

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JOYCE KATIUCCIA MEDEIROS RAMOS CARVALHO

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS CLÍNICOS
E DE DIAGNÓSTICO**

**CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS: CLINICAL AND
DIAGNOSTIC ASPECTS**

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
Março - 2009**

JOYCE KATIUCCIA MEDEIROS RAMOS CARVALHO

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS CLÍNICOS E DE
DIAGNÓSTICO**

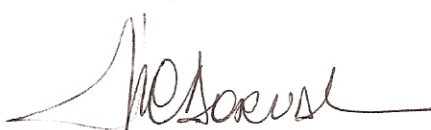
**CANINE VISCERAL LEISHMANIOSE: CLINICAL ASPECTS AND OF
DISGNOSTIC**

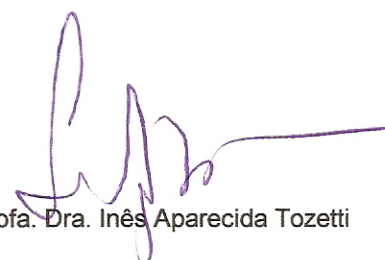
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 31/03/09


Profa. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório
Orientadora


Profa. Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval


Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

C331L Carvalho, Joyce Katiuccia Medeiros Ramos.
 Leishmaniose visceral canina : aspectos clínicos e de
diagnóstico / Joyce Katiuccia Medeiros Ramos Carvalho. -- Campo
Grande, MS, 2009.
 71 f. ; 30 cm.

Orientador: Ana Luiza Alves Rosa Osório.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Cães – Doenças. 2. Leishmaniose visceral. I. Osório, Ana Luiza
Alves Rosa Osório. II. Título.

CDD (22) 636.708969364

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia Humana do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFMS, com apoio do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina. O que vale na vida não é
o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que
colher. O saber se aprende com os mestres. A
sabedoria, só com o corriqueiro da vida”*

Cora Coralina

*“A Deus,
Por ter me dado a oportunidade e
colocado em meu caminho pessoas
especiais que me fizeram acreditar
que esta vitória era possível*

*“A minha família,
fonte do meu amor pela vida”*

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, em especial...

À minha doce mãe e meu querido pai, que não só desenvolveram dignamente a missão de educar com amor, mas também, por serem os avós presentes, que me auxiliaram nos momentos de minha ausência para que as mamadas, o carinho e atenção não faltasse a minha pequena. Amo vocês!

À minha flor Nauane pelo incentivo diário, sem mesmo perceber, que seu sorriso fortalecia meu ser e seu abraço apertado enaltecia minha alma. Amo você!

Às minhas queridas irmãs, por compartilharem comigo com amizade dos momentos de alegria e de ansiedade. Amo vocês!

Ao meu amado marido, pela amizade, amor, paciência, auxílio, incentivo e orientação. Amo você minha metade!

À professora Dra Ana Luíza Alves Rosa Osório, pela orientação, ensinamentos, críticas e sugestões, pela coragem de trilhar caminhos polêmicos e ainda não percorridos;

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande-MS e seus funcionários pelo auxílio na coleta das amostras, principalmente aos Médicos Veterinários Júlia Cristina Brazuna e Francisco de Carvalho

À professora Dra. Maria Elizabeth Cavalcheiros Dorval, pelo incentivo inicial no trabalho com LVC, por disponibilizar o seu laboratório para a realização de boa parte deste trabalho, e ainda, por dirimir minhas dúvidas para redação deste trabalho;

Às técnicas do laboratório de Parasitologia Humana (UFMS) Geucira, Zélia e Jucelei;

À Médica Veterinária Elisa Teruya Oshiro por ensinar e auxiliar-me em todo processo de cultivo das leishmanias;

À amiga Cássia Rejane Leal pela presença, carinho e colaboração em algumas fases deste trabalho;

Aos amigos Rafaela Costa, Raul Arruda e Danillo Murta pelos dias de estudos intermináveis para as provas de bioestatística e pela amizade sincera;

Às amigas Ana Teresa Fernandes e Andreia Lamoglia pela constante ajuda mesmo que distantes;

Ao professor Dr Euripedes Batista Guimarães pela oportunidade em realizar os experimentos de imunohistoquímica e histologia no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFMS);

Aos amigos Marcel Costardi, Rossevelt Carvalho e Ana Paula Antunes Nogueira que me acolheram no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária (UFMS), pelo auxílio no processamento das amostras e amizade infinita;

À equipe técnica do laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária (UFMS) pelo auxílio nas técnicas realizadas;

As novas amigas Ariane Benites e Elisângela Oliveira pela amizade, apoio e sorriso constante;

Ao amigo Dr. Mauro Rosa Elhhoury e a esposa Dra. Ana Nílce Silveira Maia Elhhoury pelo estímulo e apoio sempre que solicitado;

A Andreza Madeira (Consultora da Gerência Técnica das Leishmanioses COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS) pelas informações técnicas atuais sobre Leishmaniose visceral;

Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal UFMS na pessoa da atual coordenadora professora Dra. Maria da Graça Moraes;

Aos professores do mestrado Ciência Animal pela contribuição através das disciplinas para minha formação, em especial ao carinho e atenção britânica do professor Dr. Michael Robin Honer;

A Marilete Otaño, secretária da Pós-graduação por todo seu carinho, atenção e dedicação a nós mestrandos;

E caso não tenha mencionado, devido ao grande número de colaboradores diretos e indiretos: a você, muito obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

χ^2	Quiquadrado
μm	Micrômetro
μL	Microlitro
CCZ	Centro de controle de zoonoses
CD	Grupamento de diferenciação ou <i>cluster of differentiation</i>
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Ensaio imunoenzimático ou <i>enzyme-linked immunoassay</i>
HE	Hematoxilina-eosina
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
NNN	Nicolle, Novy e McNeal (meio de cultivo)
PBS	Tampão salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase ou <i>polymerase chain reaction</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
Th	Célula T auxiliar ou <i>T helper cells</i>
TNF	Fator de necrose tumoral ou <i>tumor necrosis factor</i>
gp63	Glicoproteína 63
RFLP	Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição ou <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico ou <i>Randomly Amplified polymorphic DNA</i>
SSR	Repetições de seqüências simples ou <i>simple sequence repeat</i>
LSSP-PCR	PCR em baixa estringência, usando um único iniciador ou <i>low stringency single specific primer</i>
PIV	Sistema de estimulação primária <i>in vitro</i>
LDU	Unidade Leishman Donovan ou <i>Leishman Donovan Units</i>
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico ou <i>peripheral blood mononuclear cells</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA.	Frequência de soropositividade para leishmaniose visceral canina obtida pelo Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS, entre 2003 e 2008.....	17
---------	---	----

ARTIGO 1

FIGURA 1.	Distribuição dos cães soropositivos para leishmaniose visceral segundo a classificação clínica, em Campo Grande, MS.....	50
FIGURA 2.	Principais manifestações clínicas observadas nos cães classificados como oligossintomáticos e sintomáticos.....	50
FIGURA 3.	Principais manifestações clínicas observadas em cães soropositivos para LVC.....	51
FIGURA 4.	Formas amastigotas em monócito de sangue medular, coradas pelo método de Giemsa, para diagnóstico de cão soropositivo para leishmaniose visceral canina.....	52

ARTIGO 2

QUADRO.	Resultados positivos em pelo menos um dos métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos, segundo a apresentação clínica, Campo Grande, MS, 2007-2008.....	66
FIGURA.	Formas amastigotas na pele obtidas de ponta de orelha de cão naturalmente infectado por <i>Leishmania</i> visualizadas pelas colorações de hematoxilina-eosina (A) e imunohistoquímica contra-corada com hematoxilina (B)	67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- TABELA 1. Resultados dos exames parasitológicos em cães soropositivos para leishmaniose visceral, segundo a classificação clínica, Campo Grande, MS, 2007-2008..... 52
- TABELA 2. Associação dos resultados da mielocultura com o exame parasitológico direto em distensão medular no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos de Campo Grande, MS..... 52

ARTIGO 2

- TABELA 1. Resultados dos testes empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos, segundo a apresentação clínica, Campo Grande, MS, 2007-2008..... 67
- TABELA 2. Associação dos resultados do exame parasitológico direto em distensão medular com a imunohistoquímica no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos de Campo Grande, MS 67

RESUMO

RAMOS J. K. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e de diagnóstico. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O objetivo desta dissertação foi realizar estudo sobre aspectos clínicos e de diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em Campo Grande, MS. No primeiro estudo foram examinados 195 cães soropositivos do Centro de Controle de Zoonoses, agrupados em sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos. A confirmação parasitológica por meio do exame parasitológico direto em distensão medular e/ou mielocultura ocorreu em 69,7% das amostras. Esses métodos apresentaram-se significativamente associados. O quadro clínico do cão com leishmaniose visceral, em Campo Grande, MS, não difere de outras regiões do país, apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a grave apresentação sintomática. A associação do exame parasitológico direto em distensão medular com a mielocultura, em cães soropositivos, aumenta as chances de diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina. No segundo estudo foram amostrados 100 cães dos 195 provenientes do primeiro estudo. As metodologias de exame parasitológico direto em distensão medular e imunohistoquímica mostraram-se eficientes na confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania*, independente da manifestação clínica. A associação do exame por imunohistoquímica de pele e parasitológico direto em distensão medular, assim como, os diferentes diagnósticos parasitológicos realizados em paralelo, aumentam as chances de confirmação de diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: leishmaniose visceral canina, apresentação clínica, diagnóstico, imunohistoquímica, mielocultura, soro hiperimune.

ABSTRACT

RAMOS J. K. M. Canine visceral leishmaniasis; clinical and diagnostic aspects. 2009. 71 f. Dissertation (Master) - Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnia, Postgraduate Program in Animal Science. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

The objective of this dissertation was to carry out a study on the clinical and diagnostic aspects of canine visceral leishmaniasis, in Campo Grande, MS. In the first study 195 seropositive dogs were examined from the Zoonoses Control Center, grouped as symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic. The parasitological corroboration by means of the direct parasitological exam in medular distension and/or myeloculture occurred in 69.7% of the samples. Those methods were significantly associated. The clinical profile of the dog with visceral leishmaniasis, in Campo Grande, MS, does not differ from other regions of the country, presenting a spectrum of clinical characteristics that varies from the apparently healthy state to a grave symptomatic presentation. The association of the parasitological straight exam in medular distension with the myeloculture, in seropositive dogs, increased the chances of diagnosis of the canine visceral leishmaniasis. A associação do exame parasitológico direto em distensão medular com a mielocultura, em cães soropositivos, aumenta as chances de diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina. In the second study 100 dogs of the 195 originating from the first study were sampled. The methodologies of the direct parasitological exam in medular distension and immunohistochemical showed themselves to be efficient in the parasitological corroboration of the infection by *Leishmania*, independent of clinical manifestation. The association of the examination by immunohistochemical of skin and direct parasitological in medular distension, as well as the different parasitological diagnoses carried out in parallel, increase the chances of diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

KEY WORDS: canine visceral leishmaniasis, clinical presentation, diagnosis, immunohistochemical, myeloculture, hyperimmune serum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A leishmaniose visceral	14
1.2 Vetores	17
1.3 Leishmaniose visceral canina	18
1.3.1 Aspectos gerais.....	18
1.3.2 Patogênese	19
1.3.2.1 Aspectos imunológicos	19
1.3.2.2 Densidade parasitária e perfil clínico	21
1.3.2.3 Formas clínicas	22
1.4 Medidas de controle da leishmaniose visceral	24
1.5 Diagnóstico de leishmaniose visceral canina.....	26
1.5.1 Métodos sorológicos	26
1.5.2 Métodos parasitológicos.....	27
1.5.3 Métodos histopatológicos e imunohistoquímica	28
1.5.4 Reação em cadeia da polimerase.....	29
ARTIGO 1.....	45
Aspectos clínicos e de diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral canina em Campo Grande, MS	46
ARTIGO 2.....	60
Diagnóstico imunohistoquímico na leishmaniose visceral canina.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença zoonótica endêmica em muitos países tropicais. Considerada uma doença emergente e em expansão no mundo, está entre as sete endemias de prioridade pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002).

A doença ocorre na Ásia, Europa, África e América, com 90% dos casos ocorrendo no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (SOARES; TURCO, 2003). Aproximadamente 147 milhões de pessoas estão expostas, e 100.000 indivíduos estão atualmente infectados (WHO, 2007).

A LV está presente em 21 estados brasileiros (LAINSON; RANGEL, 2005; MAIA-ELKHOURY et al., 2008), incluindo a ocorrência recente Rio Grande do Sul (informação pessoal¹). Entre 1980 e 2005, o Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral, sendo 82,5% na Região Nordeste. Gradativamente, a parasitose expandiu-se para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, onde passou de 15% dos casos em 1998 para 44% em 2005 (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

A LV é causada por protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada e inoculação de formas parasitárias por fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004).

O protozoário apresenta formas distintas de parasitismo nos vertebrados e no vetor. Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos, entre eles, o cão e o homem. São identificados como hospedeiros invertebrados e vetores, exclusivamente fêmeas da subfamília Phlebotominae (WHO, 2002).

Leishmania (Leishmania) chagasi é uma espécie do complexo *Leishmania donovani*, segundo o modelo taxonômico proposto por Lainson et al. (1987). Estão incluídas neste complexo as três principais espécies causadoras da leishmaniose visceral: *L. (L.) donovani*, na Índia e leste da África, *L. (L.) infantum*, nos países da Bacia Mediterrânea e no oeste da África, e *L. (L.) chagasi* na Américas (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000).

¹ GOMES, MLS. Mapa, distribuição de LV. Mensagem recebida por joycekatiuccia@hotmail.com em 20 abr. 2009.

Com base nos perfis isoenzimáticos e genéticos, alguns autores consideram que a espécie *L. chagasi* seja indistinguível de *L. infantum* (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; MAURICIO et al., 2001). Mauricio, Stothard e Miles (2000) e Mauricio et al. (1999) estudando as relações genótípicas do complexo *L. donovani* por amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), sequenciamento parcial do gene da gp63 e polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP), mostraram que *L. chagasi* e *L. infantum* são geneticamente indistinguíveis e formam um grupo monofilético dentro do complexo.

Recentemente, Alvarenga (2007), estudando amostras de *L. chagasi* provenientes do Brasil e *L. infantum* de Portugal, observou o mesmo zimodema. Pela utilização das técnicas de RAPD e PCR com iniciadores de repetições de seqüências simples (SSR-PCR) observou a distinção das amostras em dois *clusters* relacionados ao hospedeiro de origem. Com as técnicas RFLP e PCR em baixa estringência, usando um único iniciador (LSSP-PCR), essa distinção não foi confirmada, mas pequenos polimorfismos foram detectados. A técnica de sequenciamento evidenciou polimorfismos, algumas vezes associados à origem geográfica ou ao hospedeiro.

Lainson e Rangel (2003, 2005) baseados em diferenças observadas por meio de técnicas moleculares têm usado a nomenclatura *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi*, sugerindo que a separação taxonômica dos parasitos poderia ser ao nível de subespécie. Por outro lado, Dantas-Torres (2006), acredita que *L. chagasi* e *L. infantum* devem ser consideradas espécies sinônimas, sem que haja mudança no nome ao nível de subespécie, pois isso implicaria em toda uma re-classificação do gênero *Leishmania*. Contudo, segundo Shaw (2006), de acordo com o código da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, o nome *L. (L.) infantum chagasi* é absolutamente correto.

Nos mamíferos, o protozoário apresenta-se sob a forma amastigota, que se multiplica por divisão binária no interior das células fagocíticas mononucleares. Após serem ingeridas pelas fêmeas de flebotomíneos, por ocasião do repasto sanguíneo, estas transformam-se em formas flageladas, denominadas promastigotas, no tubo digestivo do flebotomíneo e após quatro dias, já podem ser transmitidas ao hospedeiro (ASHFORD et al., 1998).

Nas periferias das áreas urbanas de várias capitais e cidades de porte médio do Brasil, os seguintes fatores são reconhecidos por facilitarem a urbanização da LV: degradações ambientais e as políticas sociais associadas à migração de populações rurais carentes; condições sociais e econômicas mais precárias; convivência com animais domésticos e a capacidade de adaptação do vetor ao peridomicílio humano (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MONTEIRO; LACERDA; ARIAS, 1994).

De acordo com Tesh (1995), os migrantes podem levar consigo seus animais domésticos, cães, galinhas e porcos, e os mantêm próximos as suas casas, aumentando a chance de transmissão. Este fato contribuiu para o aumento da prevalência da LV a partir da década de 90, em áreas urbanas de grandes cidades do Brasil como Belo Horizonte, MG, Rio de Janeiro, RJ, São Paulo, SP e Campo Grande, MS (LAINSON; RANGEL, 2005; OLIVEIRA, A.L. et al., 2006).

Além destas associações devem ser consideradas as mudanças na susceptibilidade do hospedeiro à infecção como no caso de imunossupressão e desnutrição (ASHFORD, 2000; CHAPPUIS et al., 2007; FRANÇA-SILVA et al., 2005; WHO, 2007).

A intervenção antrópica sobre o meio ambiente como a construção do gasoduto e a destruição de áreas do cerrado em Mato Grosso do Sul, podem ter contribuído para a disseminação do vetor nesta região. Antonialli (2006), por meio de análise espacial, verificou que a disseminação da LV no Estado ocorreu no sentido oeste-leste a partir de 1998, coincidindo com a rota e o início da construção do gasoduto Bolívia-Brasil, que demandou a migração de milhares de trabalhadores atraídos de diferentes regiões brasileiras, muitas delas endêmicas para LV.

Já no município de Campo Grande, a mudança ambiental está relacionada com a abertura de avenidas acompanhando os cursos das águas e a derrubada da vegetação para construção de casas populares, com a transmissão ocorrendo inclusive em áreas centrais do município (ANTONIALLI, 2006; ARAUJO e SILVA; ANDREOTTI, HONER, 2007).

A primeira confirmação parasitológica de leishmaniose em Mato Grosso do Sul ocorreu em 1980 no município de Corumbá. A partir de 1995 houve expansão para outras localidades, sendo registrada atualmente em 49 dos 78 municípios do Estado (NUNES et al., 1988; OLIVEIRA, A.G. et al., 2006; SINAN, 2009).

Em Campo Grande, os primeiros casos caninos surgiram em 1998, quando *L. (L.) infatum chagasi* foi isolada (SILVA et al., 2000). Com a implantação das medidas de controle, o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) passou então a realizar os inquéritos sorológicos caninos por meio de testes de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático ou *enzyme-linked immunoassay* (ELISA), cuja evolução a partir de 2003 está apresentada na Figura (informação pessoal²).

² BRAZUNA, J.C.M. Dados cães. Mensagem recebida por joycekatiuccia@hotmail.com em 19 nov. 2008.

Embora o município de Campo Grande tenha casos autóctones humanos notificados a partir de ano 2002 (OLIVEIRA, A.G. et al., 2003; 2006), os registros junto à Secretaria de Saúde revelam 813 casos entre os anos de 2001 e setembro 2008 (SINAN, 2009).

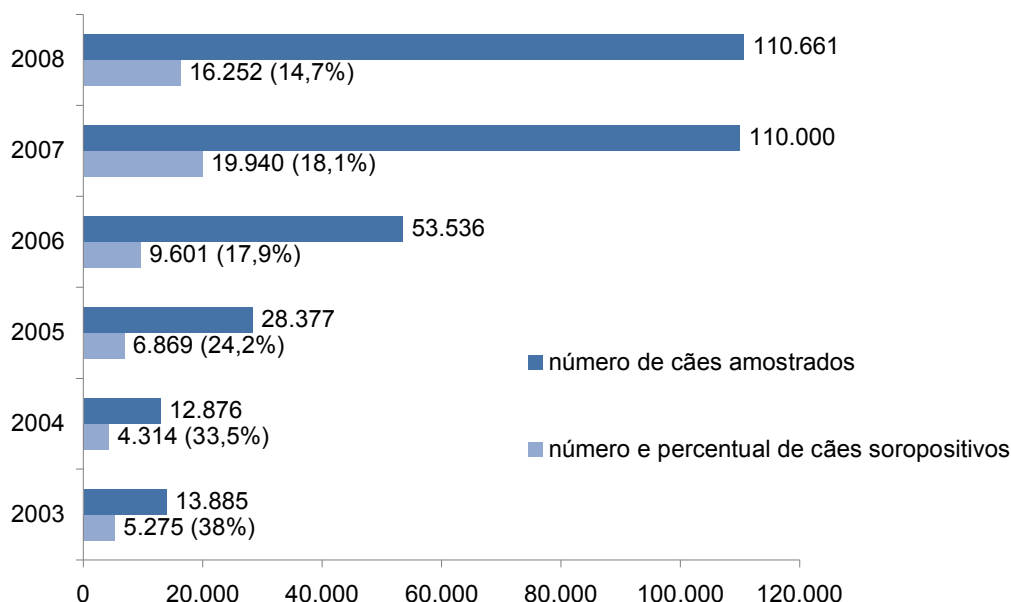


FIGURA. Frequência de soropositividade para leishmaniose visceral canina obtida pelo Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS, entre 2003 e 2008. Adaptado de informação pessoal².

A frequência de soropositividade na população canina de Campo Grande, MS e a constante notificação de casos humanos, classificam o município como área de transmissão intensa (SINAN, 2009). Demonstra a importância desta enfermidade como um problema de saúde pública e animal e justifica a necessidade de investigação dos padrões clínicos e de diagnóstico da doença canina neste município, com vistas a contribuir para o controle da doença, cujo objetivo principal é interromper a cadeia de transmissão da parasitose.

1.2 Vetores

O vetor de *L. (L) infantum chagasi* é representado por insetos dípteros, da família Psychodidae, tendo como principal papel epidemiológico *Lutzomyia longipalpis* (LAISON et al., 1987). *Lutzomyia cruzi* também foi observado como vetor da LV no Estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998; GALATI et al., 1997). A saliva de *Lutzomyia longipalpis* contém o peptídeo maxadilan que apresenta importância fundamental no processo

de infecção, com potente atividade vasodilatadora, antiplaquetária e imunomoduladora (LERNER et al., 1991; QURESHI et al., 1996). Esse peptídeo mantém o fluxo sanguíneo constante, dificultando a coagulação e, portanto, facilitando a inoculação dos parasitos nos hospedeiros vertebrados (KILLICK-KENDRICK, 1999).

Esses insetos são popularmente conhecidos por flebotomíneos, mosquito palha, birigui ou cangalhinha. São pequenos, cobertos de pêlos e de coloração clara (cor de palha ou castanho claro), facilmente reconhecíveis pelo comportamento de voar em saltos e pousar com as asas entreabertas e ligeiramente levantadas. Preferem lugares com pouca luminosidade e ventilação, úmidos, e que tenham alimento por perto. Como muitos outros dípteros hematófagos necessitam de carboidratos, que na natureza adquirem da seiva de plantas e de frutas maduras. Para que ocorra a maturação e desenvolvimento dos ovos as fêmeas precisam ingerir, além de carboidratos, uma fonte alimentar sanguínea (DIAS et al., 2003; FRANÇA-SILVA et al., 2005). As formas adultas estão adaptadas a diversos ambientes e possuem atividade crepuscular e noturna (BRASIL, 2006).

No peridomicílio os ambientes propícios para a população desses vetores, são aqueles com presença de lixo, abrigo de animais (galinheiros e estábulos) e arborização abundante (GALATI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2008).

1.3 Leishmaniose visceral canina

1.3.1 Aspectos gerais

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2006).

Os canídeos, especialmente os cães domésticos e não domiciliados, são reservatórios para *L. (L.) infantum chagasi* (GUERIN et al., 2002; MAURICIO et al., 2001; MARZOCHI et al., 1985).

Fatos como a alta prevalência da doença canina em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, o intenso parasitismo cutâneo apresentado por esses animais, bem como, por preceder a ocorrência da doença em humanos, destacam o importante papel do cão na

epidemiologia da LV (BADARÓ et al., 1996; COURTENAY et al., 2002; GIUNCHETTI et al., 2006; MORENO; ALVAR, 2002).

1.3.2 Patogênese

1.3.2.1 Aspectos imunológicos

A resposta imunológica desencadeada por um agente infeccioso é dependente de vários fatores, como sua antigenicidade, carga parasitária e sistema imunológico do hospedeiro, sendo, portanto, a apresentação clínica da doença uma consequência destas interações (SANTOS-GOMES et al., 2002).

Leishmania sp. são protozoários que se multiplicam inicialmente em macrófagos na porta de entrada das formas parasitárias. Se o hospedeiro não gera uma resposta imune protetora eficaz, os parasitos podem disseminar-se da pele em fagócitos mononucleares atingindo a medula óssea, o baço, linfonodo e fígado, causando uma doença crônica (STRAUSS-AYALI; BANETH, 2001).

A infecção por *Leishmania* pode ter evolução diferente em indivíduos geneticamente distintos, e o curso da infecção é determinado pela natureza da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (DAY, 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

Com relação ao perfil imunológico do cão, existem alguns registros dos mecanismos de proteção e susceptibilidade à doença (MORENO; ALVAR, 2002). Evidências experimentais e clínicas indicam que a resolução das infecções por *Leishmania* é dependente de células T, e mediada por macrófagos ativados (BARBIÉRI, 2006). Os macrófagos e as células dendríticas infectadas atuam como células apresentadoras de antígenos ativando linfócitos (CD4+) Th1 e Th2. Havendo a ativação das células Th1 ocorrerá a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), as quais aumentariam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos, desencadeando resposta imune protetora e baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (PINELLI et al., 1994; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007). Dessa forma, cães que apresentam resposta imune protetora mediada por células são capazes de controlar a infecção e permanecem assintomáticos.

Quando cães infectados por *L. (L.) infantum chagasi* desenvolvem acentuada resposta imune humoral, esta não apresenta efeito protetor quanto a progressão da doença (LOPEZ; LUCENA; NOVALEZ, 1996; MORENO; ALVAR, 2002; RODRÍGUEZ-CORTES et al.,

2007). Essa resposta é caracterizada pela produção aumentada de citocinas antiinflamatórias (Interleucinas-4, 5, 6, 10, 13), as quais desencadeiam a proliferação de células B e produção de imunoglobulinas (MORENO; ALVAR, 2002; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007). Strauss-Ayali, Baneth e Jaffe (2007) mostraram que uma resposta imune com perfil Th1 e Th2 ocorre na infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, e sugerem que a elevação inicial dos níveis de IL-4 pode ter um papel na persistência do parasito, mesmo na presença de níveis elevados de IFN- γ . Assim, cães naturalmente infectados que apresentam um perfil não protetor, produzem citocinas do perfil Th1/Th2, altos títulos de anticorpos e evoluem para forma clínica sintomática. No caso dos cães que desenvolvem a doença, ocorre uma depleção das regiões de células T dos seus órgãos linfóides, enquanto as zonas de células B destes órgãos proliferam. A excessiva proliferação de células B e macrófagos resulta em hepatomegalia, linfadenomegalia generalizada e hipergamaglobulinemia (FEITOSA et al., 2000; STRAUSS-AYALI; BANETH, 2001).

Um importante dano causado pela hipergamaglobulinemia é a produção de grande quantidade de imunocomplexos circulantes que, uma vez depositados na parede dos vasos sanguíneos, resulta em processos inflamatórios em diferentes órgãos (BANETH, 2006; LOPEZ; LUCENA; NOVALEZ, 1996; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007).

Níveis significativamente mais elevados de IL-2 e de TNF α em cães assintomáticos foram encontrados nos sobrenadantes de células mononucleares periféricas (PBMC) estimuladas, quando comparados com as células de cães sintomáticos (PINELLI et al., 1994). Além disso, PBMC dos cães assintomáticos produziram IFN- γ perante a estimulação antígeno-específica do parasito, enquanto que, linfócitos dos cães sintomáticos não o fizeram (PINELLI et al., 1995).

Recentemente, Rodrigues et al. (2007) mostraram que se pode identificar resposta protetora à infecção de cães imunizados e assintomáticos num sistema de reestimulação de PBMC *in vitro*. A maioria dos PBMC desses cães protegidos produz e secreta IFN- γ . Os sobrenadantes dos PBMC desses cães assintomáticos foram capazes de estimular macrófagos de cães saudáveis a destruir *Leishmania*. Em um sistema de estimulação primária *in vitro* (PIV), Rodrigues et al. (2009), utilizando co-cultura de PBMC de cães saudáveis, primariamente estimulados com promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e macrófagos autólogos, mostraram que o aumento da produção de IFN- γ pelos PBMC está relacionado a um menor percentual de macrófagos infectados *in vitro*. A associação da IL-10 e leishmaniose visceral humana com doença ativa está firmemente estabelecida (NYLEN; SACKS, 2007), mas essa associação ainda não foi bem definida na LVC (CARRILLO; MORENO, 2009). Pinelli et al.

(1999) avaliaram a produção de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 em PBMC de cães infectados com *L. (L.) infantum chagasi*. Em um cão assintomático foi detectada a produção de todas as citocinas avaliadas, enquanto que, nos quatro animais sintomáticos, apenas a produção de IL-4 ou IL-10 foi detectada, indicando uma possível participação destas citocinas no desenvolvimento de manifestações clínicas da doença. Em outros estudos a produção de IL-10 não pode ser relacionada com uma resposta não protetora (QUINNELL et al., 2001; SANTOS-GOMES et al., 2002), contudo, recentemente, foi demonstrado que a produção dessa citocina é diretamente proporcional ao aumento da carga parasitária e dos sinais clínicos observados durante a progressão da doença (LAGE et al., 2007).

1.3.2.2 Densidade parasitária e perfil clínico

Abordagens relevantes para o entendimento dos aspectos imunopatológicos na LVC buscam uma associação da densidade parasitária com a clínica e a resposta imune em cães infectados. As técnicas mais utilizadas para a quantificação da densidade parasitária são: relação entre o número de amastigotas para mil células nucleadas por meio do método de Unidade Leishman Donovan (LDU) (Leishman Donovan Units) (REIS et al., 2006a); a imunohistoquímica (GIUCHETTI et al., 2006, 2008ab; TAFURI et al., 2004) e a PCR em tempo real (FRANCINO et al., 2006).

Reis et al. (2006ab) ao estudarem a densidade parasitária por meio de LDU, observaram associação positiva com o perfil clínico dos cães e a intensidade parasitária do baço, fígado, medula óssea e pele. Por meio da mesma técnica, Teixeira-Neto (2008), estudando amostras de pele, obteve diferença estatística significativa na avaliação da densidade parasitária ao comparar os grupos de cães assintomáticos e sintomáticos. Laranjeira (2008) observou, por imunohistoquímica, correlação estatística positiva entre a presença de parasitos em vísceras e ou pele e a sintomatologia, enquanto que uma correlação negativa foi encontrada quando comparada a intensidade parasitária e cães assintomáticos.

Independentemente da apresentação clínica, pele e baço são os principais sítios de alta densidade parasitária durante o curso da LVC. Além disso, foi demonstrado que a densidade parasitária da medula óssea e do baço são marcadores parasitológicos ideais para correlacionar a evolução clínica da doença (REIS et al., 2006a).

Rodríguez-Cortés et al. (2007) ao avaliarem parâmetros clínicos, imunológicos e parasitológicos mostraram que a intensidade da infecção por *Leishmania* em amostras de sangue, indicadas pela quantidade de DNA do parasito, esteve correlacionada

significativamente com as concentrações de IgG, de IgG1, de IgG2, de IgA, e de IgM e com os sinais clínicos. A parasitemia e a imunidade mediada por células específica contra *Leishmania* tiveram correlação inversa. Além disso, o mesmo estudo revelou que quantidades mais elevadas de DNA de *Leishmania* foram detectadas nos tecidos dos cães sintomáticos do que nos oligossintomáticos. Estes resultados reforçam que a LVC progressiva está associada com a falta de resposta específica de célula T, e a resposta humoral com a disseminação e multiplicação da *Leishmania* em diferentes tecidos.

1.3.2.3 Formas clínicas

Nos animais suscetíveis, após a colonização do sistema reticuloendotelial pode haver disseminação do parasito por via hematogena e ou linfática para rins, órgãos reprodutivos, bexiga, sistema respiratório e digestório, e novamente a pele (ALVAR et al., 2004; CARDOSO; CABRAL, 1999). Esta presença nos órgãos e tecidos, associado à resposta imune do cão ante a infecção determinam reações que produzem as lesões e os sintomas da LVC (ALVAR et al., 2004; REIS et al., 2006a).

De acordo com a apresentação clínica, os cães podem ser agrupados como: oligossintomáticos, com até três sintomas clínicos; sintomáticos, com mais de três sintomas e os assintomáticos, que não apresentam sintomas (MANCIANTI et al., 1988).

Em uma área endêmica, aproximadamente 40% dos animais são assintomáticos, porém, há opiniões contrárias na literatura em relação à cura espontânea desses animais. Ribeiro (2001) afirma que em 62% dos cães assintomáticos ocorre a cura espontânea, enquanto outros estudos mostram que raramente os animais curam-se espontaneamente e que destes, 80% evoluem para a forma sintomática (FEITOSA et al., 2000; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

A LVC pode apresentar uma grande variabilidade de sintomas clínicos, caracterizados por febre intermitente, linfadenomegalia, esplenomegalia, dermatite, hiperqueratose, lesões de borda de orelha e focinho, alterações oculares, acinesia e onicogribose (CIARAMELLA et al., 1997; CORTADA et al., 2004; DA COSTA-VAL et al., 2007; MANCIANTI et al., 1988).

Outros sintomas freqüentes são as alterações dermatológicas presente em 90% dos casos (alopecia local ou generalizada, descamação furfurácea, piodermite periorbital e nódulos que podem ou não ulcerar), hepatomegalia, alterações renais (insuficiência renal e glomerulonefrites), oftalmológicas (uveíte, ceratoconjutivite seca, glaucoma e panoftalmite), hematológicas (anemia e epistaxe) e neurológicas (tetraparesia, convulsões, andar em

círculos, nistagmo, paralisia de mandíbula e ptose labial) (CIARAMELLA et al., 1997; FEITOSA, 2006; FULGÊNCIO, 2006; IKEDA et al., 2003; CARVALHO NETA et al., 2007).

As úlceras cutâneas dão-se, provavelmente, pela ação direta do parasito (FERRER et al., 1988a; RIDLEY; RIDLEY, 1983) ou pela vasculite necrosante ocasionada pela deposição de imunocomplexos (PUMAROLA et al., 1991). Poci et al. (1998) citam que nos casos em que ocorrem ulcerações, elas são vistas principalmente na pele do focinho, orelha e mucosa oral e nasal.

A ação direta do parasito sobre o folículo piloso, ou lesões hepáticas que provoquem distúrbio do ácido pantotênico, ou ainda, a deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele, podem explicar a alopecia nos cães infectados (HOMMEL, 1978). A presença do parasito na matriz ungueal estimula o seu crescimento levando à característica onicogribose nestes animais (LESTOQUARD; DONATIEN, 1983; FEITOSA et al., 2000). Embora Marzochi et al. (1985) consideram que a apatia do cão pode ser responsável pelo não desgaste natural das mesmas.

Os distúrbios locomotores podem ser justificados por poliartrite em função da deposição de imunocomplexos, fissuras nos coxins, úlceras interdigitais e lesões osteolíticas como osteomielite osteolítica ou periostite proliferativa (AGUT et al., 2003; PARABONI; FRANCO; MATTEI, 2008; SOUZA et al., 2005).

A formação de imunocomplexos circulantes pode causar danos em vários órgãos, representados por quadros de vasculites, uveítes, glomerulonefrites e artrites (BANETH, 2006; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007). Além disso, os imunocomplexos podem ligar fragmentos do complemento às células sanguíneas, reduzindo seu tempo de vida podendo então, levar a quadros de anemia e trombocitopenia imunomediada (LOPEZ; LUCENA; NOVALEZ, 1996).

Alterações hematológicas como anemia normocrômica, leucopenia, e trombocitopenia podem ser observadas (ABRANCHES et al., 1991; CIARAMELLA et al., 1997). A anemia vem sendo reportada em cerca de 50 a 70% dos casos caninos (BANETH, 2006; XAVIER, 2002). Segundo Da Costa-Val et al. (2007) o número total de leucócitos, assim como a contagem diferencial, não obedecem qualquer padrão em cães portadores de leishmaniose, podendo apresentar leucocitose ou mesmo perfil leucocitário normal.

Na eletroforese sérica observa-se a inversão da relação albumina/globulina, com o aumento da fração gama caracterizando a hipergamaglobulinemia, com diminuição da albumina em alguns casos (KEENAN et al., 1984; CIARAMELLA et al., 1997).

Alterações no trato gastrointestinal ocorrem pela reação inflamatória com infiltrado predominantemente de macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania*, principalmente no ceco e cólon (SILVA et al., 2002).

Foram descritas por Diniz et al. (2005) alterações patológicas do trato genital masculino, que incluem epididimite, balanopostite e menos frequentemente orquite, com infiltrado inflamatório composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos, associado à presença de amastigotas.

1.4 Medidas de controle da leishmaniose visceral

Nos últimos 20 anos, apesar do conhecido problema da subnotificação de casos, o Brasil registrou um marcado aumento na incidência da leishmaniose visceral. Sua situação atual pode ser vista como um paradoxo: os aspectos mais importantes da doença são conhecidos, porém, o controle ainda não foi obtido.

A expansão da parasitose e as diferentes situações epidemiológicas encontradas, tanto em regiões rurais como urbanas, indicam a necessidade da adoção de diferentes estratégias para o controle dessa endemia no país. Assim, são indispensáveis ações junto às comunidades, envolvendo educação, provisão de informação, promoção da saúde e participação no planejamento, desenvolvimento e manutenção dos programas adotados (MARZOCHI; MARZOCHI, 1997).

Neste sentido, as medidas de controle da LV preconizadas pelo Ministério da Saúde, e iniciadas há mais de 40 anos, envolvem quatro principais estratégias: diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos; controle dos vetores por meio do uso de inseticidas em área domiciliar e peridomiciliar; realização de inquéritos sorológicos nas populações caninas seguidos da eliminação dos animais soropositivos, e orientações dirigidas às atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; TESH, 1995).

Em Campo Grande, uma quinta estratégia vem sendo utilizada desde 2007, quando foi adotada como medida preventiva o uso de coleiras impregnadas com deltametrina em cães sorologicamente negativos, ainda sem a divulgação de seu resultado. Killick-Kendrick et al. (1997) e Foglia Manzillo et al. (2006) em experimentos com coleiras impregnadas com deltametrina, mostraram resultados promissores para a proteção dos cães e consequentemente quebra do ciclo da transmissão.

Os inquéritos sorológicos têm sido feitos na população canina domiciliada em áreas de transmissão de *L. (L.) infantum chagasi* para seres humanos, de acordo com a estruturada rede de testes de RIFI e ELISA proposta pelo Ministério da Saúde. Menciona-se que todos os cães com resultado reagente devem ser eutanasiados (BRASIL, 2006).

Costa e Vieira (2001) enfatizam que o programa de eliminação de cães domésticos apresenta o menor suporte técnico-científico entre as quatro estratégias do programa de controle. Os pontos de maior fragilidade são: 1) a falta de correlação espacial entre a incidência cumulativa de LV humana com a soroprevalência canina (MAGUIRE et al., 1997); 2) a ausência de risco significativo de coabitação com cães para aquisição de LV (ASHFORD et al., 1998; COSTA et al., 1999); 3) a demonstração teórica de que é um método pouco eficiente em comparação com as estratégias de controle vetorial e de suplementação alimentar (DYE, 1996); 4) a demonstração de que outros reservatórios podem ser fontes de infecção de *L. (L.) infantum chagasi*, tais como pessoas, em particular crianças desnutridas (COSTA et al., 2000), canídeos silvestres (DEANE, 1962) e marsupiais (SHERLOCK et al., 1984); 5) a grande velocidade com que a população canina é reposta, exigindo proporção e frequência de retirada de cães soropositivos impraticável (BRAGA et al., 1998; MOREIRA JUNIOR et al., 2004); 6) a baixa eficiência dos testes sorológicos em detectar a infecção canina (DYE; VIDOR; DEREURE, 1993); 7) em alguns estados, a utilização de um único método para efetuar as funções de teste de triagem e de teste confirmatório para a infecção por *L. (L.) infantum chagasi*, conduzindo a um elevado custo por benefício, devido à alta proporção de resultados falso-positivos, particularmente quando a prevalência real é baixa (GART; BUCK, 1966); 8) a falta de indicadores clínicos ou laboratoriais de infectividade de cães para o vetor (MOLINA et al., 1994); 9) a ausência de experiências anteriores que tenham demonstrado vantagens exclusivas da eliminação de cães, pois todos os relatos de sucesso de programas de controle de LV onde foram eliminados cães descrevem também o controle de vetores com inseticidas (MAGALHÃES et al., 1980), e 10) a publicação de observações e ensaios em que se verificou que quando esta medida foi aplicada sozinha, não houve demonstração inequívoca da vantagem de seu uso em reduzir a incidência de LV em seres humanos (ASHFORD et al., 1998; DIETZE et al., 1999; EVANS et al., 1992; PARANHOS-SILVA et al., 1998).

Deste modo, há evidências de que as estratégias de controle atuais não têm sido capazes de prevenir a expansão geográfica, além do aumento da incidência e da letalidade da LV. Existe ainda a necessidade da implementação de um sistema de monitoramento das atividades dirigidas para o controle e a vigilância epidemiológica, o que poderia permitir

melhor avaliação do Programa de controle nas diversas regiões do Brasil (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

1.5 Diagnóstico de leishmaniose visceral canina

O diagnóstico precoce se faz necessário por se tratar de uma doença que pode ser fatal para o hospedeiro humano e também, pela necessidade de adoção de medidas de controle específicas para o reservatório doméstico da doença (ALVES; BEVILACQUA, 2004). 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: variedade de sintomas clínicos e semelhança com aqueles observados em outras doenças infecciosas; alterações histopatológicas inespecíficas, e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (BRASIL, 2006).

O diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado em exames parasitológicos ou sorológicos. Para determinar o exame laboratorial mais adequado, é importante que se conheça a área provável de transmissão, o método a ser utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica (BRASIL, 2006).

1.5.1 Métodos sorológicos

A sorologia é o principal método empregado para o diagnóstico de rotina e levantamentos epidemiológicos, e baseia-se no fato da maioria dos animais infectados apresentarem elevados títulos de anticorpos específicos (BADARÓ et al., 1996; MARZOCHI et al., 1985).

As técnicas sorológicas atualmente mais empregadas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* são a RIFI e o ELISA (FERRER et al., 1995; LIRA et al., 2006). Estes testes utilizam formas promastigotas ou proteínas solúveis do parasito como fonte de antígeno, o que pode limitar a especificidade e/ou aumentar os problemas com a produção de preparações antigênicas padronizadas (BIO-MANGUINHOS, 2004ab).

De maneira geral, os métodos que utilizam parasitos íntegros apresentam elevada sensibilidade, enquanto aqueles realizados com extratos solúveis possuem especificidade superior. No entanto, apesar da sensibilidade e especificidade adequadas, podem apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas (ALVAR et al., 2004).

Nos últimos anos, vários laboratórios têm desenvolvido antígenos recombinantes para utilização nos testes sorológicos convencionais com o objetivo de melhorar sua especificidade. Dentre esses, destaca-se o antígeno recombinante K39 (rK39), uma proteína dominante em amastigotas de *Leishmania* do complexo *donovani* (REITHINGER et al., 2002). O rK39 também é a base dos testes imunocromatográficos rápidos, os quais vêm sendo recentemente utilizados como método de diagnóstico da infecção em cães (METTLER et al., 2005; TAFURI et al., 2004).

As técnicas sorológicas acima mencionadas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, com o ELISA sendo realizado para a triagem, e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes (BRASIL, 2006), uma vez que é reconhecida como “padrão-ouro” (GRADONI, 1999), e embora apresente menor sensibilidade e especificidade que o ELISA, tem sido o método mais comumente utilizado na rotina, tanto para o diagnóstico da LV humana quanto da canina (ANDRADE et al., 1998; BADARÓ; REED; CARVALHO, 1983; CABRAL et al., 1998; GRADONI, 2002). O teste de ELISA disponibilizado pelo laboratório Bio-Manguinhos confere sensibilidade para amostras de soro de cães de 94,54% e especificidade de 91,76%.

A RIFI confere sensibilidade de 90% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro (HARITH et al., 1987). A especificidade desse teste é prejudicada pela presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanosomatídeos, como o da doença de Chagas e os da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (ALVES; BEVILACQUA, 2004; COSTA; VIEIRA, 2001).

1.5.2 Métodos parasitológicos

O diagnóstico parasitológico compreende o exame direto de material biológico para visualização de formas amastigotas, o isolamento *in vitro* do parasito com a obtenção de formas promastigotas em meio de cultura específico, e também a inoculação em animais suscetíveis (BRASIL, 2006).

O exame parasitológico direto, considerado “padrão ouro”, é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasito em material biológico obtido por punção hepática, de linfonodos, esplênica, de medula óssea, e biópsia ou escarificação de lesões de pele. Entretanto, alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos (CAÑAVATE et al., 2005; REIS et al., 2006a; TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003), predispondo a ocorrência de riscos para o animal, e também

são impraticáveis em programas de saúde pública, quando um grande número de animais deve ser avaliado em curto espaço de tempo.

A especificidade do método é de aproximadamente 100%, e a sensibilidade depende da densidade parasitária, do tipo de material biológico examinado e do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se considerar uma lâmina como negativa), uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas em esfregaços corados por Giemsa ou Wright, Leishman ou Panóptico. No exame de cães sintomáticos a sensibilidade é de aproximadamente 80%, sendo menos sensível em animais assintomáticos (BRASIL, 2006).

De acordo com Ferrer (1999) o exame parasitológico direto possui sensibilidade variável, em torno de 60% para amostras de medula óssea, 98% para o baço e inferior a 30% para amostras de linfonodos.

Em meio de cultura *in vitro*, material biológico, contendo formas amastigotas do parasito, obtido por punção, biopsia ou necropsia é inoculado em meios específicos, onde transformam-se em formas promastigotas. O clássico meio de NNN (Nicolle, Novy e McNeal) é o mais comumente empregado. A utilização de uma fase líquida, como o meio LIT ou de Schneider, é frequentemente recomendada como forma de enriquecimento. Após o isolamento e a obtenção de massa parasitária, é possível a identificação da espécie de *Leishmania* (BRASIL, 2006; GRIMALDI JR.; TESH, 1993; INIESTA et al., 2002; TESH, 1995).

O isolamento *in vivo* ou prova biológica, consiste na inoculação intraperitoneal do material suspeito em animal sensível, hamster, *Mesocricetus* sp.. Não é um método prático de diagnóstico, considerando o longo período de tempo (1 a 3 meses) necessário para que o animal manifeste os sintomas da parasitose e ainda, a necessidade de um local adequado para a manutenção dos mesmos (MARZOCHI et al., 1981; BRASIL, 2006).

1.5.3 Métodos histopatológicos e imunohistoquímica

Os achados histopatológicos são, em sua maioria, inespecíficos e caracterizam-se por reação granulomatosa com presença de células mononucleares, achados estes comuns a outras enfermidades. Havendo poucas formas amastigotas nos tecidos o diagnóstico pela histopatologia pode ser difícil (FERRER, 1999; GARCIA; FEITOSA, 2006).

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) vem sendo utilizada para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostras de pele íntegra, linfonodo, fígado, baço, rim,

glândula adrenal, trato gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon), olho, glândula lacrimal, medula óssea, testículo e placenta, com desempenho diagnóstico superior ao exame histopatológico corado pela hematoxilina eosina (HE), abreviando o tempo de exame das preparações, pois permite fácil visualização dos parasitos imunomarcados (DINIZ et al., 2005; TAFURI et al., 2004; XAVIER et al., 2006).

A técnica de IHQ consiste na detecção de antígenos “in situ” por meio da utilização de um anticorpo policlonal ou monoclonal primário e específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo, possibilitando sua visualização. Nas leishmanioses, o diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com formas amastigotas (RAMOS-VARA, 2005).

Esta técnica aumenta a probabilidade do encontro do parasito, promovendo a conclusão diagnóstica quando o número de parasitos no tecido é baixo. Possui especificidade e sensibilidade entre 60 e 70%, e além de detectar o material antigênico do protozoário no local da lesão, permite também evidenciar das alterações anatomopatológicas nos órgãos examinados (FERRER et al., 1988b; SOLANO-GALLEGU et al., 2004; XAVIER et al., 2006).

Tafuri et al. (2004) e Diniz et al. (2005) descreveram a utilização de IHQ para o diagnóstico da LVC, por meio da técnica indireta estreptoavidina biotina marcada (LSAB), utilizando o *kit* LSAB (DAKO, USA) e como anticorpo primário, soro hiperimune de cão infectado naturalmente por *Leishmania* sp.

A IHQ propicia a identificação de parasitos em cortes de tecidos com maior sensibilidade em relação àqueles corados por hematoxilina-eosina (XAVIER et al., 2006).

1.5.4 Reação em cadeia da polimerase

Tem sido demonstrado que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível e específico para a detecção de DNA de *Leishmania* em uma variedade de amostras de origem humana, canina e de raposas, quando comparados com métodos diagnósticos convencionais (ASHFORD et al., 1995; FERRER et al., 1995; FISA et al., 2001; MANNA et al., 2004).

O diagnóstico pode ser feito utilizando-se aspirados de medula óssea e de linfonodos, biópsia de pele, conjuntiva, urina e também em amostras de sangue periférico que mostrou ser uma alternativa não invasiva altamente eficiente para o diagnóstico da infecção,

demonstrando sensibilidade de 82% a 100% e especificidade de 100% (BERRAHAL et al., 1996; LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2007; STRAUSS-AYALI et al., 2004). Recentemente a reação foi otimizada com sucesso para a detecção de kDNA de *Leishmania* em amostras de sêmen canino, apresentando sensibilidade de detecção de, no mínimo, um organismo por mililitro de sêmen (DINIZ et al., 2005).

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P.; SILVA, M.C.P.; CONCEICAO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J Parasitol.** v. 77, p.557-561, 1991.
- AGUT A.; CORZO N.; MURCIANO J.; LAREDO F.G.; SOLER M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. **Vet Rec.** Nov 22;153(21):648-52, 2003.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol.** v. 57, p.1-88, 2004.
- ALVARENGA, J.S.C. **Variabilidade genética intra e interespecífica de *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2007. 198 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.
- ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad Saúde Pública.** v. 20.p. 256-9, 2004.
- ANDRADE, P.P.; SANTOS, E.S.C.; KIDO, E.A.; QUEIROZ, I.M.; LUNA, L.K.S.; TORQUARTO, G.N.; BALBINO, V.Q. Assessment of a recombinant *Leishmania* Hsp70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 93, suppl. 2, p. 217, 1998.
- ANTONIALLI, S.A.C. **Ecoepidemiologia da leishmaniose visceral americana e sua distribuição espacial no Estado de Mato Grosso do Sul 1994-2003**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2006.
- ARAUJO E SILVA, E.; ANDREOTTI, R.; HONER, M.R. Behavior of *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of American visceral leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 40, p. 420-425, 2007.
- ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER J.R.; R.H., BADARÓ, R., DAVID, J.R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.** 53, 251–255, 1995.
- ASHFORD, D.A.; DAVID J.R.; FREIRE M.; DAVID R., SHERLOCK I., EULÁLIO M.C; SAMPAIO D.P; BADARO R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 59, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.** v 30, p. 1269-1281, 2000.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULALIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** v. 173, p. 758-761, 1996.

BADARÓ, R.; REED, S.G.; CARVALHO, E.M. Immunofluorescent antibody test in American leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am J Trop Med Hyg.** v. 32, p. 480-484, 1983.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 3a ed. Canada: Saunders Elsevier, cap. 73, 2006, 685-698 p.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 28, p. 329-337, 2006.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUROUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am J Trop Med Hyg.** v. 55, p. 273-277, 1996.

BIO-MANGUINHOS Dezembro de 2004a. Instituto de tecnologia em imunobiológicos. Imunofluorescência indireta para diagnóstico da leishmaniose visceral canina Disponível em: <BM_008_07bk ifi leish cao.indd>. Acesso em: 25 Nov. 2006.

BIO-MANGUINHOS Novembro de 2004b. Instituto de tecnologia em imunobiológicos. Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Disponível em: <BM_014_05bk eie leish cao.indd>. Acesso em: 25 Nov. 2006.

BRAGA, M.D.; COELHO, I.C.; POMPEU, M.M.; EVANS, T.G.; MACAULLIFE, I.T.; TEIXEIRA, M.J.; LIMA, J.W. [Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence]. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 31, p. 419-24, 1998.

BRASIL, MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 120p., 2006.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUSA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet Parasitol.** v. 76, p. 173-180, 1998.

CANÃVATE, C.; CRUZ, I.; FLORES, M. Leishmaniosis canina: diagnóstico. **Información Vet** 1a parte, p.28-32, 2005.

CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* e leishmaniose canina. **Rev Port Ciên Vet.** n.13, p. 121-141, 1999.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis **Vet Immunol Immunopathol.** 128 67-70, 2009.

CARVALHO NETA, A. V.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, F. L.; SANTOS, R. L. Pan-oftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. **CI Vet.** v. 66, p. 52-56, 2007.

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? **Microbiol.** V. 5 Nov; 873-882, 2007.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; 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*. **Vet Rec.** v. 141, p. 539-543, 1997.

CORTADA, V.M.; DOVAL, M.E.; SOUZA LIMA, M.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet Res Commun.** v. 28, p. 365-374, 2004.

COSTA, C.H.; GOMES, R.B.; SILVA, M.R.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MAGUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J Infect Dis.** v. 182, p. 997-1000, 2000.

COSTA, C.H.N.; PEREIRA, H.F.; PEREIRA, F.C.; TAVARES, J.P.; ARAÚJO, M.V.; GONÇALVES, M.JO. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis? **Trans Royal Soc Trop Med Hyg.** v. 93, p. 464, 1999.

COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 34, p. 223-228, 2001.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J Infect Dis.** v. 186, p. 1314-1320, 2002.

DA COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet J.** v.174, n.3, p.636-43, 2007.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 101(1): 117-118, February 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. v. 48, p. 151-156, 2006.

DAY, M.J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet Parasitol**. Jun 20;147 (1-2):2-8. 2007.

DEANE, L.M. Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v. 4, p. 198-212, 1962.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Phlebotominae). **Cad Saúde Pública**. v. 19, p. 1373-1380, 2003.

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, 1999.

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

DYE, C. The logic of Visceral Leishmaniasis control. **Am J Trop Med Hyg**. v. 55, p 125-130, 1996.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiol Infect**. v. 103, p. 647-656, 1993.

EVANS, T.G.; TEIXEIRA, M.J.; MCAULIFFE, I.T.; VASCONCELOS, I.A.B.; VASCONCELOS, A.W.; SOUSA, A.Q.; LIMA, J.W.O.; PEARSON, R.D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **J Infect Dis**. v. 166, p. 1124-1132, 1992.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. **I Fórum sobre leishmaniose visceral canina**, anais, Jaboticabal, 10 e 11 de março de 2006.

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). **Clin Vet**. v. 28, p. 36-44, 2000.

FERRER, L. **Clinical aspects of canine leishmaniasis**. In: KILLICK- KENDRICKS, R. (Ed.), *Canine Leishmaniasis: An Update*. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Hoeschst Roussel Vet., Barcelona, Spain, pp. 6–10, 1999.

FERRER, L.; RABANAL, R.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Res Vet Sci.** v. 44, p. 194–196, 1988.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **J Small Anim Pract.** V. 29, p. 381-388, 1988a.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet J.** v. 136, p. 514-516, 1995.

FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGU, M.; MANUBENS, J.; PORTÚS, M. Nested PCR for diagnostic of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Vet Parasitol.** v. 99, p. 105-111, 2001.

FOGLIA MANZILLO, V.; OLIVA, G.; PAGANO, A.; MANNA, L.; MAROLI, M.; GRADONI, L., Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Vet Parasitol.** Nov 30;142(1-2):142-5, 2006.

FRANÇA-SILVA, J.C.; BARATA, R.A.; COSTA, R.T.; MONTEIRO, E.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; VIEIRA, E.P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTES-DIAS, C.L.; DA SILVA, J.C.; DIAS, E.S. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Vet Parasitol.** Aug 10;131(3-4):213-20, 2005.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGU, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.** 137, 214–221, 2006.

FULGÊNCIO, G. O. **Prevalência de oftalmopatias em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte - Estudo clínico e Histopatológico.** 2006. 48f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

GALATI, E.A.; NUNES, V.L.; REGO JUNIOR, A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R. [Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil]. **Rev Saude Publ.** v. 31, p.378-390, 1997.

GARCIA, F.A.I.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnóstico da Leishmaniose visceral canina. **Clin Vet.** v. 62, p. 32-38, 2006.

GART, J.; BUCK, A.A. Comparison of a screening test and a reference test in epidemiological studies. II. Aprobabilistic model for the comparison of diagnostic methods. **Am J Epidemiol.** v. 83, p. 593-602, 1966.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 121, 23–33, 2008a.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci.** 84, 269–277, 2008b.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J Comp Pathol.** v. 135, p. 100-107, 2006.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol.** v. 7, Nº 3, 2004.

GRADONI, L. **Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe.** In: Proceedings International Canine Leishmaniasis Forum. CANINE LEISHMANIASIS: an update. Barcelona, Hoechst Roussel Veterinary, Barcelona. p. 32-39, 1999.

GRADONI, L. **The diagnosis of canine leishmaniasis.** In: p Proceedings International Canine Leishmaniasis . Sevilha: Forum. Sumène, p. 29-33, 2002.

GRIMALDI JR., G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev.** v. 6, p. 230-50, 1993.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis.** v. 2, p. 494-501, 2002.

HARITH, A.E.; KOLK, A.H.; KAGER, P.A.; LEEUWENBURG, J.; FABER, F.J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; LAARMAN, J.J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 81(4):603-6, 1987.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. **Bull Inst Pasteur.** v. 75. p. 5-102, 1978.

IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clin Vet.** v. 47, p. 42-48, 2003.

INIESTA, L.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B.; GÓMEZ, M.T.; PIARROUX, R.; GÁLLEGO, M.; ALUNDA, J.M.; PORTÚS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clin Diagn Lab Immunol.** Sep; 9(5):1137-41, 2002.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet Pathol.** Jan; 21(1):74-9, 1984.

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

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med Vet Entomol.** Apr;11(2):105-11, 1997.

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. **J Clin Microbiol.** 40: 210-215, 2002.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol.** 115, 135–145, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: E. **Fiocruz**, 368 p. 2003.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 81, p. 517, 1987.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L) chagasi* e sua correlação com transmissibilidade para o vetor.** 2008. 94f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

LERNER, E.A.; RIBEIRO, J.M.C.; NELSON, R.J.; LERNER, M.R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **J Biol Chem.** 266: 11234-6, 1991.

LESTOQUARD, F.; DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice ungueale dans la leishmaniose générale du chien. **Bull Soc Pathol Exot.** v. 31, p. 483-487, 1983.

LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y.M., Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol.** v. 137, p. 11-16, 2006.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALEZ, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zent Vet.** v.43, p.460-474, 1996.

MAGALHÃES, P.A.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; BATISTA, S.M.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P. Calazar na Zona do Rio Doce – Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v. 22, p. 197-202, 1980.

MAGUIRE, J.H., COSTA, C.H., LAMOUNIER, D., BECK, L.R., LOBITZ, B., DISTER, D., WOOD, B. Remote sensing and geographic information systems technology applied to infectious disease transmission of *Leishmania chagasi* in Teresina, Piaui, Brazil. In: Sixth Annual Meeting NIAID International Centers for Tropical Disease Research, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1997.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J. M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(12):2941-2947, 2008

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, L.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 82, p. 566-567, 1988.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Vet Parasitol.** v. 125, p. 251-62, 2004.

MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JÚNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Jul-Sep; 80 (3):349-57, 1985.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.; AMENDOEIRA, M.R., 1981. Leishmaniose Visceral (Calazar). **J Bras Med.** 41 (5): 61-84,1981.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil - Antropozoonoses emergentes e perspectivas de controle. **Cad Saúde Pública**. 10 Supl 2: 359-75, 1994.

MARZOCHI, M.C.A; MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses em Áreas Urbanas. **Rev Soc Bras Med Tropical**. v. 30, p. 162-164, 1997.

MAURICIO, I.L.; GAUNT, M.W.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitol**. v. 122, p. 393-403, 2001.

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitol**. 119, 237-246, 1999.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. - The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasit Today**. **16**: 188-189, 2000.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **J Clin Microbiol**. v. 43, p. 5515-5519, 2005.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 88, p. 491-493, 1994.

MONTEIRO P.S.; LACERDA; M.M.; ARIAS; J.R. Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 27 Supl 3: 67-72, 1994.

MOREIRA JR, E.D.; SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E.G.; CARVALHO, L.P. Assessment of an optimezed dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Vet Parasitol**. v. 122, p. 245-252, 2004.

MORENO, J; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**. v. 18, p. 399-405, 2002.

NUNES, V.L.B.; YAMAMOTO, Y.; REGO JR, F.A.; DORVAL, M. E. C.; GALATI, E. A. B.; OSHIRO, E. T.; RODRIGUES, M. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesq Vet Brasil**. v. 8, p. 17-21, 1988.

NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis **Trends in Immunol**. Vol.28 No.9, 2007.

OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE FILHO, J. D. ; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R.P. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cad Saúde Pública**. 19(4):933-944, jul-ago, 2003.

OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.; DE OLIVEIRA, O.; DE OLIVEIRA, G.R. ESPINDOLA, I.A.; DORVAL, M.E.; BRAZIL, R.P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 869-874, 2006.

OLIVEIRA, A.G.; MARASSÁ, A.M.; CONSALES, C.A., DORVAL, M.E.; FERNANDES, C.E.; DE OLIVEIRA, G.R.; BRAZIL R.P.; GALATI E.A. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop**. v. 107, p. 238-41, 2008.

OLIVEIRA, A.L.L.; PANIAGO, A.M.M.; DORVAL, M.E.C.; OSHIRO, E.T.; LEAL, C.R.; SANCHES, M.; CUNHA, R.V.; BÓIA, M.N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 39, p. 446-450, 2006.

PARABONI, C.; FRANCO, P.A.; MATTEI, D.R. Poliartrite por leishmaniose visceral canina: relato de caso. In: Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado, RS, Brasil, 19 a 22 de Outubro de 2008.
<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0176-1.pdf>, 2008.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E.G.; MELRO, M.C.; OLIVEIRA, G.G.; DOS SANTOS, W.L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. **Acta Trop**. v. 69, p.75-83, 1998.

PINELLI E.; GONZALO R.M.; BOOG C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol**. 25:1594-1600, 1995.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G. RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**. v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect Immun**. 67:237-243, 1999.

POCAI, E.A.; FROZZA, L.; HEADLEY S.A.; GRAÇA DL Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 28, p. 501-505, 1998.

PUMAROLA, M.; BREVICK, L.; BADIOLA, L.; VARGAS, A.; DOMINGO, M.; FERRER, L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **J Comp Pathol**. v. 105, p. 279, 1991.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS; SHAW, P.J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitol**. 122, 253-261, 2001.

QURESHI, A.A.; ASAHINA, A.; OHNUMA, M.; TAJIMA, M.; GRANSTEIN, R.D.; LERNER, E.A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **Am J Trop Med Hyg**. Jun; 54(6):665-71, 1996.

RAMOS-VARA, J.A. Review. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol**. Jul; 42(4):405-26, 2005.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREAOLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**. v.81, p.68-75, 2006a.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, AM.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**. v.3, n.112, p.102-16, 2006b.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R.J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C.R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **J Clin Microbiol**. Jul;40(7):2352-6, 2002.

RIBEIRO, V. M. Protocolos terapêuticos e controle da Leishmaniose visceral canina. **Ciência Animal**. v. 11, p. 13-18, 2001.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **J Pathol**. v. 141, p. 83-96, 1983.

RODRIGUES, C.A.T.; BATISTA, L.F.; TEIXEIRA, M.C.; PEREIRA, A.M.; SANTOS, P.O.; DE SÁ OLIVEIRA G.G.; DE FREITAS L.A.; VERAS, P.S. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally

challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Vet Parasitol.** Volume 143, Issues 3-4, 28 February, Pages 197-205, 2007.

RODRIGUES, C.A.T.; BATISTA, L.F; FILHO, R.S; SANTOS, C.D.A.S.; PINHEIRO, C.G.; ALMEIDA, T.F; FREITAS, L.A; VERAS, P.S. IFN-gamma expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. **Vet Immunol Immunopathol.** Feb 15;127(3-4):382-8. 2009.

RODRÍGUEZ-CORTÉS A.; OJEDA A.; LÓPEZ-FUERTES L.; TIMÓN M.; ALTET L.; SOLANO-GALLEGU L.; SÁNCHEZ-ROBERT E.; FRANCINO O.; ALBEROLA J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **Int J Parasitol.** May; 37(6):683-93, 2007.

ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by *Leishman-Donovan* and (2) Further notes on *Leishman's* bodies. **Brit Med J.** v.2, p.1261-1401, 1903.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose Visceral: Breve Revisão Sobre uma Zoonose Reemergente. **Clin Vet.** v. 11, p. 24-27, 1997.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.R.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med Vet Entomol.** 12: 315-17, 1998.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** Sep 6;88(1-2):21-30, 2002.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, Vol. 101(5): 577-579, Aug 2006.

SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI, G. Natural infection of the opossum *Didelphis marsupialis* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 79; p. 511, 1984.

SILVA, E.S.; OLIVEIRA, A.G.; CARVALHO, F.G; SILVA, E.A.; FRIOZI, E.; FARIAS, R. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: resumos do XXXVI Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, São Luís, MA p. 318, 2000.

SILVA, F.L.; TAFURI W.L.; OLIVEIRA M.R.; TAFURI W.G.L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A case report 2. **Arq Bras Med Vet Zootec.** vol. 54 no.4 Belo Horizonte July/Aug. 2002.

SINAN. Prefeitura Municipal de Campo Grande. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. **Serviço de Vigilância Epidemiológica**. Secretaria Municipal de Saúde, Campo Grande, MS. 2009.

SOARES, R.P.P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **An Acad Bras Ciências**.75(3): 301-33, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. **J Comp Pathol**. v. 130, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**. v. 90 p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; TROTTA, M.; ZAMPIERON, C.; RAZIA L.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M.; ROURA, X.; ALBEROLA, J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. **Vet Parasitol**. Jul 20;147 (3-4):315-9, 2007.

SOUZA, A.I.; JULIANO, R.S.; GOMES, T.S.; DINIZ, S.A.; BORGES, Á.M.; TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Vet Parasitol**. v. 129, p. 51-54, 2005.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral Leishmaniosis. In: CHARMICHAEL, L. Recent advances in canine infectious diseases. Ed.(Last Updated: 26-Sep-2001). www.ivis.org

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C.L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet Res**. v.38, n.4, Jul-Aug, p.547-64. 2007.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **J Infect Dis**. May 1;189 (9):1729-33, 2004.

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

TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Ver Mol Diagn**. v.3, n. 5, p. 657-667, 2003.

TEIXEIRA-NETO, R.G. **Estudo das relações entre imunidade humoral e carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum***

chagasi. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais. 2008.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am J Trop Med Hyg.** v 52, p. 287-292, 1995.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis, **Weekly Epidemiological Rec.** v. 77, p. 44, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. <http://www.who.int/leishmaniasis/en> 2007.

XAVIER, S.C **Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2002. 46f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; HADAD, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **Bmc Vet Res.** v. 2, p. 17-21, 2006.

ARTIGO 1

A ser submetido à revista Ciência Animal Brasileira.

ASPECTOS CLÍNICOS E DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM CAMPO GRANDE, MS

JOYCE KATIUCCIA MEDEIROS RAMOS¹; ELISA TERUYA OSHIRO²; MARIA ELIZABETH
CAVALHEIROS DORVAL², CÁSSIA REJANE LEAL³, FRANCISCO GONÇALVES DE CARVALHO⁴ E
ANA LUIZA ALVES ROSA OSÓRIO³

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMS, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil,

Bolsista CNPq. E-mail: joycekatiuccia@hotmail.com

2. Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMS

3. Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS

4. Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura Municipal de Campo Grande, MS, Brasil

RESUMO

A leishmaniose visceral no Brasil tem como agente etiológico *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*, sendo o cão considerado o principal reservatório doméstico. Os objetivos deste estudo foram verificar a associação entre métodos parasitológicos no diagnóstico da infecção por *Leishmania* em cães e identificar possíveis características clínicas regionais da leishmaniose visceral canina. Foram examinados 195 cães soropositivos do Centro de Controle de Zoonoses do município de Campo Grande-MS, agrupados em sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos. A confirmação parasitológica por meio do exame parasitológico direto em distensão medular e ou mielocultura ocorreu em 69,7% das amostras. Esses métodos apresentaram-se significativamente associados, com grau de concordância fraco (kappa 0,21 – 0,40). O quadro clínico de cães com leishmaniose visceral, em Campo Grande, MS, não difere de cães de outras regiões do país. Animais infectados apresentam um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a grave apresentação sintomática. A associação do exame parasitológico direto em distensão medular com a mielocultura, em cães soropositivos, aumenta as chances de diagnóstico preciso da leishmaniose visceral canina.

PALAVRAS-CHAVE: leishmaniose visceral canina, diagnóstico parasitológico, apresentação clínica.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis in Brazil is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, being the dog considered the main domestic reservoir. The objectives of this study were verify the association between parasitologicals approuches in the diagnosis of the infection by *Leishmania* in dogs and identify possible regional clinical characteristics of the canine visceral leishmaniasis. They were examined 195 seropositive dogs of the Zoonosis Control Center in Campo Grande-MS, grouped in symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic. The parasitological corroboration by means of the parasitological straight exam in distension medular and or myeloculture occurred in 69.7% of the samples. Those approaches presented itself significantly associated, with rank of weak agreement (kappa 0.21 – 0,40). The clinical chart of the dogs with visceral leishmaniasis in Campo Grande, MS, does not differ of dogs of other regions of the country. The infected animals presents a spectrum of clinical characteristics that varies of the apparent healthy state to grave symptomatic presentation. The association of the parasitological straight exam in medular distension with the myeloculture, in seropositive dogs, increased the chances of diagnosis of the canine visceral leishmaniasis.

KEY WORDS: canine visceral leishmaniasis, parasitological diagnostic, clinical presentation.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade de seres humanos e animais que tem como principal agente etiológico no Brasil, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* — *L. (L) infantum chagasi* (SHAW, 2006). O cão é considerado o principal reservatório urbano, pelo grande número de casos e intenso parasitismo cutâneo (ASHFORD, 1996; COSTA et al., 1999; DEANE; DEANE, 1955; GIUNCHETTI et al., 2006; RAMIRO et al., 2003). O vetor *Lutzomyia longipalpis* tem papel epidemiológico mais destacado entre as espécies de flebotomíneos (GALATI et al., 1997; TRAVI et al., 1996).

A infecção canina precede à doença humana (MARZOCHI et al., 1985), sendo esta relatada em 21 dos 26 Estados brasileiros (informação pessoal¹). A primeira confirmação parasitológica de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul ocorreu em 1980 no

¹GOMES, MLS. Mapa, distribuição de LV. Mensagem recebida por joycekatiuccia@hotmail.com em 20 abr. 2009.

1 município de Corumbá. Em Campo Grande, MS, os primeiros casos caninos surgiram em
2 1998 e os casos humanos autóctone começaram a ser notificados em 2002 (OLIVEIRA et al.,
3 2003; 2006), sendo o município, atualmente, classificado como área de transmissão intensa.
4 Até o mês de setembro de 2008, foram confirmados 91 casos humanos (SINAN, 2009) e
5 16.252 casos caninos (informação pessoal²).

6 O diagnóstico precoce, tanto em seres humanos quanto em cães, é necessário por se
7 tratar de uma doença que pode ser fatal para o ser humano, e pela necessidade da adoção de
8 medidas de controle específicas sobre o reservatório doméstico (ALVES; BEVILACQUA,
9 2004). Diante das dificuldades para o diagnóstico clínico na espécie canina, face à
10 apresentação, muitas vezes, assintomática da infecção, ou presença de sintomas plurívocos,
11 técnicas laboratoriais são indispensáveis para a obtenção do diagnóstico preciso.

12 Assim, os objetivos deste estudo foram verificar a associação entre métodos
13 parasitológicos no diagnóstico da infecção por *Leishmania* em cães e identificar possíveis
14 características clínicas regionais da LVC.

16 MATERIAL E MÉTODOS

18 *Animais.* Foram examinados 195 cães domésticos de ambos os sexos, de diferentes
19 raças e idades, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande,
20 durante os anos de 2007 e 2008. Esses animais foram apreendidos nas atividades de controle
21 da LVC, por apresentarem-se soropositivos no inquérito epidemiológico ou por demanda
22 espontânea da comunidade. Para o inquérito sorológico o CCZ utiliza os *kits* de ELISA e RIFI
23 (BioManguinhos/FIOCRUZ), conforme técnica padronizada pela FIOCRUZ.

24 Os dados de identificação dos animais, assim como a apresentação clínica foram
25 registrados em fichas individuais. Os cães foram agrupados de acordo com Mancianti et al.
26 (1988) em oligossintomáticos, sintomáticos e assintomáticos.

27 O projeto de pesquisa foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
28 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Parecer nº 133 de 14 de dezembro de 2006).

29 *Obtenção do sangue medular.* Após a contenção e anestesia dos animais com 25
30 mg/kg de tiopental sódico em cada animal e antisepsia local com álcool a 70%, foram
31 coletadas amostras de medula óssea na crista ilíaca ou no esterno. Essas coletas foram
32 realizadas utilizando seringa descartável de 20 mL e agulha 40x16mm, e em sistema fechado,

²BRAZUNA, J.C.M. Dados cães. Mensagem recebida por joycecatiuccia@hotmail.com em 19 nov. 2008.

com tubos *vacutainer* e agulha múltipla para coleta de sangue a vácuo, 18G (38X 1,25mm). A eutanásia foi realizada conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação em concordância com a Resolução nº 714, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Exame parasitológico direto em distensão medular. Para a pesquisa de formas amastigotas foram confeccionados esfregaços delgados de sangue medular em triplicata, fixados pelo metanol, submetidos à coloração de Giemsa e examinados em microscópio de campo claro em lente de imersão (1000x).

Mielocultura. Para a pesquisa de formas promastigotas, 25 µL de sangue medular foram semeados em meio Novy, Nicolle e McNeal (NNN) com fase líquida meio Schneider's (pH 7.2), enriquecido com 20% de soro fetal bovino (LIMONCU et al., 1997). Os tubos foram mantidos em estufa, à temperatura de 24°C e examinados, entre lâmina e lamínula, em microscópio de campo claro (40x), semanalmente, por um período de 30 dias.

Análise estatística. A significância entre os desvios observados nos testes, parasitológico direto em distensão medular e mielocultura, foi analisada a partir da composição de tabela de contingência, pelo teste de χ^2 (1 gl, χ^2 crítico = 3,84, $p < 0,05$). O índice de concordância dos resultados obtidos entre as duas técnicas foi estimado utilizando o teste de Kappa (SACKETT, 1991).

RESULTADOS

Os 195 animais estudados (97 machos e 98 fêmeas) pertenciam às seguintes raças: Boxer (6,15%), Poodle (5,64%), Pit Bull (4,61%), Rottweiler (4,10%), Dachshunds (3,07%), Labrador (2,05%), Pinscher (1,54%), Cocker (1,54%), Pastor Alemão (1,54%), Fila Brasileiro (0,51%), Doberman (0,51%), Dogue Alemão (0,51%), Dálmata (0,51%), Chow chow (0,51%), Fox paulistinha (0,51%) e sem raça definida (SRD) (66,70%). A idade variou de 7 meses a 16 anos, com média de 3,7 anos. Quanto ao porte do animal, o mais frequente foi o médio (48,21%), seguido pelo pequeno (29,74%) e grande porte (22,05%).

A distribuição dos cães soropositivos para leishmaniose visceral, segundo a apresentação clínica, está representada na Figura 1. As principais manifestações clínicas observadas foram: linfadenomegalia, dermatite, alopecia, perda de peso, conjuntivite, hiperqueratose, onicogribose, esplenomegalia, úlcera, mucosa pálida e hepatomegalia. O número de vezes que cada sintoma se repetiu encontra-se na Figura 2 e as principais manifestações clínicas estão ilustradas na Figura 3.

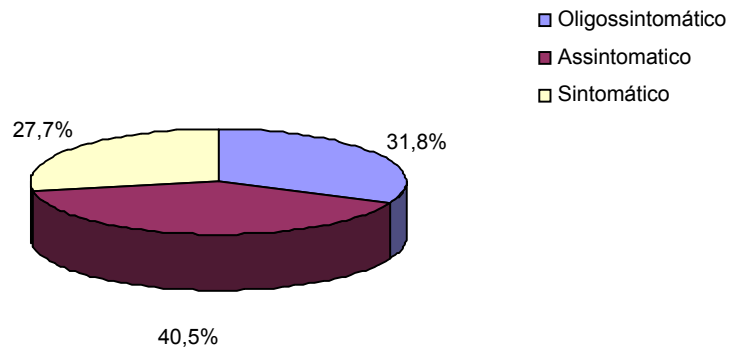


FIGURA 1. Distribuição dos cães soropositivos para leishmaniose visceral segundo a classificação clínica, em Campo Grande, MS. n=195.

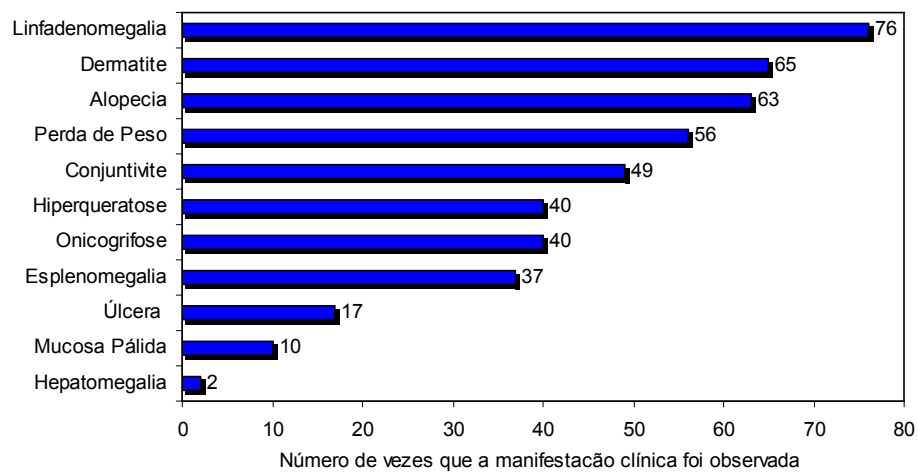


FIGURA 2. Principais manifestações clínicas observadas nos cães classificados como oligossintomáticos e sintomáticos. n=116.



FIGURA 3. Principais manifestações clínicas observadas em cães soropositivos para LVC: A. Linfadenomegalia; B. Dermatite esfoliativa furfurácea; C. Alopecia e erupções na pele; D. Caquexia; E. Alopecia periorbital e conjuntivite; F. Onicogrifose.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados dos exames parasitológicos de acordo com a classificação clínica, e na Figura 4 pode-se visualizar formas amastigotas em monócito de cão parasitado.

TABELA 1. Resultados dos exames parasitológicos em cães soropositivos para leishmaniose visceral, segundo a classificação clínica, Campo Grande, MS, 2007-2008.

<i>Amostrados</i>	<i>Parasitológico direto</i>		<i>Mielocultura</i>	
	Positivo		Positivo	
	N	%	N	%
Assintomático n=79	42	53,2	31	39,2
Oligossintomático n=62	41	66,1	27	43,5
Sintomático n=54	35	64,8	26	48,1
195	118	60,5	84	43,1

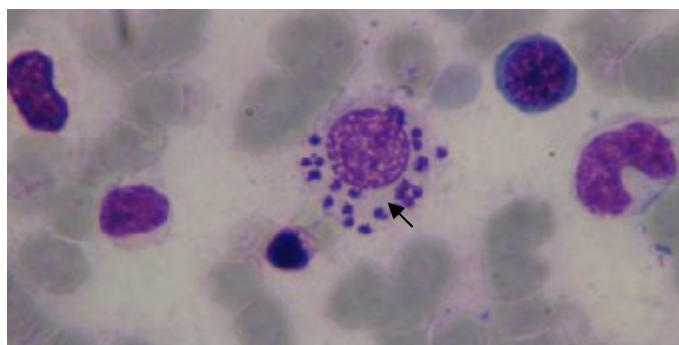


FIGURA 4. Formas amastigotas (seta) em monócito de sangue medular, coradas pelo método de Giemsa, para diagnóstico de cão soropositivo para leishmaniose visceral canina (1000 X).

A confirmação diagnóstica em cultivo ocorreu em média 21 dias após a semeadura. Das 195 amostras cultivadas, 88 permaneceram negativas durante o período de 30 dias de observação; e 23 foram inviabilizadas por causa de contaminação por bactérias e ou fungos.

A associação dos resultados parasitológicos está apresentada na Tabela 2.

TABELA 2. Associação dos resultados da mielocultura com o exame parasitológico direto em distensão medular no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos de Campo Grande, MS.

<i>Parasitológico Direto</i>	<i>Mielocultura</i>			
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	66	52	118
	Negativo	18	59	77
	Total	84	111	195
(1 gl. χ^2 crítico = 3.84, p<0.05)		χ^2 corrigido = 18.834 com p < 0.0001	kappa = 0.30	

(1 gl, χ^2 crítico = 3,84, $p < 0,05$)

χ^2 corrigido = 18,834 com $p < 0,0001$

kappa = 0,30

Do total de 195 cães soropositivos examinados, 136 (69,7%) revelaram positividade ao exame parasitológico direto em distensão medular e ou mielocultura. Dos 18 cães que foram identificados como positivos somente pela mielocultura, nove eram assintomáticos, quatro oligossintomáticos e cinco sintomáticos.

Os métodos apresentaram-se significativamente associados, com sensibilidade de 78.6% e especificidade de 53.2%. O grau de concordância corrigido foi fraco (kappa 0,21 – 0,40).

DISCUSSÃO

Neste estudo, não foi comprovada predisposição a LVC associada à idade, gênero ou raça, apesar de haver aparente predominância em animais SRD e de porte médio, assim como em outras áreas endêmicas (AGUIAR et al., 2007; FRANÇA-SILVA et al., 2003).

Os animais assintomáticos representaram 40,5% da população estudada, o que corrobora os achados de Feitosa et al. (2000) e Noli (1999), que referem que a forma assintomática da LVC representa 20% a 40% dos animais soropositivos. Cabe ressaltar que ao exame parasitológico da pele, índice de parasitismo de 62,1% são encontrados em animais assintomáticos, tornando-os importantes elementos na cadeia epidemiológica da parasitose (TRAVI et al., 2001; VERÇOSA et al., 2008).

A forma sintomática esteve presente em 27,7% dos animais, semelhante a outros registros que referem essa forma como debilitante e crônica, representando 25% dos cães soropositivos em áreas de ocorrência da parasitose (CORTADA et al., 2004; FEITOSA et al., 2000; MARZOCHI et al., 1985; MOZOS et al., 1999; NOLI, 1999).

O perfil clínico observado nos cães examinados foi semelhante ao de outras populações de área endêmica para LVC, ressaltando-se as principais manifestações clínicas: linfadenomegalia, dermatite, alopecia, perda de peso, conjuntivite, hiperqueratose, onicogribose, esplenomegalia e úlcera. Entretanto, tais sintomas não podem ser usados como marcadores clínicos, por serem plurívocos (ABRANCHES et al., 1991; AGUIAR et al., 2007; BLAVIER et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; MOREIRA et al., 2007). Em vista disso, as técnicas laboratoriais tornam-se indispensáveis para a obtenção de um diagnóstico preciso (AGUIAR et al., 2007).

A positividade obtida por meio do exame parasitológico direto em distensão medular (60,5%), está de acordo com os estudos de Ferrer (1999) e Koutinas et al. (2001), os quais referem que a sensibilidade do método parasitológico direto varia de 50 a 83% quando as

amostras são de medula óssea, 30 a 85%, de linfonodo e quando se associa os tecidos, 71 a 91%.

Os métodos parasitológicos demonstraram maior frequência de positividade nos grupos com manifestações clínicas, provavelmente em consequência da resposta imune menos eficiente no controle do parasitismo nestes animais, facilitando sua detecção (PINELLI et al., 1994; 1999). Isso decorre do predomínio do perfil de resposta do tipo Th2, que predispõe ao desenvolvimento da doença severa e progressiva (FERRER et al., 1995; MORENO et al., 1999; PINELLI et al., 1994).

A confirmação parasitológica, incluindo exame parasitológico direto em distensão medular e mielocultura, ocorreu em 69,7% dos casos, resultado inferior a alguns estudos (BARROUIN-MELO et al., 2004; DOS-SANTOS et al., 2008), mas, atribuível ao grande número (79/195) de animais assintomáticos avaliados, nos quais pressupõem-se baixa parasitemia (TRAVI et al., 2001).

Os resultados de cães soropositivos sem confirmação parasitológica deste estudo são equivalentes a outros achados (CORTADA et al., 2004; DYE; VIDOR; DEREURE, 1993). De fato o sorodiagnóstico pode apresentar tanto resultados falso-positivos, pela ocorrência de reações cruzadas (DYE; VIDOR; DEREURE, 1993), quanto falso-negativos, como em cães infectados que ainda não produziram anticorpos ou nunca revelam soroconversão (DYE; VIDOR; DEREURE, 1993; QUINNELL et al., 2001). As reações cruzadas ocorrem pela existência de determinantes antigênicos e de proteínas comuns a parasitos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (ALVES; BEVILACQUA, 2004; COSTA et al., 1991; MOHAMMED et al., 1986; VEXENAT, et al., 1996). Embora não seja área endêmica para *T. cruzi*.

A concordância fraca (kappa 0,30) observada entre o exame parasitológico direto em distensão medular e a mielocultura deveu-se a positividade de 118 no primeiro teste e 84 no segundo. Cabe ressaltar, que embora o resultado da mielocultura tenha sido inferior, 18 amostras não diagnosticadas no exame parasitológico direto em distensão medular foram positivas na mielocultura, demonstrando assim a importância da associação de métodos como ferramenta para aumentar as chances de diagnóstico da LVC.

CONCLUSÃO

O quadro clínico de cães com leishmaniose visceral, em Campo Grande, MS, não difere daquele observado em cães de outras regiões do país, apresentam um espectro de

características clínicas que varia do aparente estado sadio a grave apresentação sintomática. A associação do exame parasitológico direto em distensão medular com a mielocultura, em cães soropositivos, aumenta as chances de diagnóstico preciso da LVC.

AGRADECIMENTOS; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do MS – FUNDECT, termo de outorga: 0117/06, Chamada nº 02/2005 – Universal.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 13, p. 537-550, 1991.

AGUIAR, P.H.P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D.V.V.; COSTA, R.L.G.; JULIÃO, F.S.; DOS SANTOS, W.L.C.; BARROUIN-MELO, S.M. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil **Rev Bras Saúde Prod An.** v.8, n.4, p. 283-294, out/dez, 2007.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad Saúde Pública.** v. 20, p. 259-265, 2004.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol.** v. 14, p. 523-532, 1996.

BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P.H.; DOS-SANTOS, W.L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 99, p. 195-197, 2004.

BIO-MANGUINHOS Dezembro de 2004a. Instituto de tecnologia em imunobiológicos. Imunofluorescência indireta para diagnóstico da leishmaniose visceral canina Disponível em: <BM_008_07bk ifi leish cao.indd>. Acesso em: 25 Nov. 2006.

BIO-MANGUINHOS Novembro de 2004b. Instituto de tecnologia em imunobiológicos. Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Disponível em: <BM_014_05bk eie leish cao.indd>. Acesso em: 25 Nov. 2006.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet J.** v. 162, p. 108-120, 2001.

- 1 CORTADA, V.M.; DOVAL, M.E.; SOUZA LIMA, M.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.;
- 2 ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA
- 3 DO VALLE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C.
- 4 Canine visceral leishmaniosis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet Res**
- 5 **Commun.** v. 28, p. 365-374, 2004.
- 6 COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK,
- 7 M.S.M.; MELO, M.N.; COSTA, R. T.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; MAYRINK, W.
- 8 Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos
- 9 epidemiológicos. **Rev Soc Bras de Med Trop.** 24:21-25, 1991.
- 10 COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; PEREIRA, F.C.; TAVARES, J.P.; ARAUJO, M.V.;
- 11 GONCALVES, M.J. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in
- 12 Brazil? **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 93, p. 464, 1999.
- 13 DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do
- 14 homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*,
- 15 em área endêmica de calazar no Ceará. **O Hospital.** v. 48, p. 61-76, 1955.
- 16 DOS-SANTOS, W.L.; JESUS, E.E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A.M.; SANTOS,
- 17 J.C.; BALEEIRO, C.O.; NASCIMENTO, E.G.; MOREIRA, E.D.; OLIVEIRA, G.G.;
- 18 PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Associations among immunological, parasitological and
- 19 clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific
- 20 antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet Immunol Immunopathol.** 123(3-4):251-9,
- 21 2008.
- 22 DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting
- 23 infection as well as disease. **Epidemiol Infect.** v. 103, p. 647-656, 1993.
- 24 FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de
- 25 cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **CI Vet.** v.
- 26 28, p. 2000.
- 27 FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick- Kendricks, R. (Ed.), Canine
- 28 Leishmaniasis: An Update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum.
- 29 Hoeschst Roussel Vet., Barcelona, Spain, pp. 6–10, 1999.
- 30 FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of
- 31 canine leishmaniasis. **Vet Rec.** v. 136, p. 514-516, 1995.
- 32 FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.;
- 33 DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.;
- 34 NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of
- 35 Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet Parasitol.** v. 111, p. 161-173,
- 36 2003.

- 1 GALATI, E.A.; NUNES, V.L.; REGO JUNIOR F.D.E.; A.; OSHIRO, E.T.; CHANG, M.R.
2 [Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato
3 Grosso do Sul, Brazil]. **Rev Saude Publica**. v. 31, p. 378-390, 1997.
- 4 GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-
5 OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B.
6 Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi*
7 burden in dermal inflammatory foci. **J Comp Pathol**. v. 135, p. 100-107, 2006.
- 8 KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.;
9 POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.;
10 PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with
11 allopurinol in canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**. 98, 247-261, 2001.
- 12 LIMONCU, M.E.; BALCIOGLU, I.C.; YERELI, K.; OZBEL, Y.; OZBILGIN, A. A new
13 experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. **J Clin**
14 **Microbiol**. v. 35, p. 2430-2431, 1997.
- 15 MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine
16 leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine
17 leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 82, p. 566-
18 567, 1988.
- 19 MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.;
20 GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO RDA, S.; SABROZA, P.C.; DE
21 SOUZA, M.A.; RANGEL JUNIOR, F.B.; et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de
22 Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-
23 1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 80, p. 349-357, 1985.
- 24 MOHAMMED, E.A.E.R; WRIGHT, E.P.; RAHMAN, A.M.B.; KOLK, A.; LAARMAN, J.J.;
25 PONDMAN, K.W. Serodiagnosis of sudanese visceral and mucosal leishmaniasis:
26 comparison of ELISA, immun- ofluorescence and indirect haemagglutination. **Trans R Soc**
27 **Med Hyg** 80: 271-274, 1986.
- 28 MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D.
29 Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of
30 leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet Parasitol**. v. 145, p. 245-252, 2007.
- 31 MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D.C.;
32 ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before,
33 and after, chemotherapy. **Vet Immunol Immunopathol**. v. 71, p. 181-195, 1999.
- 34 MOZOS, E.; PEREZ, J.; DAY, M.J.; LUCENA, R.; GINEL, P.J. Leishmaniosis and
35 generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study.
36 **J Comp Pathol**. v. 120, p. 257-268, 1999.

- 1 NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**. v. 9, p. 16-24, 1999.
- 2 OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE FILHO, J. D. ; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R.P. Estudo de
3 flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) na zona urbana da Cidade de Campo
4 Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. **Cad Saúde Pública**. 19(4):933-944, jul-ago,
5 2003.
- 6 OLIVEIRA, A.G.; GALATI, E.A.; DE OLIVEIRA, O.; DE OLIVEIRA, G.R. ESPINDOLA,
7 I.A.; DORVAL, M.E.; BRAZIL, R.P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:
8 Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo
9 Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 869-874,
10 2006.
- 11 PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL,
12 G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and
13 naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**. v. 62, p. 229-235, 1994.
- 14 PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E.J.
15 Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected
16 canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma
17 interferon production. **Infect Immun**. v. 67, p. 237-243, 1999.
- 18 QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.;
19 RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR,
20 serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitol**
21 122:253-261, 2001.
- 22 RAMIRO, M.J.; ZARATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.;
23 ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs
24 against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization
25 with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors
26 expressing LACK. **Vaccine**. v. 21, p. 2474-2484, 2003.
- 27 SACKETT, D. L. Clinical epidemiology, a basic science for clinical medicine. 2. ed. Boston:
28 Little, Brown. 441p.; 1991.
- 29 SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum*
30 *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo**
31 **Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 101(5): 577-579, August 2006.
- 32 SINAN. Prefeitura Municipal de Campo Grande. Coordenadoria de Vigilância em Saúde.
33 Secretaria Estadual de Saúde, Campo Grande, MS Serviço de Vigilância Epidemiológica;
34 2009.

- 1 TRAVI, B.L.; MONTOYA, J.; GALLEGGO, J.; JARAMILLO, C.; LLANO, R.; VELEZ, I.D.
2 Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in
3 northern Columbia. **J Med Entomol.** v. 33, p. 278-285, 1996.
- 4 TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral
5 leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and
6 infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg.** v. 64, p. 119-124, 2001
- 7 VERÇOSA, B.L.; LEMOS, C.M.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, S.M.; DE CARVALHO S.M.;
8 GOTO, H.; COSTA, F.A. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism
9 of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **Bmc Vet Res.** 4:45,
10 2008.
- 11 VEXENAT, A.D.C.; SANTANA J.M.; TEIXEIRA, A.R. Cross-reactivity of antibodies in
12 human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and
13 *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** May-Jun;38(3):177-85,
14 1996.

ARTIGO 2

A ser submetido à revista Ciência Animal Brasileira.

DIAGNÓSTICO IMUNOHISTOQUÍMICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

JOYCE KATIUCCIA MEDEIROS RAMOS¹, EURÍPEDES BATISTA GUIMARÃES², MARCEL LEKEVICIUS COSTARDI¹,
CRISTIANO MARCELO ESPINOLA CARVALHO³ E ANA LUIZA ALVES ROSA OSÓRIO²

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMS, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil, Bolsista CNPq. E-mail: joycekatiuccia@hotmail.com
2. Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil
3. Mestrado em Biotecnologia, UCDB, Campo Grande, MS, Brasil

RESUMO

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infatum chagasi*. Os sintomas da doença são variados, assim, a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro, ou o parasito em amostras de tecidos é necessário para confirmar o diagnóstico. Os objetivos deste estudo foram obter a frequência de positividade no diagnóstico de leishmaniose visceral canina por meio de diferentes métodos parasitológicos e verificar a associação entre o exame parasitológico direto em distensão medular e a imunohistoquímica de pele. Foram amostrados 100 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS, agrupados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. As metodologias de exame parasitológico direto em distensão medular e imunohistoquímica mostraram-se eficientes na confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania*, independente da manifestação clínica. A associação do exame por imunohistoquímica de pele e parasitológico direto em distensão medular, assim como, os diferentes diagnósticos parasitológicos realizados em paralelo, aumentam as chances de confirmação de diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

PALAVRAS-CHAVE: Imunohistoquímica, parasitológico direto, mielocultura, soro hiperimune, *Leishmania*.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. The clinical signs of the illness are varied, therefore the observation of antibodies anti-*Leishmania* in the serum or the parasite in tissue samples is necessary to confirm the diagnosis. The objectives of this study were to obtain the positive frequency in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by means of different parasitological methods and verify the association between the direct parasitological examinations in medullar distension and immunohistochemical of skin. Some 100 dogs originating from the Zoonosis Control Center in Campo Grande, MS, were sampled, grouped in asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic. The methodologies of direct parasitological exam in medullar distension and immunohistochemical showed themselves to be efficient in the parasitological corroboration of the infection by *Leishmania*, independent of the clinical manifestation. The association of the immunohistochemical examination of the skin and direct parasitological in medullar distension as well as the different parasitological diagnoses carried out in parallel, increase the chances of diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

KEY WORDS: Immunohistochemical, direct parasitological, myeloculture, hyperimmune serum, *Leishmania*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma protozoonose de seres humanos e animais que tem como principal agente etiológico no Brasil, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. O espectro clínico desta doença varia desde manifestações clínicas discretas até graves, que podem levar a óbito (AGUIAR et al., 2007; SHAW, 2006).

Os cães assumem usualmente a forma sistêmica da infecção, com apresentação clínica variável, desde aparente estado sadio às formas severas. De acordo com Mancianti et al. (1988) os cães podem ser agrupados como: assintomáticos, com ausência de sintomas; oligossintomáticos, com até três sintomas e sintomáticos, com mais de três sintomas. No entanto, a inespecificidade de sintomas clínicos faz com que a confirmação diagnóstica seja realizada por métodos complementares.

A comprovação da presença de parasitos na pele do cão é um dado clínico-epidemiológico importante, pois se sabe que essa espécie alberga o parasito em seu tegumento, sendo a principal fonte de infecção para o flebotomíneo, independentemente da manifestação clínica (TRAVI et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; XAVIER et al., 2006). Em função disto o diagnóstico confirmatório envolvendo amostra de pele é uma estratégia promissora.

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) baseia-se na detecção de antígenos “*in situ*” por meio da utilização de anticorpo (policlonal ou monoclonal) primário específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se depositam no local da reação antígeno-anticorpo, possibilitando sua visualização. Nas leishmanioses o diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com amastigotas (DINIZ et al., 2005; RAMOS-VARA, 2005; TAFURI et al., 2004).

Os objetivos deste estudo foram obter a frequência de positividade no diagnóstico de leishmaniose visceral canina por meio de diferentes métodos parasitológicos e verificar a associação entre o exame parasitológico direto em distensão medular e a imunohistoquímica de pele.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram avaliadas amostras de 100 cães domésticos de ambos os sexos, de diferentes raças e idades, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Campo Grande, durante os anos de 2007 a 2008. Esses animais foram apreendidos nas atividades de controle da LVC, por apresentarem-se soropositivos no inquérito epidemiológico ou por demanda espontânea da comunidade.

Os procedimentos deste estudo foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do sul (UFMS) (Parecer nº 133 de 14 de dezembro de 2006). Os testes diagnósticos foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMS.

Os dados de identificação dos animais, assim como a apresentação clínica foram registrados em ficha clínica individual. Os cães foram agrupados de acordo com Mancianti et al. (1988) em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos.

Obtenção do sangue medular. Após a contenção e anestesia do animal com 25 mg/kg de tiopental sódico e antissepsia local com álcool a 70%, foram coletadas amostras de medula óssea na crista ilíaca ou no esterno. Essas coletas foram realizadas utilizando tubos *vacutainer*

1 e agulha múltipla para coleta de sangue a vácuo, 18G (38X 1,25mm). A eutanásia foi
2 realizada conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação em
3 concordância com a Resolução nº 714, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

4 *Exame parasitológico direto em distensão medular.* Para a pesquisa de formas
5 amastigotas foram confeccionados esfregaços delgados de sangue medular, fixados pelo
6 metanol, submetidos à coloração de Giemsa e examinados em microscópio de campo claro
7 (aumento de 1000x).

8 *Imunohistoquímica (IHQ).* Após a eutanásia dos animais, realizada conforme
9 recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação, em concordância com a
10 Resolução nº 714, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, fragmentos de pele da ponta
11 de orelha foram coletados e fixados em formol a 10% tamponado, desidratados, clareados e
12 embebidos em parafina para cortes.

13 Para a realização da imunohistoquímica foi aplicada a técnica indireta estreptoavidina
14 biotina marcada (LSAB), utilizando-se do kit LSAB (DAKO, USA) e como anticorpo
15 primário, soro hiperimune de cão heterólogo infectado naturalmente por *Leishmania* sp., com
16 titulação > 1:40 (Tafuri et al., 2004).

17 As secções seriadas de 4 µm foram colocadas sob lâminas silanizadas e
18 sequencialmente desparafinadas e hidratadas. A preparação imunohistoquímica foi submetida
19 ao tratamento com solução comercial de recuperação antigênica por calor úmido 96°. em
20 banho Maria por 30 minutos (DAKO, USA). Após isso, para a inibição da peroxidase
21 endógena, as lâminas foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio a 3%, por 30
22 minutos à temperatura ambiente. Assim, as secções estavam preparadas para a incubação com
23 o anticorpo primário (título positivo 1/320 na reação de imunofluorescência indireta), diluído
24 1/100 por 24 h a 4°C, e com o anticorpo secundário conjugado com biotina por 30 minutos.
25 Na sequência, as secções foram incubadas com a enzima estreptoavidina-peroxidase por mais
26 30 minutos, seguida pela revelação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por mais 5-7
27 minutos e, finalmente, contra-coradas com hematoxilina, montadas utilizando-se Entellan®
28 (Merck) e analisadas microscopicamente. A positividade foi considerada pela observação de
29 marcações de coloração marrom, morfologicamente compatíveis com amastigotas em
30 aumento de 400x.

31 Secções de pele da ponta de orelha de um cão naturalmente infectado, com intenso
32 parasitismo (detectado tanto pelas colorações de hematoxilina-eosina como Giemsa) foram
33 utilizadas como controle positivo e negativo, este último, pela troca da incubação do anticorpo
34 primário por PBS (BOENISCH, 2001).

4 *Mielocultura*. Para a pesquisa de formas promastigotas, 25 µL de sangue medular
5 foram semeados em meio Nicolle, Novy e McNeal (NNN) com fase líquida meio Schneider's
6 (pH 7.2), enriquecido com 20% de soro fetal bovino (LIMONCU et al., 1997). Os tubos
7 foram mantidos em estufa, à temperatura de 24°C e examinados, entre lâmina e lamínula em
8 microscópio de campo claro (40x), semanalmente por um período de 30 dias.

9 *Análise estatística.* Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos métodos
10 diagnósticos empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos,
11 segundo a apresentação clínica. Posteriormente, a significância entre os desvios observados
12 nos métodos imunohistoquímica e exame parasitológico direto em distensão medular foi
13 analisada pelo teste de χ^2 (1 gl, χ^2 crítico = 3,84, p<0,05). O índice de concordância dos
14 resultados obtidos entre as duas técnicas foi estimado utilizando o teste de Kappa
15 (SACKETT, 1991), k<0,1, ausente; k=0,10 a 0,40, fraca; k=0,41 a 0,60, discreta; k=0,61 a
16 0,80, moderada; e k=0,81 a 1,00, substancial.

19

No Quadro estão registrados os resultados de todos os testes (exame parasitológico direto em distensão medular, imunohistoquímica, mielocultura e histológico) empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos, segundo a apresentação clínica. Na Tabela 1, a frequência desses dados. As formas amastigotas identificadas pela IHQ e HE estão apresentadas na Figura.

Assintomáticos					Oligossintomáticos					Sintomáticos				
Cão	Parasitológico direto	Cultivo	Histológico	Imuno hist oquímica	Cão	Parasitológico direto	Cultivo	Histológico	Imunohistoquímica	Cão	Parasitológico direto	Cultivo	Histológico	Imunohistoquímica
1.	-	+	-	-	37.	-	-	-	+	64.	-	-	+	+
2.	-	+	-	-	38.	-	-	+	+	65.	-	-	+	+
3.	-	+	-	-	39.	-	+	-	+	66.	-	-	+	+
4.	-	+	-	-	40.	-	+	+	+	67.	-	+	-	+
5.	-	+	-	-	41.	-	+	+	+	68.	-	+	-	+
6.	-	+	-	-	42.	+	-	-	-	69.	-	+	-	+
7.	-	-	-	+	43.	+	-	-	-	70.	-	+	+	+
8.	-	-	-	+	44.	+	-	-	-	71.	+	-	-	-
9.	-	-	-	+	45.	+	-	-	-	72.	+	+	-	-
10.	-	-	+	+	46.	+	+	-	-	73.	+	+	-	-
11.	-	+	-	+	47.	+	+	-	-	74.	+	+	-	-
12.	+	-	-	-	48.	+	-	-	+	75.	+	-	-	+
13.	+	-	-	-	49.	+	-	+	+	76.	+	-	-	+
14.	+	-	-	-	50.	+	+	-	+	77.	+	-	-	+
15.	+	+	-	-	51.	+	+	-	+	78.	+	+	-	+
16.	+	+	-	-	52.	+	+	-	+	79.	+	+	-	+
17.	+	+	-	-	53.	+	+	-	+	80.	+	+	-	+
18.	+	+	-	-	54.	+	+	-	+	81.	+	+	-	+
19.	+	-	-	+	55.	+	+	-	+	82.	+	+	-	+
20.	+	-	-	+	56.	+	+	-	+	83.	+	+	-	+
21.	+	-	-	+	57.	+	+	-	+	84.	+	+	-	+
22.	+	-	-	+	58.	+	+	-	+	85.	+	+	+	+
23.	+	-	+	+	59.	+	+	-	+	86.	+	+	+	+
24.	+	+	-	+	60.	+	+	+	+	87.	+	+	+	+
25.	+	+	-	+	61.	+	+	+	+	88.	+	+	+	+
26.	+	+	-	+	62.	+	+	+	+					
27.	+	+	-	+	63.	+	+	+	+					
28.	+	+	-	+										
29.	+	+	-	+										
30.	+	+	-	+										
31.	+	+	-	+										
32.	+	+	+	+										
33.	+	+	+	+										
34.	+	+	+	+										
35.	+	+	+	+										
36.	+	+	+	+										
36/44 (81,8%)					27/29 (93,1%)					25/27 (92,6%)				
Total : 88/100 (88%)														

QUADRO. Resultados positivos em pelo menos um dos métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos, segundo a apresentação clínica, Campo Grande, MS, 2007-2008.

TABELA 1. Resultados dos testes empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos, segundo a apresentação clínica, Campo Grande, MS, 2007-2008.

	Parasitológico direto	Imunohistoquímica	Mielocultura	Histológico
Assintomático n=44	25 (56,8%)	23 (52,3%)	24 (54,5%)	7 (15,9%)
Oligossintomático n=29	22 (75,8%)	21 (72,4%)	19 (65,5%)	8 (27,6%)
Sintomático n=27	18 (66,6%)	21 (77,8%)	18 (66,6%)	8 (29,6%)
Total=100	65	65	61	23

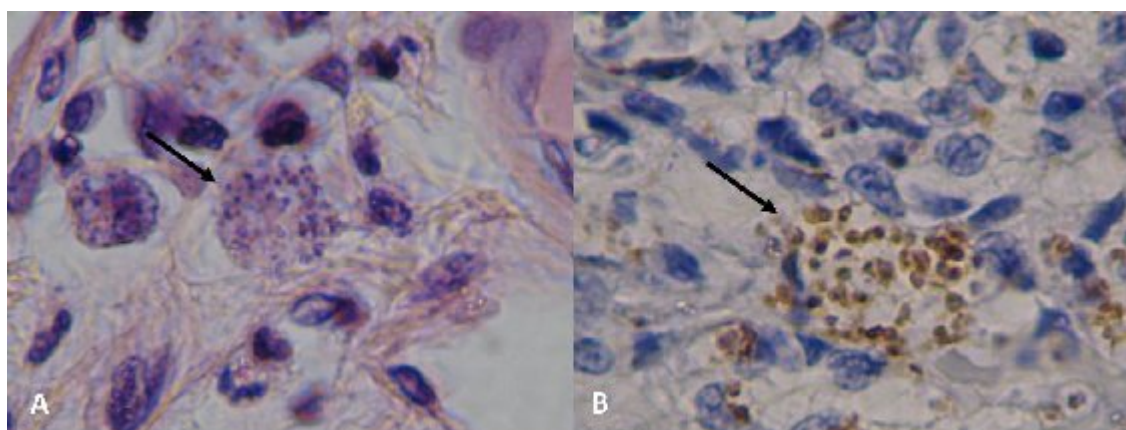


FIGURA. Formas amastigotas na pele obtidas de ponta de orelha de cão naturalmente infectado por *Leishmania* visualizadas pelas colorações de hematoxilina-eosina (A) e imunohistoquímica contra coradas com hematoxilina (B). Aumento de 400x.

Sessenta e cinco animais foram positivos para LV no exame parasitológico direto em distensão medular e desses, 48 foram detectados no exame de imunohistoquímica, que por sua vez identificou 65 positivos. A análise de associação desses resultados está registrada na Tabela 2.

TABELA 2. Associação dos resultados do exame parasitológico direto em distensão medular com a imunohistoquímica no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães soropositivos de Campo Grande, MS.

	Parasitológico direto		
	Positivo	Negativo	Total
Imunohistoquímica			
Positivo	48	17	65
Negativo	17	18	35
Total	65	35	100

(1 gl, χ^2 crítico = 3,84, $p < 0,05$) χ^2 corrigido = 6,39 com $p < 0,0011$ kappa = 0,25

Os métodos de imunohistoquímica e exame parasitológico direto em distensão medular apresentaram-se significativamente associados, com grau de concordância corrigido fraco (κ 0,25).

DISCUSSÃO

A IHQ, com a técnica indireta da estreptoavidina-biotina, possibilitou a marcação de formas amastigotas nas seções de pele obtidas de ponta de orelha, onde se observou imunomarcação assim como as observadas por Tafuri et al. (2004) e Diniz et al. (2005).

O protocolo utilizado neste estudo, além de identificar claramente estruturas compatíveis com amastigotas, detectando antígenos *in situ* por meio da utilização de soro hiperimune de cão heterólogo, permite diminuir os custos desta técnica, no que diz respeito ao elevado custo de anticorpos primários monoclonais ou policlonais. A utilização do anticorpo universal secundário do *kit* LSAB (DAKO, USA) anti-imunoglobulina de camundongo, de coelho e de cabra, apesar de não ser específico para anticorpos caninos, resultou em reação cruzada, justificando sua utilização, como observado em outros estudos (TAFURI et al., 2004).

A IHQ possibilita a realização de estudos retrospectivos com material incluído em blocos de parafina (BOENISCH, 2001; RAMOS-VARA et al., 2008). Além disso, essa técnica apresenta a vantagem de facilidade de manipulação do material a ser submetido ao exame, dispensando cuidados especiais — necessários para o isolamento em cultura —, o que facilita o trabalho de busca ativa de cães, quando o material é coletado e pode demorar horas para chegar ao laboratório.

A reação positiva pela IHQ se distinguiu da coloração de HE, marcando as formas amastigotas com coloração acastanhada (Figura) e desempenho diagnóstico superior (Quadro e Tabela 1). Outros autores demonstraram resultados similares, especialmente em linfonodos (FERRER; MOLLEDA; WALDER, 1988; FERRER, 1999; RAMOS; DUARTE; RAMOS, 1994). Amostras de pele de lesões cutâneas de paciente com LTA revelaram 16%, 20% e 64,5% de positividade, respectivamente, nos exames parasitológico direto, histológico e IHQ, demonstrando a maior sensibilidade desse último (SOTTO et al., 1989). Além disso, a IHQ abrevia o tempo do exame dos preparados, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados, mesmo nas amostras com poucas formas amastigotas (TAFURI et al., 2004). Em contraste, o baixo desempenho do exame histológico foi observado especialmente nas

amostras obtidas de cães assintomáticos (Tabela 1). Todas as amostras positivas em HE, também foram marcadas por IHQ.

A associação dos métodos imunohistoquímica e exame parasitológico direto em distensão medular, embora significativo, mostrou concordância fraca. Entretanto, essa associação incrementou o diagnóstico (17 animais), elevando a positividade de 65% para 82%.

Embora a utilização dos quatro testes diagnósticos tenha identificado positividade muito variável, entre 23% e 65%, a análise em conjunto da imunohistoquímica, exame parasitológico direto em distensão medular e mielocultura possibilitou a demonstração de parasitismo em 88% dos animais estudados. Incremento observado em seis cães do grupo assintomático (Quadro). Isso demonstra que a associação de técnicas aumenta as chances de diagnóstico.

A demonstração de parasitismo em 88% dos animais estudados por meio da associação de técnicas parasitológicas está próximo de parâmetros esperados, considerando que a amostragem foi composta de cães soropositivos segundo os testes de ELISA-Biomanguinhos (sensibilidade 94,54 %) e RIFI (sensibilidade 90 a 100%) (BIO-MANGUINHOS, 2004ab). Nas amostras avaliadas, 12/100 cães foram negativos. Esses animais tanto podem ser falsos positivos da triagem sorológica como falsos negativos nas técnicas parasitológicas empregadas.

É relevante destacar que os resultados obtidos na IHQ foram observados em fragmentos de ponta de orelha nos três grupos experimentais, mesmo no assintomático, de forma semelhante a Solano-Gallego et al. (2004) que identificaram formas amastigotas marcadas em pele íntegra tanto de animais sintomáticos como de assintomáticos. Assim, cães assintomáticos podem ter parasitismo cutâneo semelhante aos cães sintomáticos, sendo ambos infectivos aos flebotomíneos (GUARGA et al., 2000; TAFURI et al., 2001, 2004; TRAVI et al., 2001).

CONCLUSÃO

A associação do exame por imunohistoquímica de pele e parasitológico direto em distensão medular, assim como, os diferentes diagnósticos parasitológicos realizados em paralelo, aumentam as chances de confirmação de diagnóstico da LVC.

AGRADECIMENTOS: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do MS –

FUNDECT, Termo de Outorga: 0117/06, Chamada Nº 02/2005 e Termo de Outorga 0020/08, Chamada Nº 04/2006 – UNIVERSAL.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, P.H.P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; BITTENCOURT, D.V.V.; COSTA, R.L.G.; JULIÃO, F.S.; DOS SANTOS, W.L.C.; BARROUIN-MELO, S.M. Quadro clínico de cães Infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil **Rev Bras Saúde Prod An.** v.8, n.4, p. 283-294, out/dez, 2007.

BOENISCH, T. Handbook Immunochemical Staining Methods. 3 ed. California: Dako Corporation, 2001.

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

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick- Kendricks, R. (Ed.), Canine Leishmaniasis: An Update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Hoeschst Roussel Vet., Barcelona, Spain, pp. 6–10, 1999.

FERRER, L.; MOLLEDA, C. P.; WALDER, E. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal Small Animal Practice.** v. 29, p. 381-388, 1988.

GUARGA, J.L.; LUCIENTES, J.; PERIBANEZ, M.A.; MOLINA, R.; GRACIA, M.J.; CASTILLO, J.A. Experimental infection of phlebotomus perniciosus and determination of the natural infection rates of *Leishmania* in dogs. **Acta Tropica.** v. 77, p. 203-207, 2000.

LIMONCU, M.E.; BALCIOGLU, I.C.; YERELI, K.; OZBEL, Y.; OZBILGIN, A. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol.** v. 35, p. 2430-2431, 1997.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 82, p. 566-567, 1988.

RAMOS, C.C.; DUARTE, M.I.; RAMOS, A.M. Fatal visceral leishmaniasis associated with acquired immunodeficiency syndrome: report of a case with necropsy findings and immunohistochemical study]. **Rev Soc Bras Med Trop.** Oct-Dec;27(4):245-50. 1994.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol.** v. 42, p. 405-426, 2005.

RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E. J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V.E. ; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J Vet Diagn Invest.** 20:393–413, 2008.

SACKETT, D.L. Clinical epidemiology, a basic science for clinical medicine. 2. ed. Boston: Little, Brown 441p., 1991.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, Vol. 101(5): 577-579, August 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J Comp Pathol.** v. 130, p. 7-12, 2004.

SOTTO, M.N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; MATTA, V.L.R.; BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Trop.** 46: 121-130, 1989.

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

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

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg.** v. 64, p. 119-124, 2001.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; HADAD, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **Bmc Vet Res.** v. 2, p. 17-21, 2006.