28
9.4	Diagnóstico molecular.....	31
9.5	Diagnóstico imunológico.....	31
9.6	Cultivo parasitológico.....	32
9.7	Xenodiagnóstico.....	32
10	EPIDEMIOLOGIA.....	33
11	TRATAMENTO.....	36
11.1	No cão.....	36
12	PREVENÇÃO E CONTROLE.....	38
12.1	Medidas Preventivas.....	38
12.1.1	Dirigidas à população humana.....	38
12.1.2	Dirigidas ao vetor.....	38
12.1.3	Dirigidas à população canina.....	38
12.2	Medidas de Controle.....	39
13	LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS.....	40
14	SAÚDE PÚBLICA.....	42
15	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO RIO GRANDE DO SUL.....	43
	ANEXO.....	45
	REFERÊNCIA.....	46

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a organização mundial de saúde, a Leishmaniose Visceral (LV) é uma das seis endemias mundiais afetando de um a dois milhões de pessoas a cada ano. Estima-se que cerca de 360 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção no mundo. Ocorre em 47 países e tem como agente etiológico três espécies *Leishmania donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania infantum* na China, Ásia central, Europa e África; *Leishmania chagasi*, na América do sul e central (CAMARGO et al., 2007).

A LV dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2006).

A doença é registrada em diversas regiões do mundo, e apresenta algumas variações no ciclo epidemiológico, conforme a espécie do agente etiológico, a região geográfica considerada e as espécies de mamíferos susceptíveis que são expostas ao risco da infecção (CAMARGO et al., 2007). O agente etiológico da LV no Brasil é o protozoário do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, sendo a *Leishmania chagassi* a espécie comumente isolada em pacientes com a enfermidade. A LVC apresenta-se como importante doença parasitária em cães, em função das suas características clínicas, transmissibilidade e potencial zoonótico (GRIMA, 2005).

Inquéritos sorológicos caninos realizados na Espanha, na França, na Itália e em Portugal estimam que 2,5 milhões de cães daqueles países estão infectados com LV. O número de cães infectados na América do Sul é também estimado em milhões, com altas taxas de infecção relatadas em algumas áreas do Brasil. Vale ressaltar, que mesmo com a eliminação dos cães soropositivos ainda tem-se observado a tendência de expansão da doença, principalmente nos centros urbanos (CAMARGO et al., 2007).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região nordeste (BRASIL, 2006).

No Brasil, a LVC, também denominada leishmaniose visceral americana (LVA), tem sido registrada como sendo resultante da infecção pela *Leishmania (L.) chagasi* estando envolvido o vetor *Lutzomyia longipalpis* (FRASER, 2008). Acomete os mamíferos, inclusive o homem, sendo que os cães atuam como reservatório do parasita (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Os canídeos, por atuarem como os principais reservatórios naturais, desempenham importante papel na epidemiologia. No Brasil, as espécies *Dusicyon ventulus*,

Cerdocyon thous e *Chrysocyon brachyurus* são reservatórios silvestres, enquanto *Canis familiaris* atua como reservatório doméstico (GONTIJO & MELO, 2004). Estes animais, por apresentarem elevada intensidade parasitária de formas amastigotas na pele, favorecem a infecção dos vetores, tornando altamente eficientes na manutenção do parasito nos focos endêmicos (MORENO & AVAR, 2002; OMS, 2006). As espécies de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* constituem vetores biológicos no Brasil (SANTOS et al., 1999).

2 AGENTE ETIOLÓGICO

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanosomatídeos de gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota nos tecidos dos vertebrados (GENARI et al. 2002). A forma possui forma ovoide ou esférica, mede aproximadamente 3-6,5(μ) por 1,3-3(μ). apresenta núcleo, cinetoplasto e flagelo rudimentar.

GONTIJO & CARVALHO (2003) descreveram a sistemática do gênero *Leishmania* sp.:

Reino: Protista

Sub-reino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Sub-filó: Mastigophora

Classe: Zoomastigophorea

Ordem: Kinetoplastida

Sub-ordem: Trypanosomatina

Família: Trypanosomatidae

Gênero: *Leishmania*

Sub-gênero: *Leishmania*

Espécie: *chagasi*

No momento existem divergências sobre o uso do nome específico *chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral. Com base nos perfis isoenzimáticos, alguns autores consideram que *Leishmania (Leishmania) chagasi* é igual à *Leishmania (Leishmania) infantum* e, por isso, o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum*.

Porém, outros autores chamam atenção para diferenças bioquímicas e preferem, por enquanto, manter o nome *chagasi*. O uso do nome *Leishmania donovani chagasi* é incorreto, pois a *L. donovani* pertence a um grupo geneticamente diferente, que causa leishmaniose visceral no subcontinente indiano.

Leishmania infantum e *Leishmania donovani* são os agentes causadores na área do mar Mediterrâneo e no Oriente Médio, enquanto *Leishmania chagasi*, *Leishmania braziliensis*

e *Leishmania mexicana* constituem as espécies principais na América Central e do Sul (FRASER, 2008).

A LVC apresenta-se como importante doença parasitária em cães, em função das suas características clínicas, transmissibilidade e potencial zoonótico (GRIMA, 2005). Muitas espécies de mamíferos, como cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores são naturalmente infectados e subseqüentes inoculações de formas promastigotas do parasito na corrente sanguínea de um hospedeiro vertebrado. O ciclo doméstico da transmissão da LV no Brasil envolve o homem, o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* como vetor e o cão (*Canis familiaris*) como reservatório (CLAUDIA et al., 2007).

3 HISTÓRICO

Inicialmente, a LV foi descrita como uma doença esporádica, do ambiente silvestre ou rural, atingindo indiferentemente seres humanos ou cães que vivessem em contato íntimo com a mata; posteriormente foi caracterizada como de ocorrência endêmica, com surtos epidêmicos esporádicos, em zonas de “boqueirão” de áreas rurais do Nordeste Brasileiro.

A LV, na atualidade, tem sido apontada como doença reemergente, caracterizando nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente; expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e também um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas, como o Nordeste e o Sudeste. Cidades como: Boa Vista e Santarém (Região Norte); Teresina, São Luiz, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Araçuaí, Sabará, Perdões e Rio de Janeiro (Região Sudeste) e Cuiabá (Região Centro - Oeste) já vivenciaram ou vivenciam, recentemente, epidemias de LV humana e canina.

Possui amplo espectro epidemiológico com distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. Na América Latina ela está presente em 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil. No Brasil a doença se caracterizava por se apresentar em regiões tipicamente rural e principalmente nas regiões norte e nordeste.

Atualmente ela vem sendo notificada e confirmada em áreas urbanas e se expandindo para as outras regiões do país. Até 2008, a região sul nunca havia apresentado casos autóctones de Leishmaniose Visceral Humana, todos os casos confirmados na região eram provenientes de regiões endêmicas. No início de 2009 no município de São Borja - RS e na região de fronteira com a Argentina foi identificado cães com diagnóstico clínico de leishmaniose visceral, posteriormente isolou-se o agente *Leishmania chagasi*, destes animais, paralelamente surge os primeiros casos autóctones em humanos no Rio Grande do Sul.

4 VETOR

No Brasil, especialmente, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longiplapis* e *Lutzomyia cruzi* (BRASIL, 2006). A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul. No Brasil, a distribuição geográfica de *L. longiplapis* é ampla e parece ainda estar em grande expansão.

São pequenos insetos de 1 a 3 mm de comprimento, com hábito crepuscular e noturno, de coloração clara e facilmente reconhecidos pelo seu comportamento 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 de baixa incidência de luminosidade. Esses insetos podem ser encontrados ao redor das residências e locais sombreados e com matéria orgânica (galinheiro, chiqueiro, canil, lixeiras, etc.) e também em seu interior. O mosquito adapta-se facilmente ao peridomicílio e variações de temperatura.

Figura 1: Mosquito Palha (*Lutzomyia longiplapis*)



Fonte: <http://www.infektionsbiologie.ch/>

Ciclo evolutivo: as fêmeas do mosquito geralmente realizam um repasto sanguíneo completo para se dar um ciclo gonotrófico. O ciclo de vida completo compõe-se da seguinte forma: fase embrionária, de 7 a 10 dias, fase larvária de 15 a 60 dias, fase de pupa, de 7 a 14 dias e adulto, cuja longevidade é de 20 dias. O tempo do desenvolvimento do ovo ao adulto é de aproximadamente 30 dias, a temperaturas médias de 20°C. As temperaturas inferiores

afetam o crescimento larvário e a atividade do inseto adulto torna-se diminuída, aumentando, portanto o tempo de desenvolvimento do ovo ao adulto.

As fêmeas desses insetos precisam ingerir sangue para o desenvolvimento dos ovos e, dessa forma, picam tanto o cão quanto o homem, principalmente durante a estação chuvosa, quando invadem as residências. Ao picar o homem ou o cão, o flebótomo pode transmitir o protozoário *L. chagasi*, responsável, no Brasil, pela Leishmaniose Visceral. Uma vez infectado, o cão torna-se reservatório da doença, e ser fonte de infecção para outros animais ou mesmo para seres humanos que vivem ao seu redor.

5 CICLO BIOLÓGICO

Os transmissores são as fêmeas do *Lutzomyia longipalpis*, as quais as fêmeas tem mais facilidade de se infectar nos reservatórios, pois esses possuem maior riqueza das formas amastigotas na pele. Essas formas são ingeridas junto com o sangue sugado e chegam ao intestino do inseto dentro de macrófagos e leucócitos; no espaço de 15 horas as formas amastigotas rompem as células e se transformam em promastigotas, que são encontradas livres no trato digestivo médio e anterior do inseto. Passam então a se multiplicar intensamente por divisão binária, transformando-se em paramastigotas, agora aderidas por hemidesmossomos ao epitélio do esôfago e faringe do inseto; ocorre nova transformação para promastigotas procíclicas e depois para promastigotas metacíclicas, livres, que se dirigem para a parte anterior do aparelho bucal do inseto, sendo inoculadas junto com a saliva, isto é, no início e durante a hematofagia, no novo hospedeiro.

No local da picada, as formas promastigotas metacíclicas inoculadas são fagocitadas pelos macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. Nos macrófagos, as promastigotas transformam-se em amastigotas, que iniciam um processo de reprodução por divisão binária, formando um verdadeiro ninho de amastigota, que então se rompe e as amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos. Desse ponto inicial, onde pode até formar-se um pequeno nódulo ou tumoração – leishmanioma – decorrente de um processo imunoinflamatório, as amastigotas se dirigem para os órgãos linfóides viscerais (baço, fígado, linfonodos). Existem outros mecanismos de transmissão, que serão explicados posteriormente.

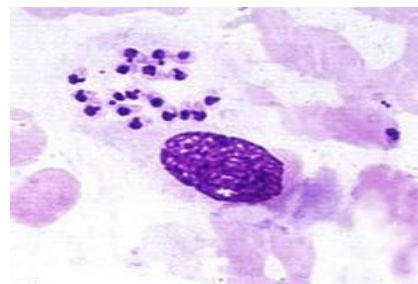
A presença de amastigotas nos hospedeiros estimula o sistema imune do paciente. Esse processo é bastante interessante e complexo, o qual irá determinar o desenvolvimento da patogenicidade ou irá abortar a infecção natural.

Figura 2: Forma promastigota



Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br

Figura 3: Forma amastigota



Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br

6 FORMAS DE TRANSMISSÃO

A LV é uma doença complexa, cujas circunstâncias de transmissão são continuamente modificadas, pois sofrem interferência do meio ambiente e das regiões geográficas, notadamente com nuances bioclimáticas, variedade de espécies animais e vetores susceptíveis, bem como fatores do comportamento humano que alteram a estabilidade e harmonia dos ecossistemas (CLAUDIA et al., 2007).

Os protozoários são transmitidos como forma flagelada, promastigotas, através da picada de várias espécies de mosquitos da subfamília *Phebotominae*, que são encontrados mundialmente. Quando inoculados na pele dos hospedeiros mamíferos, essas formas são capturadas pelos macrófagos, nos quais se transformam em amastigotas na forma aflagelada. Nos macrófagos, a forma amastigota se divide e se dissemina para órgãos diferentes, principalmente linfonodos, baço e medula óssea (RIBEIRO, 1997; FRASER, 2008).

Entretanto, em algumas áreas endêmicas no Brasil, a densidade do *L. longipalpis* não parece estar relacionada com o perfil de transmissão de LV humana ou a prevalência de LV canina, o que sugere que outros vetores e/ou mecanismos possam estar envolvidos no ciclo da *Leishmania* sp.

Para investigar o possível papel de outros vetores na transmissão de tripanosomatídeos, estudos têm sido realizados com ectoparasitos removidos de cães com LVC. Coutinho et al. (2005) recentemente, descreveu a transmissão de *L. chagasi* por carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil. Após a inoculação de macerados de carrapatos infectados em hamsters, foram verificados que 85,7% dos animais contraíram a doença por via peritoneal e 14,3% por via oral. Já segundo Coutinho e Linardi (2007), ao investigar o papel das pulgas *Ctenocephalides felis felis* na transmissão da LVC, verificaram que 1,9% das pulgas retiradas de cães com LVC apresentaram formas promastigotas em esfregaços corados pelo Giemsa, enquanto que 29,9% exibiram reação positiva pela técnica da PCR. Ainda no mesmo estudo, 16 hamsters dos 36 inoculados com macerados de pulga infectadas contraíram a infecção por *Leishmania* sp. Destes 16 hamsters, 68,7% tinham sido infectados por via peritoneal e 31,2% por via oral. Assim como nos carrapatos *R. sanguineus*, vários fatores sugerem que as pulgas podem representar agentes eficientes para a transferência natural de agentes infecciosos. Entre eles o modo de obtenção de sangue, a duração do repasto e digestão de sangue, contato com o hospedeiro e frequência de troca de hospedeiro.

Estes dados suportam a noção de que *Leishmania* sp. pode ser transmitida de cães naturalmente infectados para outros sádios por mecanismos alternativos, mesmo na ausência

de insetos. Isto é especialmente importante em áreas endêmicas onde o tratamento e vacinação de cães contra VL são frequentes, uma vez que, todas essas condições relatadas podem favorecer a propagação da doença. Além disso, as rotas alternativas de transmissão podem ter um impacto significativo em áreas com uma prevalência muito baixa da doença ou em condições onde um estado de erradicação poderia ser alcançado.

6.1 Transmissão vertical ou transplacentária

O primeiro relato de caso de LV em um recém-nascido onde a mãe estava infectada foi descrito em 1926. Desde então, alguns outros casos em seres humanos tem sido relatados em vários países, incluindo Alemanha, Sudão e Índia. Silva *et al.* (2009) fizeram o primeiro relato no Brasil de transmissão vertical por *L. infantum* em uma cadela naturalmente infectada para sua prole. O agente foi encontrado no baço e fígado de dois filhotes, tanto pela técnica de PCR quanto pela imuno-histoquímica, e na placenta materna pela PCR. Estes achados estão de acordo com os achados por Rosypal *et al.* (2005), que reproduziu a infecção experimental por *L. infantum* em uma cadela Beagle e diagnosticou a presença do parasita em amostras de tecido dos três filhotes por PCR, imediatamente após o nascimento.

A circulação de parasitas no sangue da cadela, na irrigação da placenta e em anexos fetais pode permitir a passagem da leishmania através da placenta e possibilitar um contato direto com a circulação fetal, levando à infecção dos órgãos e tecidos. Além disso, segundo Santos *et al.* (2009), a frequência de transmissão vertical da LVC não difere entre cadelas gestantes sintomáticas e assintomáticas, indicando que o estado clínico da cadela não é preditivo para o seu potencial de transmissão vertical. Estes resultados podem ser úteis para orientar os médicos veterinários nas áreas com altas taxas de prevalência e incidência da doença, considerar a existência de risco de abortos e morte fetal durante a gestação de cadelas infectadas com o parasita. De qualquer forma, filhotes nascidos de fêmeas infectadas devem ser considerados como potenciais reservatórios e fontes de infecção de LV. Além disso, o uso de fêmeas infectadas na reprodução devem definitivamente ser evitados.

6.2 Transmissão venérea

Formas amastigotas de *Leishmania* sp. podem ter uma ampla distribuição tecidual em cães com LV, resultando em manifestações clínicas típicas e atípicas. Sabe-se que cães naturalmente infectados desenvolvem frequentemente, lesões genitais associadas à presença de amastigotas principalmente no epidídimo, prepúcio e glândula. Além disso, essas lesões genitais estão associadas com a eliminação de *Leishmania* no sêmen em uma grande

proporção de cães infectados 36,36% (Diniz *et al.*, 2005) e 84,6% (Silva *et al.*, 2009). Por outro lado, nenhuma lesão específica foi observada no trato genital de cadelas naturalmente infectadas, apesar dos recentes relatos da transmissão vertical.

Em 1960, Symmers descreveu a ocorrência de transmissão de *L. donovani* entre um homem infectado e sua esposa, em região livre da doença e do vetor. Recentemente, o primeiro relato de transmissão venérea da LVC foi realizada por Silva *et al.*, (2009). Neste estudo, 54,5% (6/11) das fêmeas foram positivas para *Leishmania* sp pela técnica da PCR após serem acasaladas com machos portadores e 2/11 apresentaram soroconversão pelas técnicas de ELISA e RIFI. Juntos esses resultados, apoiam a ideia de que a transmissão venérea em cães deve ser unidirecional, partindo de machos infectados para fêmeas susceptíveis e que o comportamento traumático dos cães durante a cópula favoreceria a genitália externa como uma possível fonte de infecção.

6.3 Transmissão por transfusão sanguínea

A transfusão de sangue é uma importante prática na medicina veterinária, que geralmente envolve o uso de sangue total. Os doadores de sangue devem ser vacinados contra as infecções que afetam cães e submetidos periodicamente a exames clínicos e sorológicos para detectar doenças transmitidas pelo sangue. No entanto, estas regras não são seguidas na maioria dos casos emergenciais, de modo que cães sem sintomas das principais doenças infecciosas são considerados adequados para doações. Até recentemente, a presença formas amastigotas livres ou intracelulares no sangue e sua transfusão não eram reconhecidas como um potencial perigo para transmissão da LVC. Entretanto, a ocorrência de transmissão do protozoário *Leishmania* sp. por transfusão de sangue tem sido relatada em cães. Freitas *et al.*, (2006) comprovaram que o parasito *Leishmania* sp. pode ser experimentalmente transmitida pelo sangue total ou frações de células mononucleares de cães infectados para animais receptores, independente da condição clínica do doador. Além disso, Grogl *et al.* (1993) demonstram que *L. donovani* é capaz de sobreviver por pelo menos 25 dias de armazenamento no banco de sangue. Desta forma, o risco da transmissão de *Leishmania* sp. é importante quando portadores aparentemente saudáveis do parasita são usados como doadores, principalmente para a obtenção sangue total e concentrado de hemácias, em que células mononucleares estão presentes.

7 PATOGENIA

A relação entre o protozoário e o cão é muito complexa, uma vez que depende de muitos fatores, tanto relacionados com o parasita como com o hospedeiro. Esta relação leva a que se registrem um conjunto de situações muito distintas, que vão desde a ausência da doença, ao aparecimento de processos muito graves, com quadros clínicos variados. Infecções naturais em cães podem permanecer assintomáticas por longos períodos de tempo, antes que os sinais clínicos apareçam e foi já demonstrado que, cães soropositivos assintomáticos podem desenvolver auto-cura.

Dentre os fatores dependentes do parasita, o mais importante é a espécie e dentro desta o perfil enzimático, considerando-se que diferentes perfis enzimáticos apresentam diferentes graus de virulência e antigenicidade, provocando diferentes respostas no hospedeiro. No hospedeiro, podemos considerar como fatores primários: a constituição genética e a resposta imunitária, que condicionam a resistência ou a fragilidade à infecção. A capacidade imunitária do hospedeiro é decisiva para que ocorra infecção, assim como o seu desenvolvimento e a natureza do processo patológico. Estudos realizados demonstram a influência da genética: o gene NRAMP1 (Slc11a1) ao ser mapeado e sequenciado, possibilitou comprovar que cães susceptíveis à LVC têm mutações neste gene, que controla o transporte de íons envolvido no controle da multiplicação dos parasitas dentro do fagossoma; a raça Ibizian Hound (raça autóctone espanhola) apresenta predominantemente uma resposta imune celular contra a infecção de *Leishmania*, conferindo a estes animais proteção/resistência contra a doença. Os fatores secundários não são menos importantes: o estado sanitário e nutricional, que em grande parte são difíceis de separar da capacidade imunitária, uma vez que condicionam a fisiologia e a capacidade de resposta geral do organismo. Para que haja doença, primeiro é necessário que a infecção ocorra, o que implica que o parasita penetre na célula fagocítica e uma vez no seu interior, resista à sua ação microbicida. A entrada das *Leishmanias* nos macrófagos ocorre através de um processo de fagocitose regido pela interação da fração C3 do complemento, moléculas da superfície do parasita, tais como a maior glicoproteína de superfície – gp63 – e o lipofosfoglicano – LPG – e diversos receptores de membrana do macrófago.

Após internalização, as formas promastigotas, vulneráveis à acidez e ação das enzimas líticas do vacúolo fagocítico, diferenciam-se em formas amastigotas. Estas multiplicam-se por divisão binária até ao rompimento do macrófago infectado. Desta forma libertam-se as formas amastigotas que vão infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário. A forma

amastigota tem a capacidade, através de mecanismos intrínsecos, de resistir à ação das enzimas hidrolíticas lisossomais e aos radicais livres de oxigênio (RLO). A gp63 e a LPG degradam a maioria das enzimas hidrolíticas lisossomais e inibem a produção de radicais livres de oxigênio; além disso, a *Leishmania* possui certas enzimas (catalase e superóxido dismutase) que contrariam a ação dos radicais livres de oxigênio. As formas amastigotas evitam os mecanismos microbicidas, dependentes do oxigênio e os do óxido nítrico (NO), que ocorrem com a ativação dos macrófagos. Certas citocinas, que induzem a ativação dos macrófagos, promovem o metabolismo oxidativo e a síntese de NO.

A *Leishmania sp.* escapa a estes mecanismos porque, ao induzir uma resposta imunitária do tipo Th2, bloqueia a ativação do macrófago. É na pele, no ponto em que o flebótomo inoculou os promastigotas, que se inicia a parasitação dos macrófagos, onde ocorre uma reação inflamatória localizada com ativação do complemento por via alternativa, atraindo para a zona mais macrófagos, histiócitos, monócitos e neutrófilos, que iniciam o processo de fagocitose das formas parasitárias presentes. A partir do ponto de inoculação, as *Leishmanias sp.* vão disseminar-se dentro dos macrófagos, através da corrente sanguínea ou através da linfa.

Uma das características da Leishmaniose canina é a distribuição generalizada do parasita por todo organismo, sendo as localizações mais importantes: o baço, os gânglios linfáticos, a medula óssea, o fígado, os rins e a pele. Existem dois elementos fundamentais que justificam a patogenicidade da *Leishmania*:

- ✓ O primeiro elemento resulta do fato do parasita se encontrar e multiplicar nas células do sistema fagocítico mononuclear. Esta situação vai originar uma alteração funcional, com diminuição da capacidade fagocítica e da sua atividade como célula apresentadora de antígeno, bem como vai originar a destruição da célula parasitada;
- ✓ O segundo elemento traduz-se na grande variedade de alterações que se produzem durante a infecção, uma reação parcialmente imunomediada, resultado de uma resposta imunitária ineficaz, em que os mecanismos celulares e humorais constituem elementos imunopatológicos.

A infecção dissemina-se para estes órgãos dentro das primeiras horas. As principais células responsáveis pela resposta imune à infecção são as células *natural Killer* que, depois da ativação pelos antígenos do parasito e pela interleucina 12, produzem rapidamente o interferon, um potente indutor de formação de óxido nítrico nos macrófagos (FERRER, 2002). A produção de superóxido e a produção de óxido nítrico são dois principais mecanismos efetores para a eliminação do gênero *Leishmania* (FERRER, 2002).

Os mecanismos imunitários celulares vão originar um processo reativo tecidual, mais ou menos generalizado, generalizado, caracterizado por uma reação inflamatória de tipo proliferativo, produzindo processos degenerativos e necróticos à medida que se espalha pelos diferentes órgãos. Na resposta humoral, o mecanismo mais importante é a formação e o depósito de complexos imunes circulante (CIC), que se formam através da união de um antígeno *Leishmania*, de uma IgG ou IgM específica e de frações do complemento (especialmente C3). Os CIC alteram a capacidade fagocítica dos monócitos e neutrófilos circulantes, interferem nos mecanismos de agregação plaquetária e estimulam a liberação de aminas vasoativas. Além disso, o depósito dos CIC sobre o endotélio vascular dá origem a uma reação de hipersensibilidade medida por imunocomplexos (Tipo III), na qual ocorre uma ativação do sistema de complemento e uma ativação das células inflamatórias que, vão provocar alterações da permeabilidade vascular e fenômenos de necrose tecidual. É o rim, o órgão mais comumente afetado pela deposição dos CIC na membrana basal glomerular, originando uma glomerulonefrite, que conduz muitas vezes à morte do animal.

Por outro lado, enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a 50% ou mais, a prevalência da doença clínica ocorre entre 3% e 10%, demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve sintomas, o que dificulta o diagnóstico. O período de incubação é bastante variável, de três meses a vários anos e os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida (GOMES, 2006).

8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso. A leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final.

Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada. Posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e eventualmente tornam-se distribuídos através da derme. Classicamente a LVC apresenta lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações e pelo opaco. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo.

A doença apresenta semelhança com outras enfermidades infecto-contagiosas que acometem os cães, permitindo que o diagnóstico clínico seja possível quando o animal apresenta sinais clínicos comuns à doença, como descrito anteriormente, ou quando o animal se originar de regiões ou áreas de transmissão estabelecida. No entanto, em áreas cujo padrão socioeconômico é baixo, outros fatores podem estar associados dificultando o diagnóstico clínico, especialmente as dermatoses e a desnutrição, mascarando ou modificando o quadro clínico da leishmaniose visceral canina.

Anorexia é normalmente restrita a animais com falência renal crônica. A fraqueza e a diminuição da atividade física podem ocorrer como consequência da anemia, atrofia muscular, falência renal crônica e/ou distúrbios locomotivos. A febre intermitente é na maioria das vezes causada por doenças concomitantes como erliquiose, babesiose, lúpus sistêmico eritrematoso e infecções bacterianas (GOLÇALVES *et al.*, 2003).

As lesões de pele são de natureza crônica, sem prurido e simétricas (LINS *et al.*, 2003). A alopecia tem sido explicada pela ação direta do parasito sobre o folículo piloso ou por distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente de lesões hepáticas, ou ainda, por deposição de imunocomplexos na pele produzindo um processo imune que desencadeia a alopecia. A alopecia também é consequência da atrofia da matriz pilosa, plugue de queratina

(AZEVEDO *et al.*, 2003). A alopecia causada pela infecção expõe grandes áreas da pele extensamente parasitada.

Ainda que vários sinais clínicos da leishmaniose visceral canina se manifestam na pele, não se deve confundi-la com leishmaniose tegumentar. O alongamento anormal das unhas tem sido explicado pelo estímulo da matriz ungueal pelo próprio parasito, mas é provável que a apatia do animal doente, que resulta na diminuição dos movimentos, seja a principal responsável pelo não desgaste das unhas (LINS *et al.*, 2003). A diarreia e enterite hemorrágica podem ser causadas por uma colite ulcerativa crônica, e a enterite pode ser resultado de uma destruição direta do parasito, porém a maioria dos sinais gastrointestinais se deve a falência renal ou a doença do fígado (AZEVEDO *et al.*, 2003).

A epistaxe aparentemente é causada por uma combinação de lesões inflamatórias e ulcerativas na mucosa nasal e/ou diátese hemorrágica devido à hipergamaglobulinemia e trombocitopenia (LINS *et al.*, 2003).

A linfadenopatia local ou generalizada ocorre por proliferação de regiões de células B e diminuição de células T. Citologicamente, os linfonodos apresentam-se fortemente reativos, com presença de células plasmáticas, eosinófilos e macrófagos, alguns podem conter o parasita (GONÇALVES *et al.*, 2003).

O parasito se multiplica nos macrófagos do fígado, causando hepatite crônica ativa que pode levar a falência do fígado (AZEVEDO *et al.*, 2003). O principal fator determinante da ascite em cães com leishmaniose visceral é a hipoalbuminemia, que por sua vez é causada por proteinúria, hepatopatia e desnutrição. Outra justificativa para a ascite é o fato de formas amastigotas do parasito causarem inflamação do peritônio, pela presença de células inflamatórias no líquido ascítico (GONÇALVES, 1999).

Comumente se observa insuficiência renal moderada a severa nos cães afetados, e a causa principal é a deposição de imunocomplexos. Associada a proteinúria, pode levar a falência renal crônica, uremia e síndrome nefrótica.

A anemia decorre devido à perda de sangue, à lise de hemácias ou por uma diminuição da eritropoiese devido a uma hipoplasia ou aplasia medular. A deposição de imunocomplexos nos rins eventualmente resulta em glomerulonefrite proliferativa e, em muitos casos, em nefrite intersticial, podendo levar a insuficiência renal, que é, muitas vezes, a principal causa da morte em cães com leishmaniose. As alterações hepáticas e renais levam à formação de edema de membros (LINS *et al.*, 2003).

A imunodepressão pode promover a ocorrência de infecções oportunistas concomitantes, tais como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, malassezíases, dermatofitoses e demodicoses (GONÇALVES *et al.*, 2003).

Anemia normocrômica normalmente não regenerativa, causada por doença inflamatória crônica e supressão da medula óssea. Em alguns casos, perda de sangue aguda ou crônica ou fenômenos imunomediados são responsáveis pela anemia (GONÇALVES *et al.*, 2003). Trombocitopenia pode ser induzida por imunocomplexos circulantes, ativando anticorpos, pool esplênico ou supressão da medula óssea (LINS *et al.*, 2003).

Hipoalbuminemia por perda de proteínas devido a nefropatia, hepatopatia e desnutrição (AZEVEDO *et al.*, 2003). Leucocitose e leucopenia são achados raros em pacientes com leishmaniose. Hipergamaglobulinemia por ativação policlonal de células B e produção de anticorpos. Há inversão da taxa de fração de albumina e globulinas. Proteinúria moderada a severa é a única anormalidade detectada pela urinálise.

Figura 4: Manifestações clínicas da LVC a) Cão com blefarite; b) Cão com alopecia; c) Cão com hiperqueratose no nariz; d) Onicogribose ; e) Emaciação ; f) Lesão ulcerativa na orelha; g) Alopecia na zona ocular.



Fonte: DUARTE (2009)

9 DIAGNÓSTICO

De uma maneira geral o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. A problemática deve-se principalmente a três fatores:

1 – variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas;

2 – alterações histopatológicas inespecíficas

3 – inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível.

O diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado no exame parasitológico ou sorológico. Para determinar o exame laboratorial a ser utilizado, é importante que se conheça a área provável de transmissão, o método utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica.

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico de punções: hepática, linfonodos, esplênica, de medula óssea e biópsia ou escarificação de pele. É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas. Entretanto, alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, significando a ocorrência de riscos para o animal e também impraticáveis em programas de saúde pública, em que um grande número de animais devam ser avaliados em curto espaço de tempo. A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende do grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos.

O teste diagnóstico mais confiável é a observação direta do parasita em esfregaço de medula óssea ou linfonodos, porém às vezes é impossível de detectar o parasita. Métodos sorológicos também são úteis. Segundo Moura et al, (1999) utilizam-se testes de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA).

Os achados histopatológicos são, por vezes, inespecíficos e caracterizam-se por uma reação inflamatória granulomatosa com presença de células mononucleares, reações estas comuns a várias outras dermatoses. Quando há poucas formas amastigotas de *Leishmania spp.* nos tecidos, pode ser difícil estabelecer-se o diagnóstico somente pela histopatologia (MOREIRA et al., 2007).

Os achados laboratoriais caracterizam-se principalmente por alterações hematológicas como a anemia, geralmente normocítica normocrômica, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, leucopenia associada à linfopenia ou leucocitose (MOURA et al., 1999). Os principais métodos sorológicos utilizados têm sido as técnicas de ELISA e RIFI, além da visualização das formas amastigotas extracelulares e intracelulares em esfregaços confeccionados a partir de lesões.

Até o momento, não há um método diagnóstico com 100% de sensibilidade e especificidade (FERRER, 1999; GRANDONI, 2002). Recomenda-se a associação de vários métodos, sendo pelo menos um método parasitológico. Assim é possível evitar falso positivos e ao mesmo tempo garantir a identificação dos animais infectados (MOREIRA et al., 2007).

Em virtude da necessidade de notificação compulsória da doença, o diagnóstico da LV deve ser feito da forma mais precisa possível. Sendo assim é necessário conhecer o método utilizado, as suas limitações e interpretação clínica (FERRER, 1999).

A confirmação do diagnóstico da LVC pode se basear em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (FERRER, 1999).

9.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença (FERRER, 1999; GRANDONI, 2002). Os achados clínicos são comuns a outras enfermidades, tornando o diagnóstico laboratorial ou parasitológico necessários para a confirmação da suspeita (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; FEITOSA, 2006).

Por outro lado, segundo Gomes (2006) enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode chegar a 50% ou mais, a prevalência da doença clínica ocorre entre 3% e 10%, demonstrando que a maioria dos cães infectados não desenvolve os sintomas, o que dificulta consideravelmente o diagnóstico. Os animais podem permanecer assintomáticos por toda a vida ou desenvolver sintomas após períodos que variam de três meses a alguns anos.

As alterações laboratoriais encontradas no hemograma, ou nos exames de função renal ou hepática, são inespecíficas. As alterações histopatológicas também são inespecíficas e as lesões são semelhantes às aquelas observadas em outras doenças infecciosas e imunomediadas. Até o momento, não está disponível teste diagnóstico que apresente 100% de especificidade e sensibilidade para a doença. Em virtude da necessidade de notificação compulsória da doença, o diagnóstico da leishmaniose visceral deve ser feito da forma mais precisa possível. Para tanto, é importante que se conheça o método utilizado, as suas limitações e a interpretação clínica.

9.2 Diagnostico parasitológico

Apesar da discordância entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado ainda, o teste ouro para diagnóstico da doença. Podem ser observadas formas amastigotas do parasito em esfregaço de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsia hepática e esfregaços sanguíneos corados com corantes de rotina, como Giemsa, Wright e Panótico. Alguns pesquisadores tem sugerido o aspirado esplênico ao invés do aspirado do linfonodo como de escolha para o diagnostico parasitológico. A citologia aspirativa é um método de fácil execução, amplamente utilizado no diagnostico, especialmente em clinicas veterinárias. A técnica caracteriza-se pela rapidez de execução e baixa agressão tecidual. A especificidade desse método é virtualmente elevada mas, dependendo do tempo despedido procurando o parasito, a sensibilidade passa a ser no máximo de 80% em cães sintomáticos e ainda menos nos cães assintomáticos.

A sensibilidade depende do grau de parasitemia, do tipo do material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina. Em alguns pacientes, a visualização do parasito é muito laboriosa e os resultados negativos não são incomuns, especialmente em casos crônicos. Ocasionalmente, também se observam parasitos em impressões citológicas obtidas abaixo de crostas de escamas cutâneas, ou através de aspirados de nódulos cutâneos. Também é possível realizar biopsias de pele coletadas de áreas macroscopicamente normais. O local mais recomendado é a parte superior do focinho, a área preferencial dos vetores. As formas amastigotas são reconhecidas pela sua forma esférica a ovoide, medem 2-5 μm e contem núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado. O encontro de parasitos no material examinado depende do numero de campos observados, e sua identificação não é difícil se os parasitos são numerosos. Contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, nos quais poucas formas amastigotas estão presentes, ou em amostras hemodiluidas, podem ocorrer resultados falsos negativos. Esse problema pode ser solucionado com a utilização de técnicas mais sensíveis, como a imuno-histoquímica.

Testes de imuno-histoquímica ou imunocitoquímica são métodos altamente sensíveis e específicos para a detecção do antígeno de *Leishmania* em tecidos. Nessas técnicas, imunoglobulinas conjugadas a enzimas são utilizadas para identificar antígenos em cortes histológicos parafinados ou congelados, exames citológicos e esfregaços sanguíneos. As vantagens das técnicas de imuno-histoquímica são a sensibilidade, a especificidade e a simplicidade de execução. O alto grau de contraste obtido entre os parasitos e as células hospedeiras permite rápido diagnóstico da infecção, mesmo quando o número de parasitos é baixo. Para tanto são utilizados vários tecidos, sendo os mais utilizados a pele, o fígado e os

órgãos linfoides. A imuno-histoquímica possui uma grande vantagem em relação as técnicas de imunofluorescência, porque os tecidos podem ser examinados por meio de microscopia de luz convencional.

9.3 Diagnostico sorológico

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes utilizando técnicas sorodiagnostics constitui instrumento importante no diagnostico de LVC (CIARAMELLA, 2003). Animais doentes desenvolvem 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). Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não 100% sensíveis. Os testes podem falhar em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, em animais que nunca farão soroconversão e ainda em cães soropositivos que se convertem em soronegativos, mas ainda permanecem infectados. Animais com menos de três meses de idade não devem ser avaliados por métodos sorológicos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos. Uma possível associação entre os títulos de anti-*Leishmania* e a severidade dos sintomas da doença ainda é controversa (FERRER, 1995).

A colheita de material biológico para o diagnostico pode ser realizada utilizando soro sanguíneo, ou por meio de obtenção de um eluato (sangue eluído), método no qual amostras de sangue são colhidas por punção da veia marginal auricular do cão com o auxílio de microlancetas descartáveis, e transferidas por capilaridade para papel filtro padronizado. O sangue obtido no papel filtro é posteriormente ressuspensionado em solução salina tamponada com fosfato. Os resultados obtidos com o eluato devem ser analisados com cautela, pois quando comparados com técnicas realizadas no soro apresentam sensibilidade inferior (BRAGA, 1998).

Muitos testes sorológicos estão disponíveis, tais como fixação de complemento, hemaglutinação indireta, aglutinação em látex, aglutinação direta, imunofluorescência indireta, ELISA (com diferentes modificações tais como Dot-ELISA, FML-ELISA, Fast-ELISA, BSM-ELISA, slide-ELISA), imonoprecipitação em gel e Western blot. As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são a imunofluorescência indireta (RIFI) e o ELISA. A RIFI ainda é o teste de eleição para ser utilizado em inquéritos epidemiológicos por reunir uma série de vantagens, como fácil execução, rapidez, baixo custo e sensibilidade e especificidade adequadas quando comparadas

a outras técnicas. A RIFI tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, podendo apresentar reações cruzadas principalmente com a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a doença de Chagas. O resultado considerado sororreagente é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40.

A RIFI apresenta sensibilidade que varia entre 68 e 100% e especificidade variando entre 74 e 100%. A especificidade é prejudicada devido à ocorrência de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos e outros micro-organismos. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados como indicadores de infecção leishmaniotica específica.

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo.

O teste de ELISA apresenta sensibilidade que varia entre 71 e 100%, e uma especificidade entre 85 e 100% (MELO, 2004). A sensibilidade e especificidade desse método dependem do tipo sanguíneo empregado (espécie ou forma evolutiva do parasito) e de mudanças no protocolo experimental padrão (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas). As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família Trypanosomatidae, mas também com outros organismos filogeneticamente distantes. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados, como as glicoproteínas da membrana gp63, gp72 e gp70 específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA. Entretanto, ainda podem ocorrer reações cruzadas com outros tripanossomatídeos. Alguns antígenos recombinantes, como rK39, Rk9 e rK26, parecem conferir grande sensibilidade quando da realização do teste sorológico. Atualmente, para inquéritos em saúde pública os exames disponíveis para diagnóstico sorológico são a RIFI e o ELISA, que expressam os níveis de anticorpos circulantes. O material recomendado é o soro sanguíneo.

Essas duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, o ELISA por estar

em fase de implantação, inicialmente está sendo recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina.

Os exames sorológicos deverão ser realizados nos laboratórios centrais estaduais (LACENs) ou nos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais. É importante que seja realizado periodicamente o controle de qualidade dos exames realizados. As amostras de soro, a serem analisadas na referência nacional, devem ser impreterivelmente encaminhadas pelo LACEN.

É importante ressaltar que em situações em que o proprietário do animal exigir uma contra-prova, esta deverá ser uma prova sorológica, realizada por um laboratório da Rede, preferencialmente. A contra-prova sorológica poderá ser ainda realizada pela referências, estadual e/ou nacional, e o tempo estimado para liberação do resultado dependerá do tempo de deslocamento da amostra até as referências, sendo a média esperada de 15 dias. Os resultados liberados por este laboratório serão considerados oficiais para fins de diagnóstico da infecção e da doença.

Os laboratórios particulares, ou pertencentes a universidades e clínicas veterinárias, que realizem o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, deverão participar do programa de controle de qualidade preconizado pelo Ministério da Saúde, enviando os soros para as referências, estadual e/ou nacional.

Existem ainda testes comerciais de imunocromatografia, utilizados em humanos e animais, que consiste em métodos que empregam anticorpos monoclonais anti-IgG de cão e antígenos de *Leishmania* de diferentes fontes. Esses métodos são atrativos devido à simplicidade de uso e à rápida resposta, de cerca de dez minutos. A avaliação de eficácia de kits para detecção de LVC demonstrou especificidade entre 61 e 100% e sensibilidade variando entre 35 a 100%.

A avaliação das subclasses de IgG tem sido sugerida como indicador confiável da doença comparativamente às dosagens de IgG total. Existem contradições na literatura quanto à associação entre IgG1 ou IgG2 e o desenvolvimento ou não dos sintomas. Determinados estudos associam a elevação de IgG2 a infecções assintomáticas e a IgG1 a sintomas clínicos. Contrariamente, investigações similares não tem sido capazes de demonstrar essa relação entre as subclasses de IgG e a presença ou não de manifestações clínicas nos animais. Estudos recentes sugerem a avaliação de quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) uma vez que, em contraste com estudos anteriores, os resultados sugerem que IgG2 deva ser regulada de forma diferente e, que as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 sejam os melhores

marcadores para a resistência ou a suscetibilidade de cães à leishmaniose visceral. Embora a avaliação das subclasses de imunoglobulinas ainda não se constitua no método de escolha para o diagnóstico da doença, pode ser de extrema importância para diferenciar animais vacinados de animais naturalmente infectados.

9.4 Diagnóstico molecular

Dentre os métodos moleculares, a PCR permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, biopsias cutâneas, aspiração de linfonodos, sangue, cortes histológicos de tecidos parafinados e também no vetor. Nas amostras de sangue a sensibilidade é baixa, provavelmente devido ao número de parasitos no sangue periférico. Amostras obtidas de medula óssea tem apresentado menor sensibilidade do que as de pele para detecção de DNA do parasito.

Um resultado positivo obtido a partir de medula óssea evidencia a disseminação do parasito para órgãos internos após a inoculação da pele. A principal desvantagem das técnicas moleculares é que estas requerem laboratórios bem equipados e habilidade técnica. Durante infecções naturais, recomenda-se que múltiplos métodos diagnósticos sejam utilizados, tendo em vista que o uso isolado de determinada técnica pode não identificar todos os animais infectados.

9.5 Diagnóstico imunológico

A intradermo-reação, teste de *Leishmania* ou teste intradérmico de Montenegro é um teste cutâneo que avalia a resposta imune celular, mediante reação de hipersensibilidade do tipo tardia, e tem se mostrado método auxiliar no diagnóstico de leishmaniose tegumentar nas suas formas clínicas cutânea e cutânea-mucosa. A leishmania utilizada como antígeno consiste em promastigotas cultivadas *in vitro*, lavadas e diluídas em solução salina, para a obtenção de suspensão de organismos mortos e preservados.

Amostras de solução salina devem ser usadas como reagente controle. A suspensão é homogeneizada e aplicada via intradérmica e a leitura é realizada após 48 a 72 horas. Em seguida, o local é palpado para aferir o tamanho da reação granulomatosa. Ao contrário do que ocorre na leishmaniose tegumentar, forma visceral humana a intradermo-reação é sempre negativa durante o curso da doença. No entanto, pode ser positiva em indivíduos assintomáticos ou após a cura clínica. Para utilização em humanos, já há padronizações quanto às concentrações de promastigotas e às características das preparações de leishmania.

Já em cães, poucos estudos foram conduzidos sobre a doença, e ainda não existem padronizações do método.

9.6 Cultivo parasitológico

O diagnóstico também pode ser estabelecido visando a detecção do parasito por cultivo em meios específicos. Formas amastigotas do parasito, inoculadas em meios de cultura especiais contendo ágar e sangue de coelho, transformam-se em formas promastigotas. Porém, seu crescimento leva pelo menos de três a cinco dias. O clássico meio de NNN é o meio mais comumente empregado, seguido de outros meios como RPMI-1640 e HO-MEM. Esses meios de diagnóstico tem baixa sensibilidade, especialmente nos estágios iniciais da doença, nos quais a carga parasitária é pequena. Embora as culturas sejam úteis para o isolamento e identificação do parasito, elas são pouco utilizadas na rotina.

Inoculação experimental

A inoculação experimental em hamsters com amostras de tecidos de pacientes com suspeita de LV não tem valor prático no diagnóstico da doença devido ao seu longo tempo de positividade, que pode chegar a seis meses. Além disso, podem ocorrer resultados falsos negativos.

9.7 Xenodiagnóstico

A técnica de xenodiagnóstico é utilizada para detecção e o isolamento de patógenos utilizados em seu vetor natural. Esse método não tem sido proposto como técnica diagnóstica de rotina, uma vez que requer a formação de colônias de vetores. O xenodiagnóstico tem sido empregado para investigar aspectos epidemiológicos com relação ao estado clínico, o tratamento de cães com leishmaniose visceral e à infectividade dos vetores.

10 EPIDEMIOLOGIA

A epidemiologia da leishmaniose visceral tem sido largamente estudada, no mundo todo. Basicamente existem quatro tipos epidemiológicos de calazar:

- ✓ Calazar americano: ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, exceto o Chile, com o Brasil apresentando cerca de 90% das infecções. Nesse tipo temos a *Leishmania chagasi* como agente etiológico, atingindo crianças e adultos jovens, os reservatórios silvestres são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e, seguramente, os gambás (*Didelphis marsupialis* e *D. albiventris*), e reservatórios urbanos são os cães e humanos; em todos os ambientes o transmissor é o *Lutzomyia longipalpis*.
- ✓ Calazar mediterrâneo: presente nos países da bacia do Mediterrâneo e no Oriente Próximo, tendo a *Leishmania infantum* como agente etiológico, atingindo preferencialmente crianças de menos de cinco anos de idade, tem o cão como reservatório e o *Phlebotomus perniciosus* como principal transmissor.
- ✓ Calazar indiano: presente na Índia e parte da China, tendo a *L. donovani* como a gente causal e os humanos adultos como reservatórios, na Índia é freqüente o paciente apresentar a leishmaniose dérmica pós-calazar: o transmissor é o *Phlebotomus argentipes*. No Sudão, Etiópia e Quênia existe uma variante desse tipo indiano, na qual os pacientes também são adultos, apresentam leishmaniose pós-calazar, porém não respondem ao tratamento antimoanial.
- ✓ Calazar da Ásia Central: presente nas áreas silvestres de alguns países dessa região tem a *L. donovani* como agente etiológico e o lobo e o chacal como reservatórios silvestres; em alguns locais o cão também se apresenta infectado, os transmissores são espécies silvestres de *Phlebotomus*.

No Brasil, a leishmaniose visceral apresenta dois ciclos epidemiológicos bem distintos e, até certo ponto, independentes: um ciclo silvestre e um ciclo doméstico ou peridoméstico. No ciclo silvestre, a leishmania circula entre os reservatórios silvestres (raposas, gambás) e a *L. longipalpis*; na Amazônia, a raposa encontrada é a *Cerdocyon thous* (cujos exemplares capturados até hoje não apresentavam sintomatologia), e, no restante do país, a *Dusicyon vetulus* (freqüentemente apresentando sintomas cutâneos e gerais graves). No ciclo doméstico e peridoméstico, isto é, na zona rural, periurbana e urbana, a leishmania circula entre os cães, gambás (que é um mamífero que se adaptou ao ambiente doméstico e urbano), humanos e a *L.*

longipalpis. O papel do gambá é controverso, mas em vista da presença contínua desse animal em áreas de leishmaniose e de já ter sido encontrado parasitado, supõe-se que tenha papel relevante.

A raposa tem uma grande importância na manutenção e disseminação do parasito, pois, sendo de hábitos erráticos, anda longas distâncias à procura de alimento, inclusive “visitando” galinheiros e o peridomicílio. É sabido que galinheiros e chiqueiros são ótimos para a reprodução de flebótomos, que facilmente se contaminam nas raposas e depois contaminam cães e humanos próximos. Além disso, no seu ambiente silvestre, as raposas fazem tocam que servem de abrigos para os flebótomos, que podem picar cães e humanos em suas incursões pelos matos, infectando-os; esses ao retornarem para suas casas e adormecendo, podem infectar flebótomos aí presentes.

Nos cães e raposas o parasitismo cutâneo é muito grande, facilitando a contaminação dos flebótomos; já os humanos tem poucas formas amastigotas na pele, não sendo portanto, uma boa fonte de infecção. Recentemente, levantou-se uma polêmica a respeito da real importância dos cães como reservatórios, dizendo alguns que esses são mais vítimas do que verdadeiras fontes de infecção. Essas pessoas pensam assim porque é muito freqüente em zonas endêmicas, o índice de positividade dos cães chegar a 40% e o índice de infecção em humanos ser muito baixo. É aparentemente válida essa interpretação, mas ao se observar os hábitos de cães de zonas endêmicas, dormindo ao relento ou junto de aves (que são refratárias à leishmania, mas atraem fortemente os flebótomos), percebe-se que se tornam muito mais expostos que os humanos. Além disso, Neves (2003) observou que os flebótomos preferem mais sugar as aves, depois os cães e por último os humanos (baixa antropofilia). Ao ver dessa autor, os cães são realmente as primeiras e grandes vítimas, mas pela quantidade de amastigotas na pele, pela facilidade de infectar flebótomos em experimentos controlados e pela proximidade com os humanos, são reservatórios muito importantes.

A *L. longipalpis* apresenta uma população muito variável ao longo do ano e local. Prefere ambientes sombreados, com bastante árvores, como vales ou encostas de morros que tenham uma vegetação ou pequenas grutas ou buracos, onde haja umidade elevada; nesses ambientes ou microclimas existem abrigos onde aves ou outros animais constroem seus ninhos e os flebótomos encontram alimento fácil e proteção. Tem como criadouro acúmulo de matéria orgânica em decomposição com muita umidade, como esterco, húmus, etc. São mais numerosos durante ou após as chuvas, isto é, nos meses quentes e úmidos. No ambiente domiciliar e peridomiciliar os galinheiros e pombais são o grande foco desses insetos,

seguidos dos chiqueiros. A taxa de infecção dos flebotómos também é bastante variável, mas usualmente é baixa, indo de 0,5% a 7,4%.

Como já descrito anteriormente, pesquisas mostram que pulgas e carrapatos de cães (*Ctenocephalides* e *Rhipicephalus sanguineus*); a *L. chagasi* se desenvolve bem, com a produção de promastigotas metacíclicas; nesse caso a contaminação de cães se daria por ingestão da pulga ou carrapato. Esse fato ajuda a explicar a maior prevalência de calazar nesse animal doméstico.

11 TRATAMENTO

O tratamento da LVC no Brasil remonta ao início da década de 1990, ocasião em que a doença apresentou acentuado processo de urbanização (RIBEIRO, 2006). Devido à sua alta toxicidade, acreditava-se que esse tratamento não era viável (MARZOCHI et al., 1985).

O primeiro relato de sucesso no tratamento da LVC no Brasil foi através da utilização do antimoniato de n-metilglucmina (RIBEIRO, et al., 1997a; RIBEIRO, et al. 1997b). Os fármacos utilizados no tratamento da LVC incluem medicamentos que atuam contra as leishmanias, imunomoduladores e imunoterapias, além de medicações de suporte (NOLI; AUXILIA, 2005).

A inexistência de tratamento efetivo para a cura total da doença canina, e a polêmica sobre a eliminação indiscriminada de cães infectados, torna-se urgente à adoção de novas estratégias, centrada em vacinas eficazes (TESH, 1995). Há alguns anos a vacina contra a LVC vem sendo utilizada no Brasil (DANTASTORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Os ministérios da Saúde e da Agricultura preconizam que essas devem ser capazes de reduzir os sintomas, o parasitismo tecidual e, conseqüentemente, a transmissão ao inseto vetor. Além disso, após a imunização deve ser possível distinguir sorologicamente cães imunizados daqueles infectados. Um estudo demonstrou que essa vacina induz bom efeito protetor contra a doença, com eficácia vacinal de 80% (BORJA-CABRERA et al., 2002). Já em outro estudo demonstrou que a vacina bloqueia a transmissão, protegendo os cães do contágio e da condição de reservatórios, bloqueando a transmissão para os flebotomíneos. Mesmo com estes resultados, novas pesquisas devem ser desenvolvidas para confirmar a curácea da doença (MENDES et al., 2003).

Nas áreas endêmicas, um tratamento rápido dos cães infectados, controle dos cães errantes e sem domicílio, e a ação contra insetos vetores, constituem métodos de controle recomendados. O tratamento dos cães em áreas não endêmicas é questionável e provavelmente insensato (FRASER, 2008).

As medidas de controle da doença até agora foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias (GONTIJO; MELO 2004).

11.1 No cão

O tratamento de cães não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina, por meio de drogas tradicionalmente empregadas (antimoniato de meglumina,

anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), tem tido baixa eficácia. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano.

12 PREVENÇÃO E CONTROLE

12.1 Medidas Preventivas

12.1.1 Dirigidas à população humana

Medidas de proteção individual

Para evitar os riscos de transmissão, algumas medidas de proteção individual devem ser estimuladas, tais como: uso de mosquiteiro com malha fi na, telagem de portas e janelas, uso de repelentes, não se expor nos horários de atividade do vetor (crepúsculo e noite) em ambientes onde este habitualmente pode ser encontrado.

12.1.2 Dirigidas ao vetor

Saneamento ambiental

O controle da transmissão urbana da LV é laborioso e de resultados nem sempre satisfatórios a partir de uma única aplicação residual de inseticida. Portanto, outras medidas mais permanentes são indicadas como o manejo ambiental, através da limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, a fim de alterar as condições do meio, que propiciem o estabelecimento de criadouros de formas imaturas do vetor. Medidas simples como limpeza urbana, eliminação dos resíduos sólidos orgânicos e destino adequado dos mesmos, eliminação de fonte de umidade, não permanência de animais domésticos dentro de casa, entre outras, certamente contribuirão para evitar ou reduzir a proliferação do vetor.

12.1.3 Dirigidas à população canina

Controle da população canina errante

A rotina de captura de cães errantes é essencial, especialmente em áreas urbanas, por ser fonte disseminadora de diversas doenças de importância médico-sanitária, entre elas a LV. Esta deverá ser realizada pelo município rotineiramente de acordo com as normas estabelecidas no código sanitário.

Doação de animais: cães

Em áreas com transmissão de LV humana ou canina, é recomendado que seja realizado previamente o exame sorológico canino antes de proceder a doação de cães. Caso o

resultado seja sororreagente, deverão ser adotadas as medidas de vigilância e controle recomendadas pelo Programa.

Vacina antileishmaniose visceral canina

Existe uma vacina contra a leishmaniose visceral canina registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, porém sem constatação de seu custo-benefício e efetividade para o controle de reservatório da leishmaniose visceral canina em programas de saúde pública.

Uso de telas em canis individuais ou coletivos

Os canis de residências e, principalmente, os canis de *pet shop*, clínicas veterinárias, abrigo de animais, hospitais veterinários e os que estão sob a administração pública devem obrigatoriamente utilizar telas do tipo malha fina, com objetivo de evitar a entrada de flebotomíneos e conseqüentemente a redução do contato com os cães.

Coleiras Impregnadas com Deltametrina a 4%

Em condições experimentais, diversos trabalhos demonstraram a eficácia na utilização de coleiras impregnadas com deltametrina 4% como medida de proteção individual para os cães contra picadas de flebotomíneos. Entretanto, para a sua adoção em programas de saúde pública, a fim de interromper o ciclo de transmissão doméstico, é necessária a implementação de estudos longitudinais que demonstrem sua efetividade como medida de controle.

12.2 Medidas de Controle

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da leishmaniose visceral, as estratégias de controle desta endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde.

Vale destacar, que as ações voltadas para o diagnóstico e tratamento dos casos e atividades educativas, devem ser em todas as situações priorizadas, lembrando que as demais medidas de controle devem estar sempre integradas para que possam ser efetivas.

13 LEISHMANIOSE VISCERAL EM GATOS

Apesar dos relatos da ocorrência de leishmaniose visceral em felinos, a literatura é muito escassa no que diz respeito à pesquisa de *L. chagasi* em animais de áreas endêmicas, sendo possível que infecções em gatos sejam relativamente comuns em algumas dessas regiões.

Acredita-se que gatos infectados possuam certo grau de resistência natural à doença, provavelmente relacionada a fatores genéticos. Apesar da ocorrência de infecções esporádicas, os felinos não são considerados, até o momento, um reservatório importante da doença, havendo poucas informações quanto ao potencial desses animais servirem como reservatórios. Também são pouco conhecidas a prevalência, a transmissão e o quadro clínico da enfermidade nessa espécie.

Hoje em dia, apesar de ser considerada de rara ocorrência, nos últimos anos, houve um aumento no número de casos relatados em todo o mundo. Cerca de 30 casos foram reportados, sendo que 11 deles tiveram origem na América do Sul, dos quais 10 foram diagnosticados no Brasil.

Atualmente, o avanço nas técnicas de diagnóstico bem como a maior preocupação com a saúde dos animais de companhia, principalmente em países desenvolvidos, devem ter favorecido este aumento. Praticamente, as mesmas técnicas utilizadas para evidenciar a presença do parasito e/ou anticorpos contra eles utilizadas no diagnóstico da enfermidade em cães são aplicáveis aos felinos. No entanto, a LF é ainda pouco estudada em vários aspectos tais como prevalência, manifestações clínicas, transmissão do parasita ao vetor e espécies dos protozoários envolvidos. Além disso, há pouca informação sobre a real susceptibilidade e importância dos gatos na transmissão de *Leishmania sp.*

Todos estes fortes indícios podem levar a acreditar que a LF não seja comum, principalmente por não colocá-la dentro da suspeita clínica durante a realização de um atendimento no dia a dia da clínica de pequenos animais.

Rossi et al. (2010) realizaram um trabalho em Araçatuba/SP onde foram colhidas amostras de soro de 200 gatos, encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses, bem como realizadas biópsias aspirativas de linfonodo, medula óssea, baço e fígado, utilizados para a confecção de preparados citológicos para a pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania sp.* A prevalência da doença nessa população de gatos foi de 6,5%. Dos 200 animais avaliados, oito (4,0%) apresentaram resultado parasitológico positivo, seis (3,0%) apresentaram títulos sorológicos acima do ponto de corte pela técnica de ELISA e um (0,5%)

evidenciou título superior ao ponto de corte (1:40) pela RIFI, totalizando 13 gatos considerados positivos.

O quadro clínico na leishmaniose felina é inespecífico e se assemelha ao quadro clínico observado na espécie canina, dificultando o diagnóstico. Sintomas como depressão, anorexia, emaciação, estomatite, gengivite, êmese, diarreia, hipertermia, desidratação, hepatomegalia, linfadenomegalia local ou generalizada, lesões cutâneas, dermatite seborreica úlcero-crostosa, alopecia difusa, uveíte e atrofia da musculatura temporal já foram descritos como formas de apresentação da leishmaniose visceral em gatos, mas na grande maioria dos casos, se apresentam na forma de lesões cutâneas (93%) ulceradas e nódulos presentes na face, orelha, focinho e patas. São similares àqueles observados em outras doenças como criptococose e esporotricose, tornando-se então os diagnósticos diferenciais de grande importância. Eventualmente a doença pode assumir uma forma aguda típica e o animal evolui para o óbito em poucas semanas. As alterações hematológicas e bioquímicas encontradas em gatos doentes são similares às descritas para a espécie canina.

Da mesma forma que a soroprevalência canina, a felina pode variar sensivelmente de acordo com a metodologia utilizada (amostragem, técnica sorológica e ponto de corte adotado) e com a região geográfica estudada. Além disso, os gatos podem ser mais refratários que os cães à infecção por *Leishmania sp.*

Evidências apontam que a leishmaniose felina pode estar associada a doenças imunossupressoras, tais como a leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) viral felina. O papel desses agentes precisa ser esclarecido, uma vez que em alguns estudos a presença de infecção por *Leishmania sp.* têm sido correlacionada com soropositividade para FIV e/ou FeLV.

14 SAÚDE PÚBLICA

A LV é considerada importante pelo impacto que produz na saúde pública, notadamente pela alta incidência, letalidade e implicações econômicas, constituindo-se num sério problema sanitário e econômico-social pela depleção da força de trabalho (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Estudos de casos humanos e de cães têm revelado a ocorrência da urbanização da LV nas grandes cidades brasileiras (OLIVEIRA et al., 2001).

A expansão geográfica é notada para os estados do Sudeste e do Sul do país, e também um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas, como Nordeste e Sudeste (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Fatores relacionados ao processo migratório, à ocupação desordenada das periferias das grandes cidades, à presença significativa do reservatório e do vetor e as altas densidades populacionais com baixa ou nenhuma imunidade à infecção contribuem para a rápida e extensa distribuição das leishmanioses (CLAUDIA et al., 2007).

A vigilância epidemiológica tem como objetivos reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, bem como diminuir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e do agente transmissor (BRASIL, 2006).

15 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO RIO GRANDE DO SUL

O Rio Grande do Sul era considerado área indene para LV até novembro de 2008, quando foi notificado um caso suspeito de LVC em um cão proveniente do município de São Borja. Com a autoctonia comprovada deste caso, houve desencadeamento de investigação epidemiológica em outros municípios, registrando a presença de *L. longipalpis*, casos caninos com sorologia reagente e caracterização de *L. chagasi* em amostras biológicas caninas em alguns desses casos. Os municípios foram divididos em categorias, de acordo com a situação epidemiológica da LV.

Os municípios pertencentes à área de transmissão são aqueles onde foi encontrado o vetor, casos positivos humanos ou caninos autóctones com caracterização do parasito: São Borja e Uruguaiana. O inquérito sorológico canino de São Borja teve início em fevereiro de 2009. Até dezembro de 2010, foram coletadas amostras de cerca de 5.400 cães, com prevalência de amostras sororreagentes para LVC de 22,5%. Já Uruguaiana, no mesmo período, apresentou prevalência de 14% (TARTAROTTI et al., 2011).

O município de Santa Maria teve caracterização *L. chagasi* de uma amostra canina, mas, em investigação sorológica de 100 cães no entorno do caso, não houve cães sororreagentes. Em Porto Alegre, a prevalência, até dezembro de 2010, foi de 4,1% em 72 amostras, sendo que o primeiro caso de LVC foi investigado em agosto de 2010. O município teve caracterização de *L. chagasi* em uma única amostra canina. Após inúmeras capturas, não foi encontrado o principal vetor de *L. longipalpis*.

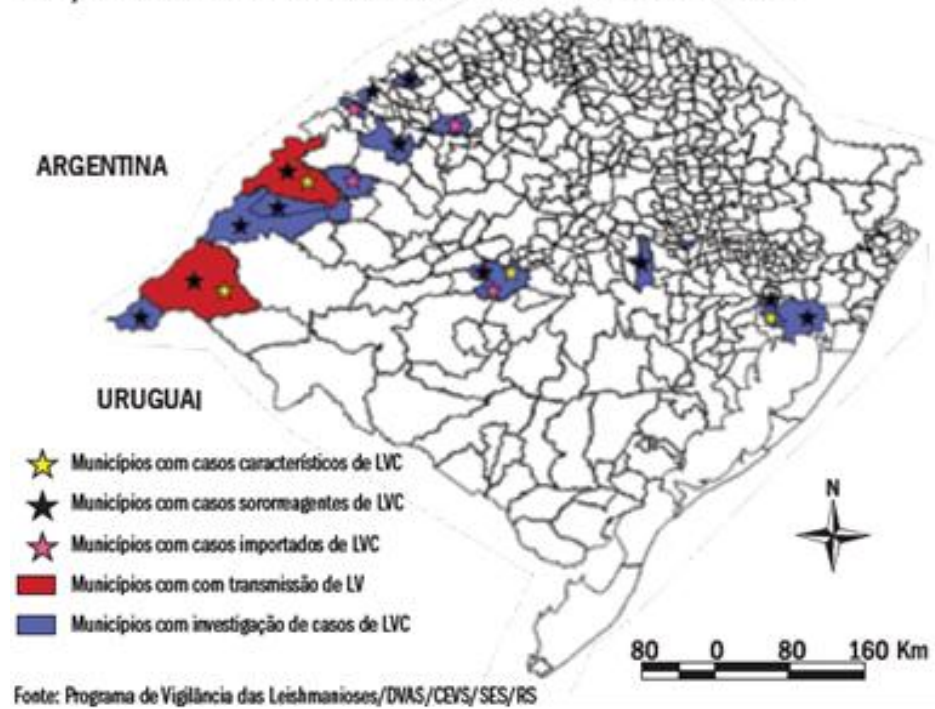
Os municípios com casos suspeitos caninos são aqueles onde houve casos sororreagentes, mas ainda não foi isolado o parasito responsável pela doença. Estão em investigação: Santa Cruz do Sul, Viamão, Cachoeira do Sul, São Luiz Gonzaga e Santo Ângelo.

Já os municípios da área de risco são aqueles onde foram encontrados o vetor ou casos caninos sororreagentes (sem a caracterização do parasito), ou sem casos humanos: Barra do Quaraí, Itaqui, Garrunchos, Pirapó e Porto Xavier.

O total de amostras sorológicas caninas analisadas pelo IPB-LACEN/RS, no período de 2009 a 2010 foi de 5.430, com 20,8% de sororreagentes, distribuídos em 34 municípios. A Seção de Parasitologia do IPB-LACEN/RS em 2010 e 2011 obteve 100% de concordância no controle de qualidade no laboratório de referência nacional para LVC (FUNED – Fundação Ezequiel Dias do Estado de Minas Gerais).

Figura 5: Classificação dos municípios do RS em relação à LVC

Situação da Leishmaniose Visceral Canina no RS. Período de 2008 a 2010



ANEXO

Como coletar e enviar material

A coleta do sangue canino para emprego no sorodiagnóstico da Leishmaniose sempre foi um grande problema, tanto para os veterinários como para os agentes de saúde municipais. Este procedimento, no entanto, pode ser bastante simples e rápido, além de manter as características do material para seu uso posterior.

O laboratório TECSA, que é um dos laboratórios de referência para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina, dá dicas de como proceder de forma correta a coleta para o material a ser analisado.

- ✓ Através da punção de uma veia do animal, o sangue é aspirado com o auxílio de uma seringa e agulha estéreis. Não garrotear por mais de 1 minuto.
- ✓ Este material coletado com a seringa deverá ser lentamente despejado nas paredes do Tubo de coleta de Tampa Vermelha – tubo sem anti-coagulante - mas com acelerador da coagulação em suas paredes, o que o difere do Tubo meramente de transporte (de tampa amarela).
- ✓ Deve-se homogeneizar o sangue com as paredes do tubo – onde está localizado o acelerador da coagulação – e depois deixar o mesmo em temperatura ambiente por 20 a 30 minutos na posição horizontal. Após este período colocar o mesmo na geladeira na posição vertical.
- ✓ Nunca Congelar o sangue total – pode haver formação de crioaglutininas. Caso queira congelar, deve-se separar o Soro da parte sólida através de centrifugação.
- ✓ Pode-se também, para animais de pequeno porte ou muito desidratados, utilizar os tubos de Microcoleta. Neste caso lanceta-se a ponta da orelha do paciente – ou ponta da cauda – e encostando-se o microtubo na região que se formam as gotas de sangue, estas gotas escorrerão para dentro do tubo. Cada gota em geral contém 200 microlitros, portanto deve-se coletar cinco gotas para atingirmos cerca de 1 mL de sangue total.
- ✓ Nos laboratórios privados a utilização do Papel Filtro não é conveniente, pois o Kit utilizado para o Teste ELISA não é adequado para a realização do exame em papel filtro (no eluato).

Identifique o material com o nome do animal, nome do proprietário, nome da clínica e do Veterinário, além do Dia e Hora da coleta. Enviar para o laboratório.

REFERÊNCIA

- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2006.
- CAMARGO, J. B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle, Brasil. Clínica Veterinária, Ano XII, n. 71, p. 86-92, nov/dez, 2007.
- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v. 25, n.5, p. 358-368, 2003.
- CLÁUDIA, S. et al. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil, Brasil. Clínica Veterinária, Ano XII, n. 71, p. 44-48, nov/dez, 2007
- COUTINHO, M. T. Z., BUENO, L. L., STERZIK, A., *et al.*, 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 128, 149–155.
- DINIZ, S.A., Melo, M.S., Borges, A.M., 2005. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. Vet. Pathol. 42, 650–658.
- DUARTE, C. S., Leishmaniose: que futuro nos reserva? Relatório final de estágio. Mestrado integrado em medicina veterinária. Porto, 2009.
- FERRER, L. AISA, M. J. ; ROURA, X. ; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Record, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.
- FRASER, C. M. Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para veterinária. 9 ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 543-544.
- 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.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, 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.
- GRANDONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis, In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Slamanca: Intervet International, 2002. P. 7-14.
- GRIMA, M. Z. Leishmaniosis canina panorama general de la enfermedad. Información Veterinaria. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de Espana, La Leishmaniosis canina(I parte), p. 14-18, 2005.

- GROGL, M., DAUGIRDA, J.L., HOOVER, D.L., et al. Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from Operation Desert Storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 308–315, 1993.
- MELO, 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*, ano V, n. 28, p. 36-44, 2000.
- MOURA, S. T. et al. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, estado de Mato Grosso, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 2, p. 123-126, 1999.
- OLIVEIRA, C. D.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 17, p. 1231-1239, 2001.
- RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, ano III, n. 11, p. 13-14, 1997.
- ROSSI, N. C., COSTA, T. A. C., LAURENTI, M. D., et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.47 n.3, São Paulo jun. 2010.
- ROSYPAL, A.C., LINDSAY, D.S., 2005. Non-sand fly transmission of a north American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected balb/c mice. *J. Parasitol.* 91 (5), 1113–1115.
- SILVA, F.L., OLIVEIRA, R.G., SILVA, T.M., et al., 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 160(1-2): 55-9.
- TARTAROTTI, A. L., DONINI, M. A., ANJOS, C., RAMOS, R. R. *Boletim epidemiológico. Equipe de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre*, v. 13, p. 5-6, 2011.