UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania chagasi* EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO

Carla Daniela Dan De Nardo
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania chagasi* EM CÃES DO MUNICÍPIO SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO

Carla Daniela Dan De Nardo

Orientadora: Prof. Adjunto Mary Marcondes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Araçatuba – SP
2010

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

De Nardo, Carla Daniela Dan.

D391d Detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em cães do município de São José do Rio Preto, São Paulo. – Araçatuba : [s.n.], 2010

85 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010

Orientadora: Profa. Mary Marcondes

1. Leishmaniose visceral 2. ELISA 3. Imunocromatografia 4. Reação de imunofluorescência indireta 5. Serologia

CDD 636.0896

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Detecção de anticorpos Anti-Leishmania chagasi em cães do município de São José do Rio Preto, São Paulo

AUTOR: CARLA DANIELA DAN DE NARDO

ORIENTADOR: Dr.ª MARY MARCONDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES

Dr.ª MARY MARCONDES

DATA DA REALIZAÇÃO: 09 de agosto de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª MARY MARCONDES
- Orientadora -

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Seção de Pós-Graduação
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3224 E-mail: posgrad@foa.unesp.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLA DANIELA DAN DE NARDO – Nascida em São José do Rio Preto em 12 de setembro de 1977. Iniciou e concluiu o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Câmpus de Araçatuba (1997 – 2001). Realizou especialização (Residência Médica) na área de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais no Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, São José do Rio Preto, São Paulo (2003 - 2005). Concluiu o curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais no Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP e Quallitas em 2005. Desde 2006 atua como médica veterinária e docente das disciplinas de Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais, Semiologia Veterinária e Patologia Clínica no Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, São José do Rio Preto, São Paulo. Iniciou o Curso de Mestrado pela Universidade Estadual Paulista no ano de 2008 no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Unesp, Câmpus de Araçatuba, área de concentração: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica.

“Não basta ensinar ao homem uma modalidade científica, por que assim poderá tornar-se uma máquina utilizável e não uma personalidade harmoniosamente desenvolvida. É necessário que adquira uma compreensão de valores éticos, um sentimento daquilo que vale a pena ser vivido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

À minha amada família, João, Irene e Daniel pelas palavras e gestos de incentivo, otimismo e pelo exemplo de superação, determinação, força e garra. Por sempre acreditarem nos meus sonhos e por me fazerem acreditar que tudo seria possível. Obrigada por me proporcionarem as condições que me levaram a alcançar este momento.

Ao meu grande Amor, Juninho, por todo o seu carinho, cumplicidade, compreensão, incentivo e companheirismo ao longo desta jornada.

À tia Marlene, pelo apoio e eterna ajuda na busca de todos os meus desejos.

Ao senhor Didier, *in memoriam*, um amigo e ser humano mais que especial, amante dos animais e da educação, que sempre proferiu palavras de sabedoria e incentivo

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Adjunto Mary Marcondes

Pela oportunidade da realização deste trabalho tão importante na minha vida

Pelo exemplo de docente, médica veterinária, pesquisadora e ser humano que sempre me inspirou a trilhar os caminhos da clínica médica de pequenos animais

Pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente, sobretudo pela orientação, amizade, confiança, auxílio e dedicação durante todas as fases de realização deste projeto.

Minha eterna admiração e gratidão

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus pela minha vida e por estar sempre ao meu lado.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba, pela possibilidade da realização deste estudo.

Ao Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP, em especial ao Dr Halim Atique Neto, a MSc Tábata Salum Calile Atique e ao Dr Alan Peres de Melo pelo apoio, confiança, incentivo e sobretudo por me concederam a possibilidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro para realização deste projeto.

À professora Dra Márcia Dalastra Laurenti pela acolhida, ensinamentos e orientação fundamental e imprescindível na realização dos exames sorológicos deste projeto e por ter cedido o Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) para efetuação destes exames.

À Thaíse Yumie Tomokane e Ana Kelly do Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio essencial na realização dos exames sorológicos.

Ao doutorando Cláudio Nazaretian Rossi, pelo auxílio, colaboração mais que especial e importante, na realização das provas sorológicas deste trabalho. Muito obrigada por sua ajuda e dedicação.

À professora Adjunto Caris M. Nunes, pelo exemplo de pesquisadora e docente e pela disponibilidade em processar as amostras de PCR deste experimento.

Aos professores Dr Wager Luis Ferreira e Dra Gisele Fabrino Machado pelas correções e sugestões no Exame Geral de Qualificação.

À professora Dra Silvia Helena Venturolli Perri, pelo auxílio na realização da análise estatística dos dados deste trabalho.

À todos os funcionários do laboratório clínico do Hospital Veterinário “Dr Halim Atique”, Cleide, Edna, Rodrigo Stort, Tatiane Cruvinel pela ajuda importantíssima com as amostras do experimento e pela constante disposição em me auxiliarem a qualquer momento. A ajuda de vocês foi fundamental.

À amiga guerreira Karina Ferreira de Castro, por sua amizade e seus gestos em todas as situações de minha vida. Obrigada por seu apoio, otimismo, incentivo e companheirismo principalmente nos momentos mais difíceis da elaboração deste trabalho. A sua ajuda foi de extrema importância durante toda esta jornada.

Aos amigos do Hospital Veterinário “Dr Halim Atique”, Ana Silvia Dagnone, Lucas Bahdu Cossi, Alfredo Maia Filho, Alexandre Redson Soares da Silva, Talita F. B. Souza, pela amizade, pelo constante incentivo e pela ajuda imprescindível durante o período de minhas ausências.

Às queridas amigas da pós graduação, Ludmila S.V.Sobrinho, Ana Amélia D. Gomes e Eveline T. Braga, pelo apoio, amizade e ajuda essencial e indispensável durante todos os momentos do mestrado. Agradeço por toda ajuda valiosa.

Aos colegas de equipe, Juliana Peloi Vides, Tatiana Frate Schwardt, Fernando A. Rosa e João H. Artero, pelo auxílio e apoio durante a realização deste projeto.

Ao Estevan Guilherme pelos conselhos valiosos e palavras de otimismo.

Aos residentes do Hospital Veterinário “Dr Halim Atique” pela contribuição na obtenção das amostras deste experimento.

Aos enfermeiros do Hospital Veterinário “Dr Halim Atique” sempre dispostos ao auxílio na contenção dos cães para obtenção das amostras, em especial ao Daniel, pela busca de grande parte delas.

À querida Alessandra Cristina de Carvalho por suas orientações, amizade e por seu exemplo durante o meu período de residência. Obrigada pelo incentivo do início do mestrado.

Aos funcionários da Biblioteca e da Pós Graduação do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP- ARAÇATUBA), por estarem sempre disponíveis e acessíveis para resolução de dúvidas e problemas.

À todos que, infelizmente, não foram citados neste agradecimento por falha ou esquecimento, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... 16

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 18

2.1 Etiologia e epidemiologia..... 18

2.2 Patogênese..... 21

2.3 Sinais Clínicos..... 23

2.4 Diagnóstico..... 24

2.5 Medidas de Prevenção e Controle..... 29

3 MATERIAL E MÉTODO..... 34

3.1 Área de estudo..... 34

3.2 Animais..... 34

3.3 Colheita das Amostras..... 35

3.4 Delineamento experimental..... 35

3.5 Elisa indireto..... 36

3.6 Reação de imunofluorescência indireta..... 38

3.7 Imunocromatografia..... 39

3.8 Reação em cadeia pela polimerase..... 40

3.9 Análise estatística..... 41

4 RESULTADOS..... 42

5 DISCUSSÃO..... 50

6 CONCLUSÃO..... 56

7 REFERÊNCIAS..... 57

ANEXOS..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de uma população de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008 submetidos à sorologia para leishmaniose visceral canina quanto ao sexo, raça (com raça definida – CRD; sem raça definida – SRD), faixa etária, sintomas e moradia. Número absoluto e percentagem. (Araçatuba-SP, 2010).....**41**

Tabela 2 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio das técnicas de ELISA, imunocromatografia e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) de seis animais considerados positivos, provenientes de uma amostragem de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008. (Araçatuba-SP, 2010).....**44**

Tabela 3- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA indireto, em número absoluto e percentagem, de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008. (Araçatuba-SP, 2010).....**44**

Tabela 4- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia, em número absoluto e percentagem, de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008. (Araçatuba-SP, 2010).....**44**

Tabela 5- Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 138 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008. (Araçatuba-SP, 2010).....**45**

Tabela 6- Resultados da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para pesquisa de *Leishmania* sp em sangue periférico e linfonodo, e da avaliação sorológica por meio das técnicas de ELISA, imunocromatografia (ICR) e RIFI, de sete cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto no ano de 2008. (Araçatuba-SP, 2010).....**46**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Valores individuais das densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA indireto e corrigidas pelo modelo A/P; títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* obtidos por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e resultados da técnica de imunocromatografia (ICR) para o diagnóstico de leishmaniose visceral em 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto. (Araçatuba, 2010).....71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Classificação dos municípios para a vigilância e controle da leishmaniose visceral no Estado de São Paulo.....**30**

FIGURA 2- Mapa do Estado de São Paulo apresentando os municípios com transmissão canina e humana de leishmaniose visceral localizados nas proximidades de São José do Rio Preto. (Araçatuba, 2010).....**31**

FIGURA 3- Mapa relativo aos bairros do município de São José do Rio Preto dos quais eram provenientes 495 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" no ano de 2008, submetidos à sorologia para leishmaniose visceral canina. (Araçatuba, 2010).....**42**

FIGURA 4- Mapa dos municípios da região administrativa de São José do Rio Preto dos quais eram provenientes 89 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" no ano de 2008, submetidos à sorologia para leishmaniose visceral canina. (Araçatuba, 2010).....**43**

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leishmania chagasi* EM CÃES DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO

RESUMO - A leishmaniose visceral é uma zoonose causada por um protozoário do gênero Leishmania, cujo agente etiológico no Brasil é a *Leishmania chagasi*. O primeiro caso canino autóctone no Estado de São Paulo, Brasil, foi identificado em 1998 no município de Araçatuba. Desde então a doença vem se espalhando por todo o Estado. O objetivo do presente estudo foi determinar a freqüência de ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em amostras de soro de 584 cães de São José do Rio Preto, São Paulo, área não endêmica para a doença e que dista 160 Km de Araçatuba. A soroprevalência foi de 0,86% por ELISA e 0,17% por imunocromatografia. A reação de imunofluorescência indireta foi utilizada em 138 amostras e identificou 1,45% de soropositividade. O ELISA identificou cinco cães positivos, a RIFI dois e um cão foi identificado pela imunocromatografia. Um dos cães positivo pela RIFI havia sido vacinado para leishmaniose visceral. Dois cães que foram considerados positivos pelo ELISA indireto foram testados por PCR para detecção da presença de *Leishmania chagasi*, mas os resultados foram negativos, não confirmando a doença. Somente um cão foi soropositivo em todos os métodos. Ele apresentava sinais clínicos inespecíficos e foi adquirido pelo proprietário em uma área endêmica para a doença. O diagnóstico não pôde ser confirmado por exame parasitológico direto ou PCR porque o cão morreu antes dos resultados dos exames sorológicos. Os resultados obtidos na população do presente estudo permitem concluir que São José do Rio Preto deve ser, ainda, área não endêmica para leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: ELISA, imunocromatografia, leishmaniose visceral, reação de imunofluorescência indireta, sorologia

ANTIBODIES ANTI- *Leishmania chagasi* IN DOGS FROM THE CITY OF SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO

SUMMARY - Visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by a protozoa of the genus Leishmania, whose etiological agent in Brazil is *Leishmania chagasi*. The first canine autochthonous case of the disease in the São Paulo State, Brazil, was identified in 1998 in Araçatuba. Since then, the disease has spread to great part of the State. The aim of the present study was to determine the frequency of occurrence of anti-*Leishmania chagasi* antibodies in serum samples of 584 dogs from São José do Rio Preto, São Paulo, a non endemic area for the disease, 160km far from Araçatuba. Seroprevalence was 0,86% by ELISA and 0,17% by imunochromatography. IFAT, used to test 138 samples, identified 1,45% of seropositivity. ELISA identified five positive dogs, IFAT two, and immunochromatography one. One of the dogs that were considered positive by IFAT has been vaccinated for visceral leishmaniasis. Two dogs that were considered positive by indirect ELISA were tested by PCR for the presence of *leishmania chagasi*, but the results were negative, not confirming the disease. Only one dog was seropositive by all methods. He presented inespecific clinical signs and was acquired by his owner in an endemic area for the disease. The diagnoses could not be confirmed by direct parasitological test or PCR, because the dog has died before serologic results. The population results achieved in this study allow us to conclude that São José do Rio Preto city still must be a canine visceral leishmaniasis non-endemic area.

Keywords: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, immunochromatography visceral leishmaniasis, indirect immunofluorescent antibody test, serology

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose, causada por um protozoário do gênero Leishmania, cujo agente etiológico no Brasil é a *Leishmania chagasi*. Até a algumas décadas atrás a doença era considerada como rural e típica de ambientes silvestres, entretanto, hoje atinge grandes centros urbanos tais como Recife (PE), Natal (RN), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Brasília (DF), Belo Horizonte (MG), Rio de Janeiro (RJ), Três Lagoas (MS), Cuiabá (MT), Bauru (SP) e Araçatuba (SP). Dos 27 estados brasileiros, 21 já apresentam casos da doença.

O primeiro caso canino autóctone da doença no Estado de São Paulo foi identificado no município de Araçatuba, no ano de 1998. Desde então a enfermidade vem se disseminando pelo Estado, particularmente nos municípios próximos às Rodovias Marechal Rondon e Castelo Branco, chegando às proximidades da cidade de São Paulo, com casos caninos autóctones já identificados em Embu, Itapecerica da Serra e Cotia. Apesar dos esforços empenhados no sentido de conter a expansão da doença, verifica-se que, à medida que ocorre a adaptação do vetor nos municípios do Estado, a endemia vai se dispersando pelo território paulista.

Em São José do Rio Preto, município situado a aproximadamente 450km da capital, na região noroeste do Estado, não foram confirmados, até o presente momento, casos caninos ou humanos autóctones, nem a presença do vetor. No entanto, é considerado um município vulnerável por distar cerca de 90 km de Barbosa, área mais próxima com transmissão canina e humana, e 160 Km de Araçatuba, município que registra o maior número de casos caninos no Estado.

Entre janeiro de 2006 e setembro de 2007 foram atendidos no Hospital Veterinário “Dr Halim Atique” do Centro Universitário de Rio Preto quatro casos de leishmaniose visceral canina. No entanto, quando da avaliação clínica desses animais não foi averiguada sua procedência nem possíveis históricos de deslocamento para áreas endêmicas.

Partindo-se da hipótese de que pode estar ocorrendo transmissão da leishmaniose visceral canina no município de São José do Rio Preto é que o presente projeto de pesquisa teve por objetivo verificar a frequência de ocorrência de anticorpos anti–*Leishmania chagasi* em amostras séricas de cães provenientes do município e região administrativa de São José do Rio Preto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e epidemiologia

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é atualmente uma das principais enfermidades infecciosas que afetam tanto a população humana quanto a canina. Trata-se de uma doença cujos agentes etiológicos são protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, transmitidos, no Brasil, através da picada de dípteros do gênero *Lutzomyia* (BANETH, 2006; BRASIL, 2006; STRAUSS; BANETH, 2007).

As leishmanias fazem parte de dois grandes grupos, o que causa a leishmaniose visceral e o que causa a leishmaniose tegumentar. A espécie responsável pela forma visceral da doença no Brasil é a *Leishmania chagasi* (BRASIL, 2006), que faz parte, juntamente com a *L. donovani* e *L. infantum,* do complexo *Leishmania donovani.* Estas ultimas são os agentes etiológicos da leishmaniose visceral canina (LVC) no Velho Mundo. Devido às semelhanças moleculares e bioquímicas entre a *L. chagasi* e a *L. infantum*, alguns pesquisadores sugerem tratar-se da mesma espécie. Entretanto, em virtude das diferenças ecológicas e epidemiológicas, alguns estudos postulam que a *L. chagasi* seja uma espécie autóctone da América do Sul (GONTIJO; MELO, 2004; MACHADO et al., 2007b; MAURÍCIO et al., 2000).

As leishmanioses são doenças parasitárias endêmicas nos cinco continentes, em 88 países localizados em regiões tropicais e subtropicais, sendo que cerca de 350 milhões de indivíduos encontram-se em área de risco. A notificação da doença é obrigatória somente em 32 dos 88 países onde ela é prevalente. Assim, de dois milhões de novos casos que são estimados anualmente, somente 600 mil são oficialmente notificados, o que mostra uma elevada taxa de sub-notificação. Na América Latina existem 12 países com histórico da doença, sendo que 90% dos casos concentram-se no Brasil (BRASIL, 2006; WHO, 2010).

A leishmaniose visceral é considerada uma doença emergente e reemergente, tanto em áreas rurais como em áreas urbanas. Embora seja conhecida até hoje como uma doença tipicamente rural, vários surtos epidêmicos urbanos têm sido relatados. Os fatores relacionados a este fenômeno de urbanização da doença são resultantes das condições epidemiológicas favoráveis, principalmente em função da expansão das favelas com grande densidade populacional que possuem péssimas condições sanitárias, onde indivíduos e cães infectados, provenientes de áreas endêmicas, encontram sua opção de moradia nas grandes cidades. Outros fatores associados a este fenômeno são as mudanças ambientais e climáticas, redução dos investimentos em saúde e educação, falhas nas ações de controle e adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem (GONTIJO; MELO; 2004, LINDOSO; GOTO, 2006; MAIA - ELKHOURY et al., 2008).

No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora de *L. chagasi,* no entanto, a *Lutzomyia cruzi* também está implicada na transmissão no Estado do Mato Grosso do Sul. Outros possíveis vetores para esta enfermidade incluem a *L. intermedia* , *L. whitmani, L. migonei e L. firmatoi (*DANTAS-TORRES, 2009; LAINSON; RANGEL, 2005; SOUZA et al., 2003) .

Enquanto o vetor da doença, a *Lutzomyia longipalpis*, havia sido identificada em 41 municípios do Estado de São Paulo no ano de 2003, apenas quatro anos depois, 79 municípios já tinham a presença do flebótomo. Desta forma, existe uma grande preocupação em identificar o mais precocemente possível municípios com transmissão da doença, a fim de que sejam adotadas medidas de controle (BRASIL, 2006; CAMARGO-NEVES, 2007).

A *L. longipalpis* é também conhecida como mosquito palha e “asa dura. São insetos pequenos, medindo de um a três milímetros de comprimento, de coloração amarelada ou palha, que possuem o corpo revestido por pêlos e, em repouso, permanecem com suas asas eretas e semi abertas. Outros nomes ainda associados a este vetor são cangalhinha, tatuquira e birigui (BRASIL, 2006; SÃO PAULO, 2006). Esta espécie tem sua distribuição geográfica ampla

e em expansão, sendo encontrada em quatro das cinco regiões geográficas do Brasil; Nordeste, Norte, Sudeste e Centro Oeste (BRASIL, 2006).

Esses vetores desenvolvem-se em locais úmidos, sombreados e ricos em matéria orgânica. O ciclo biológico se processa no ambiente terrestre passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto, sendo que o desenvolvimento de ovo à fase adulta ocorre em aproximadamente 30 a 40 dias, dependendo da temperatura do ambiente. As formas adultas aladas abrigam-se nos locais de criadouros e nos ambientes peridomiciliares, principalmente em locais em que vivem os animais domésticos (SÃO PAULO, 2006).

Os flebotomíneos alimentam-se de seiva e néctar de plantas, frutas maduras e de secreções de outros insetos nomeados de afídeos. Além disto, as fêmeas obrigatoriamente hematófagas, possuem uma longevidade estimada, em média, de 20 dias, necessitando do sangue dos hospedeiros para a maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos. Os hospedeiros alimentares dos flebotomíneos incluem principalmente os mamíferos e aves, sendo que, em áreas urbanas, o cão parece ser a principal fonte de alimentação.Esses insetos possuem atividade hematófaga predominantemente noturna, iniciando-se uma hora após o crepúsculo (AFONSO; ALVES-PIRES, 2008; BRASIL, 2006; DANTAS-TORRES, 2009; DIAS et al., 2003; SÃO PAULO, 2006).

Os hospedeiros vertebrados desta enfermidade são representados pelos mamíferos domésticos, silvestres e também pelo homem. No ambiente doméstico, a espécie que possui maior importância epidemiológica é o cão (*Canis familiaris*) haja vista que em regiões endêmicas a prevalência de leishmaniose em cães é alta, podendo acometer de 20 a 40 % da população (BARATA et al., 2005; GONTIJO; MELO, 2004; IKEDA et al., 2003; MELO, 2004; WHO, 2010). Além disso, os cães assintomáticos, representados por um grande contingente da população, albergam parasitas na derme. Esses cães, juntamente com os sintomáticos, representam melhor fonte de infecção para o vetor do que o homem doente (MONTEIRO et al., 2005)

O papel de alguns animais domésticos como bovinos, eqüinos, suínos e aves como reservatórios da doença ainda não se encontra totalmente elucidado; contudo, sugere-se que esses animais domésticos sejam importantes para a manutenção da população de vetores (MOREIRA et al., 2003). Apesar de ser ainda desconhecida a função do gato na epidemiologia da doença, estudos relatam uma prevalência de 6,5% de infecção em felinos em áreas endêmicas (ROSSI, 2007).

Borges et al. (2009), verificaram que a presença de patos, roedores, pássaros e galinhas próximos às residências aumenta o risco de ocorrência de leishmaniose visceral em seres humanos em 4,18; 1,81; 1,57; 1,47 vezes, respectivamente. Os autores observaram também um risco de infecção maior que 1,8 vezes para moradores com um cão e 3,36 vezes para moradores com dois cães, quando comparados a indivíduos que não possuem esses animais.

No ambiente silvestre encontram-se algumas espécies com hábitos sinantrópicos que podem ser os responsáveis pela ligação entre os ciclos silvestres e domésticos, como a raposa (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e o gambá (*Didelphis albiventris*) (GONTIJO; MELO, 2004). Os gambás (*Didelphis albiventris*, *Didelphis marsupiallis*) são os hospedeiros silvestres que desempenham maior risco de infecção para os cães e seres humanos, por apresentarem ampla distribuição geográfica nas Américas e grande interesse pelo ambiente domiciliar. Outros animais sinantrópicos implicados na cadeia epidemiológica dessa enfermidade, comumente capturados dentro das habitações domésticas em vários municípios, são os roedores, sendo o *Rattus rattus* a principal espécie envolvida (DIAS et al., 2003; MISSAWA et al., 2008).

2.2 Patogênese

O ciclo do Calazar no homem e nos animais vertebrados apresenta duas fases, uma intracelular e outra extracelular. Na primeira, formas amastigotas parasitam o interior de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente os macrófagos, dividindo-se abundantemente no interior das

células parasitadas, provocando sua ruptura. Posteriormente, as formas amastigotas livres são novamente fagocitadas ou são ingeridas pelo vetor durante o seu repasto sangüíneo. No tubo digestório do vetor as formas amastigotas sofrem um processo de diferenciação que culmina, ao fim de seis a 10 dias, na produção de promastigotas metacíclicas, formas de leishmania infectante para o hospedeiro vertebrado (MACHADO et al., 2007b; STRAUSS; BANETH, 2007; TOMÁS; ROMÃO, 2008).

No momento do repasto sanguíneo o vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas, processo este facilitado por elementos anticoagulantes e vasodilatadores presentes em sua saliva. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas por células dendríticas e macrófagos, perdem o flagelo, e transformam-se em formas amastigotas. Estas constituem o estádio responsável pela disseminação da infecção no hospedeiro vertebrado. As formas amastigotas replicam-se no interior de células do sistema mononuclear fagocitário, rompem as células parasitadas, são fagocitadas por novas células e, dessa forma, disseminam-se através do sangue e da linfa para outras regiões do organismo tais como linfonodos, medula óssea, baço e fígado (STRAUSS; BANETH, 2007; TOMÁS; ROMÃO, 2008).

Durante a infecção as células apresentadoras de antígenos, pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário, estimularão uma resposta imune mediada por linfócitos T (CD4) auxiliares do Tipo 1 (Ta1), ou T auxiliares do Tipo 2 (Ta2). Quando as células Ta1 são ativadas, produzem citocinas que ativam os macrófagos os quais, por sua vez, estimulam a imunidade celular. A resposta mediada por células Ta1 caracteriza-se pela produção de IFN-γ, TNFα e interleucinas (IL-2, IL-3, IL-12). Em contraste, se houver ativação de linfócitos Ta2, ocorrerá proliferação de células B, produção de anticorpos e de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL10. Os animais que apresentam sinais clínicos em decorrência da doença desenvolvem uma resposta imunológica predominantemente humoral. A presença das imunoglobulinas acaba sendo deletéria e não protetora. As lesões podem ocorrer pela presença do parasita,

levando a reações inflamatórias granulomatosas; ou pela produção de imunocomplexos circulantes que se depositam em várias estruturas como os glomérulos, vasos sanguíneos e articulações (ALEXANDRE–PIRES; CORREIA, 2008; ALVES et al., 2009; FEITOSA et al., 2000; SANTOS–GOMES et al., 2008).

2.3 Sinais Clínicos

Cães com leishmaniose podem ou não desenvolver sintomas da doença, sendo que o aparecimento dos sintomas e sua gravidade dependerão da resposta imune do hospedeiro (ALBUQUERQUE et al., 2007; ALVES et al., 2009; BANETH, 2006; FEITOSA et al., 2000; MACHADO et al., 2007b). Em uma população infectada, o número de cães assintomáticos varia entre 50 e 85%. Estes, são considerados potencialmente infectantes para o vetor denotando, dessa forma, a importância dos inquéritos sorológicos caninos, particularmente em municípios vulneráveis, uma vez que os casos caninos precedem a ocorrência da doença no homem (ALMEIDA et al., 2009; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Os sintomas da enfermidade no cão são inespecíficos, observando-se anemia, atrofia muscular, perda progressiva de peso e caquexia. Verifica-se ainda linfoadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia resultante da proliferação de linfócitos B, histiócitos e macrófagos (ALMEIDA et al., 2005; BANETH, 2006; FEITOSA et al., 2000). Distúrbios hemostáticos como epistaxe, hematúria e coagulação intravascular disseminada têm sido associados à leishmaniose visceral (BANETH; AROCH, 2008; MORENO, 1999).

Aproximadamente 90% dos cães com leishmaniose visceral apresentam lesões tegumentares de diversas características e extensão. Nestes casos observam-se frequentemente distúrbio de ceratinização, ulcerações localizadas particularmente na cabeça, membros e sobre saliências ósseas e áreas de alopecia ou rarefação pilosa (ALBUQUERQUE et al., 2007; ALEXANDRE-

PIRES; CORREIA, 2008; BANETH, 2006; CAVALCANTI et al., 2005; FEITOSA et al., 2000).

Manifestações oculares também são vistas em cães com leishmaniose visceral sendo que a uveíte e a conjuntivite são as mais freqüentes (ALEXANDRE-PIRES; CORREIA, 2008; BRITO et al., 2006). Sinais clínicos relacionados ao sistema urinário, digestório, cardiorespiratório, nervoso e musculoesquelético também podem ser observados e podem ser decorrentes da deposição de imunocomplexos ou por ação direta do parasita. Em cães, a principal causa de morte é a insuficiência renal (ALEXANDRE-PIRES; CORREIA, 2008; BANETH, 2006; FEITOSA et al., 2000; STRAUSS; BANETH, 2007; TORRENT et al., 2005).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina pode ser realizado por vários métodos, sendo que a confiabilidade do mesmo é, muitas vezes, dependente da associação de técnicas (LEAL, 2009). O diagnóstico clínico da doença torna-se um desafio para o veterinário devido à grande variedade de sintomas e à grande percentagem de cães assintomáticos (BANETH; AROCH, 2008; GONTIJO; MELO, 2004; STRAUSS; BANETH., 2007).

As alterações laboratoriais encontradas no hemograma, na urinálise ou em determinações bioquímicas são inespecíficas. Algumas dessas incluem anemia, monocitose, hiperproteinemia, proteinúria, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (ALMEIDA et al., 2005; BANETH, 2006; IKEDA et al., 2003). Desta forma, torna-se difícil a identificação de animais infectados, uma vez que a doença pode ser confundida com muitas outras enfermidades. Outro aspecto importante é a possibilidade de existência de co-infecções, o que dificulta mais ainda o diagnóstico da leishmaniose visceral (LLERA et al., 2002).

O diagnóstico da LV pode ser baseado em exame parasitológico direto onde identificam-se formas amastigotas do parasita em esfregaços obtidos a partir de punção de medula óssea, linfonodos, baço ou fígado. A especificidade

deste método é 100% mas, dependendo do tempo despendido procurando o parasita, a sensibilidade diminui. A sensibilidade depende também da intensidade do parasitismo e do tipo de material biológico colhido. Se os parasitas são numerosos, a identificação não é difícil, contudo, em muitos casos, especialmente em animais assintomáticos, onde apenas poucas formas amastigotas estão presentes, podem ocorrer resultados falso negativos (STRAUSS; BANETH, 2007; BRASIL, 2006; LAURENTI, 2009; LEAL, 2009).

A pesquisa do parasita pode ser realizada também por meio de técnicas de imunoistoquímica ou imunocitoquímica, métodos altamente sensíveis e específicos para a detecção de *Leishmania sp* em tecidos. Pode-se utilizar qualquer tecido fixado e processado pelas técnicas usuais de microscopia, sendo que os mais utilizados são pele e órgãos linfóides (LAURENTI, 2009).

Os métodos sorológicos auxiliam no diagnóstico da LVC, pelo fato dos animais doentes desenvolverem basicamente uma resposta imune humoral. A soroconversão ocorre em aproximadamente três meses após a infecção e os títulos de IgG podem permanecem elevados por, pelo menos, dois anos. Desta forma, podem ocorrer falhas em detectar cães infectados no período pré-patente, cães que nunca farão soroconversão e cães que permanecem infectados mas tornam-se soronegativos (FERRER, 1995; LEONTIDES et al., 2002).

Os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, já que, na dependência da técnica e do antígeno empregados alteram-se a especificidade e a sensibilidade. As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas com outras enfermidades como erliquiose, babesiose, toxoplasmose, neosporose e principalmente com outros agentes da família Trypanosomatidae (LEAL, 2009; MELO, 2004; RIBEIRO, 1997; ROSÁRIO et al., 2005; UMEZAWA et al., 2001; ZANETTE, 2006)

As técnicas sorológicas recomendadas atualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil para o inquérito epidemiológico canino são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ELISA, sendo que este último é considerado como teste de escolha para inquéritos populacionais. O Ministério da

Saúde recomenda o teste de ELISA indireto para a triagem inicial dos cães suspeitos e a RIFI para a confirmação dos casos positivos (BRASIL, 2006).

A realização de inquéritos epidemiológicos caninos apresenta o intuito de controlar o reservatório canino em áreas extensas, detectar focos silenciosos da doença e delimitar regiões ou setores de maior prevalência, onde medidas de controle deverão ser executadas e se fazem mais necessárias (JULIÃO et al., 2007).

O ELISA é considerado um teste rápido, de fácil execução e leitura, permitindo o processamento de grande número de amostras simultaneamente. Apresenta alta sensibilidade e especificidade na dependência do tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e do protocolo experimental (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas). Com valores de sensibilidade variando entre 92% e 100%, e de especificidade entre 77% e 100% (LAURENTI et al., 2005; MANCIANTI et al., 1995; SANTA BRÍGIDA, 2004; ZANETTE, 2006).

Alguns estudos demonstraram maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LV quando da utilização de antígenos solúveis derivados de formas promastigotas cultivadas em um meio livre do proteínas (RYAN et al., 2002; SUNDAR; RAI, 2002), e antígenos recombinantes como rK-39 e o rK-26 (ROSÁRIO et al., 2005). A maior limitação da utilização do antígeno bruto é a ocorrência de reações cruzadas com outras doenças que frequentemente ocorrem em áreas endêmicas para leishmaniose visceral e que não são verificadas com o antígeno recombinante (ROSÁRIO et al., 2005).

Porrozzi et al. (2007), realizaram um estudo comparando a utilização da técnica de ELISA com vários antígenos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Para tanto utilizaram os antígenos recombinantes rK39, rK26 e rA2 e compararam estes antígenos com o antígeno bruto em uma população onde haviam cães infectados sintomáticos, assintomáticos e não infectados. Os resultados evidenciaram que as técnicas de ELISA utilizando o rK39 e o rK26 apresentaram alta sensibilidade para a detecção de cães sintomáticos (94% e 100%, respectivamente), seguido pelo ELISA antígeno bruto (88%) e rA2

(70%). Inversamente, o rA2 foi o mais sensível para cães assintomáticos (88%), seguido dos antígenos recombinantes rK39 e rK26 (ambos 66%) e do antígeno bruto (30%). O antígeno rA2 foi o mais específico de todos (98%) quando foram avaliadas reações cruzadas com *Leishmania braziliensis* e *Leptospira interrogans*. De acordo com os autores, os três antígenos recombinantes devem ser usados em paralelo para detectar um maior número de cães infectados.

Reações cruzadas entre anticorpos anti-*Leishmania* sp e outros agentes infecciosos tais como *Trypanossoma cruzi, Erlichia canis, Babesia canis, Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* já foram relatadas quando da utilização da técnica de ELISA (METTLER et al., 2005; OTRANTO et al., 2009; ZANETTE, 2006)

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utiliza como antígeno promastigotas de várias espécies de leishmanias, apresentando sensibilidade e especificidade elevadas (COSTA et al., 1991; LEAL, 2009; LUCIANO et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2008; ZANETTE, 2006). A RIFI é um teste muito utilizado em inquéritos epidemiológicos contudo, possui a desvantagem de que quando da análise de um grande número de amostras o tempo despendido pelo profissional para a leitura das lâminas é muito grande. Estudos pretéritos demonstraram sensibilidade variando entre 87,5 e 100% e especificidade entre 80 e 100% para a RIFI (ALVES; BEVILACQUA, 2004; COSTA et al.,1991; MACHADO et al., 2007a; METTLER et al., 2005; ZANETTE, 2006). Apesar da elevada especificidade da RIFI, Zanette (2006), avaliando amostras séricas de cães naturalmente infectados por *Trypanossoma cruzi* e*Toxoplasma gondii*, observou reações cruzadas quando da realização de RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania sp*.

Existem ainda testes comerciais de imunocromatografia desenvolvidos para seres humanos e que vem sendo utilizado para o diagnóstico da LV em cães. A maioria destes testes consiste de métodos que empregam anticorpos monoclonais anti-IgG de cão e antígenos de *Leishmania sp.* de diferentes fontes. Suas vantagens são simplicidade de uso e rápida resposta, cerca de 10

minutos, entretanto sua desvantagem é o alto custo (COSTA et al., 2003; LEMOS et al., 2008; ZANETTE, 2006). O teste imunocromatográfico apresenta sensibilidade variando entre 83 e 92,1% e especificidade entre 91,1 e 100% (COSTA et al., 2003; LEMOS et al., 2008; ZANETTE., 2006). Uma vantagem da utilização deste método com antígenos recombinantes é a ausência de reação cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania chagasi*, entretanto, também foram evidenciadas reações cruzadas com outros agentes infecciosos como *Ehrlichia canis*, *E canis* e *Babesia canis*, e por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninun*, e quando da ocorrência de coinfecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninun* (ZANETTE, 2006).

Métodos moleculares também são utilizados como instrumento de diagnóstico da leishmaniose visceral. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. No entanto, dependendo da fase em que se encontra a doença, diferentes tipos de amostras biológicas devem ser coletadas, tais como aspirados de órgãos linfóides, sangue e fragmentos de lesões cutâneas (BANETH; AROCH, 2008; GONTIJO; MELO, 2004).

Nunes et al. (2007), utilizando a técnica de PCR verificaram uma sensibilidade de 55% e especificidade de 66,3% considerando-se a RIFI como padrão. Os autores avaliaram a PCR em amostras de sangue circulante e concluíram que a mesma não se mostrou um bom método para triagem diagnóstica em populações devido à baixa sensibilidade e especificidade, quando comparada à RIFI. Já Pereira–Chioccola (2009), demonstrou que a PCR para *L.chagasi* apresenta alta especificidade e sensibilidade de 100% quando comparada aos métodos parasitológicos.

No entanto, de acordo com Assis et al. (2010), a PCR confirma resultados positivos que outras técnicas não detectam, elevando assim a positividade de cães de 60% pelos métodos sorológicos e parasitológicos para 97% quando se utiliza esta ferramenta diagnóstica. De acordo com os autores, a PCR

demonstrou ser o método mais sensível e preciso para o diagnóstico definitivo da LVC.

2.5 Medidas de Prevenção e Controle

Algumas medidas de prevenção para a LV são recomendadas pelo Ministério da Saúde e são dirigidas à população humana, canina e ao vetor. Medidas de proteção individual voltadas à população humana incluem: colocação de telas em portas e janelas com o objetivo de evitar a entrada de flebotomíneos, uso de mosquiteiro com malha fria, uso de repelentes e não exposição nos horários de atividade do vetor (crepúsculo e noite) em locais onde possam ser encontrados. Já as medidas para a população canina são destinadas ao controle da população errante através de rotina de captura de cães, e uso de telas de malha fina em canis individuais ou coletivos (BRASIL, 2006). Alguns trabalhos demonstram também a eficácia da proteção individual contra picadas de flebotomíneos por meio da utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (KILLICK-KENDRICK et al., 1997; CAMARGO-NEVES et al., 2004).

Existe no mercado duas vacinas contra leishmaniose visceral canina, registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No entanto, as mesmas não são recomendadas pelo Ministério da Saúde como ferramentas para o controle ou prevenção da leishmaniose visceral canina (BRASIL, 2009). Um dos problemas com a utilização destas em populações caninas de áreas endêmicas, é o fato de que pode haver reação cruzada entre anticorpos vacinais e anticorpos decorrentes de infecção natural, conforme salientado por Ikeda-Garcia (2009). Nestes casos, um animal vacinado com sorologia positiva deverá ser submetido à eutanásia, independente do atestado de vacinação, uma vez que a eficácia vacinal não é de 100% (PARRA et al., 2007).

As medidas de prevenção direcionadas ao vetor baseiam-se no manejo ambiental por meio de limpeza de quintais, terrenos e praças desfavorecendo o

estabelecimento de criadouros do vetor. Outros medidas indicadas pelo Ministério da Saúde incluem a limpeza urbana, eliminação e destino adequado de resíduos sólidos e orgânicos, eliminação de fonte de umidade e não permanência de animais domésticos dentro de casa (BRASIL, 2006).

Com referência às medidas de controle, o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral no Estado de São Paulo é voltado para a identificação e tratamento dos casos humanos, ações de vigilância epidemiológica e entomológica associadas ao controle de vetores e controle da população canina infectada (CAMARGO-NEVES, 2004; SÃO PAULO, 2006).

O controle da leishmaniose visceral canina em seres humanos é de responsabilidade do Sistema Único de Saúde (SUS). As Secretarias Municipais de Saúde, com o apoio das Secretarias de Estado de Saúde, têm a responsabilidade de assistir, suspeitar, acompanhar e/ou encaminhar para referência hospitalar os pacientes com leishmaniose visceral, oferecendo as condições necessárias para o diagnóstico e tratamento precoce (BRASIL, 2006).

As ações de vigilância entomológica objetivam conhecer a distribuição da *Lutzomya longipalpis* nos centros urbanos e aglomerados rurais, bem como detectar sua presença e dispersão. Já as ações de controle vetorial são realizadas através de atividades de saneamento ambiental naqueles municípios em que o vetor foi identificado. Orienta-se o controle ambiental por meio da retirada de matéria orgânica que possa favorecer a criação do vetor. O controle químico do vetor é realizado com a utilização de inseticidas de ação residual nas seguintes situações: em áreas com registro de primeiro caso autóctone de LV imediatamente após investigação entomológica; em áreas com transmissão intensa e moderada, se a curva de sazonalidade do vetor for conhecida; em áreas com surto de LV, uma vez avaliada e delimitada a área para o controle químico (BRASIL, 2006; CAMARGO-NEVES, 2004).

O controle da população canina consiste na eliminação e busca de cães infectados identificados pelo de exame parasitológico ou sorológico positivos (CAMARGO-NEVES, 2004). Dentre as estratégias de controle da doença, a

eliminação de cães é o aspecto mais controverso e o que gera mais polêmica. Diversos estudos têm demonstrado que a eliminação de cães no controle da doença em áreas endêmicas, têm apresentado falhas em reduzir o número de casos de leishmaniose visceral canina (MOREIRA et al., 2004; RIBEIRO, 2007). Os possíveis fatores relacionados à estas falhas incluem: a falta de métodos sorológicos adequados e suficientemente sensíveis e específicos para identificar precisamente todos os cães infectados; a reposição imediata de cães pelos proprietários e, na maioria das vezes, por filhotes os quais muitas vezes já estão infectados e que são mais susceptíveis a uma variedade de outras doenças infecciosas além da leishmaniose visceral canina e a presença de outros reservatórios que podem estar envolvidos na manutenção da infecção canina (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006, MOREIRA et al., 2004; NUNES et al., 2008).

Ainda, no contexto do programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral realizada-se também a classificação epidemiológica dos municípios (SÃO PAULO, 2006). Os municípios são classificados em silenciosos, em investigação e municípios com transmissão. Os primeiros são aqueles em que não existe confirmação de casos caninos ou humanos autóctones. Estes, possuem dois fatores de risco que devem ser considerados. O primeiro refere-se à receptividade, relacionada ou não à presença do vetor. O segundo, à vulnerabilidade, relacionada com a possibilidade de circulação de fontes de infecção. Este fator depende da proximidade e da importância do fluxo de transporte ou fluxo migratório com municípios com transmissão de LV canina ou humana. Sendo assim, os municípios silenciosos são subdivididos em; não receptíveis e não vulneráveis; não receptíveis e vulneráveis; receptivos e não vulneráveis e receptivos vulneráveis (BRASIL, 2006).

Os municípios em investigação são municípios silenciosos, independente de receptividade e vulnerabilidade, com notificação de caso humano ou canino clinicamente suspeito, aguardando conclusão de outros itens de investigação epidemiológica ou cão positivo para *Leishmania* sp no exame parasitológico direto ou reagente na sorologia para anticorpos anti-Leishmania e aguardando conclusão de outros itens de investigação epidemiológica. Finalmente, os municípios com transmissão podem ser aqueles somente com transmissão canina, ou aqueles com transmissão humana. A partir da classificação do município (Figura 1) são recomendadas ações referentes ao vetor, como levantamento entomológico, e referentes aos reservatórios, como inquérito amostral canino (SÃO PAULO, 2006).

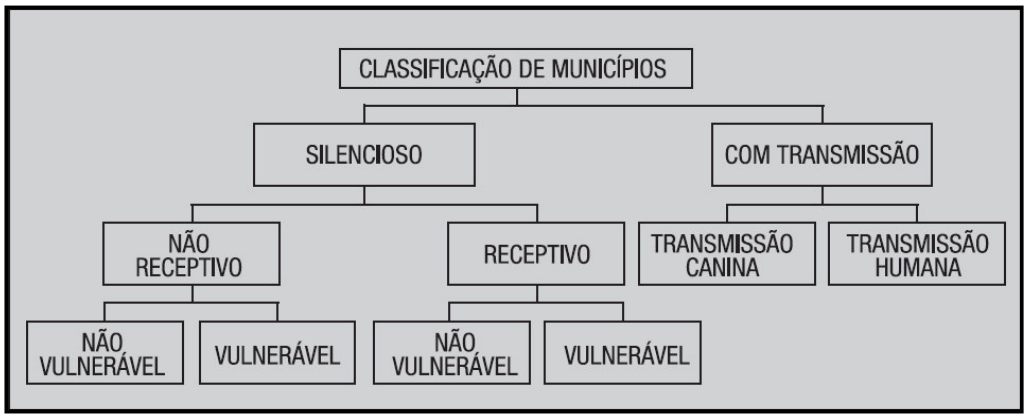

FIGURA 1- Classificação dos municípios para a vigilância e controle da leishmaniose visceral no Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2006).

Segundo esta classificação, São José do Rio Preto, no tocante à leishmaniose visceral canina, é considerado um munícípio silencioso, não receptivo e vulnerável, ou seja, um município em que não há confirmação de casos autóctones humanos e caninos, não há a presença do vetor, mas existe a possibilidade de circulação de fontes de infecção (SÃO PAULO, 2008).

Nas proximidades de São José do Rio Preto existem pelo menos 11 municípios (Araçatuba, Buritama, Barbosa, Avanhandava, Lins, Penápolis, Turiuba, Auriflama, Bilac, Birigui, Promissão) a uma distância de até 160 km em

que já foram confirmadas a transmissão canina e humana da leishmaniose visceral (Figura 2) (SÃO PAULO, 2008). São José do Rio Preto possui características de cidade Universitária, destacando-se pela presença de faculdades estaduais e particulares, além de centros médicos de referência, o que determina um intenso fluxo migratório de pessoas e conseqüentemente de animais na região (IBGE 2009).

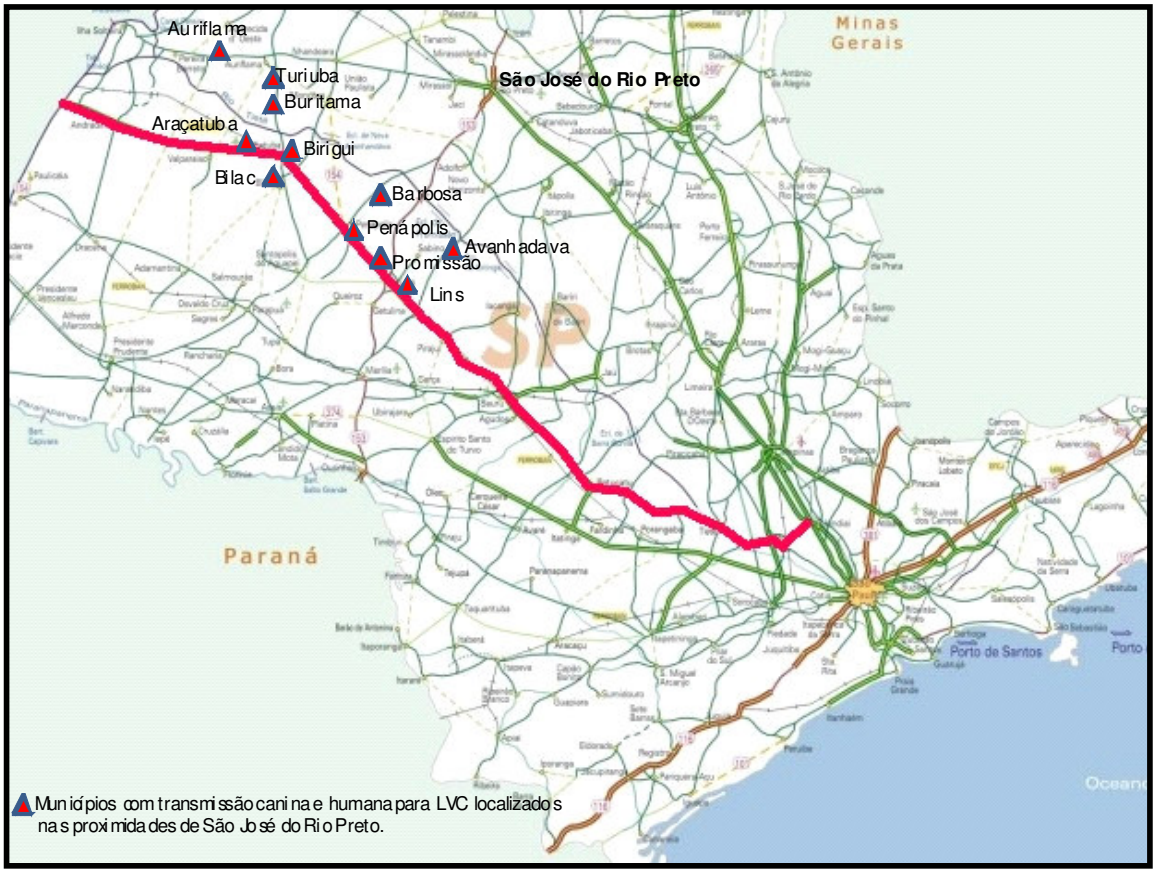

FIGURA 2- Mapa do Estado de São Paulo apresentando os municípios com transmissão canina e humana de leishmaniose visceral localizados nas proximidades de São José do Rio Preto. (Adaptado de: http:en.wikipedia.org/wiki/Rodovia_Marechal_C%C3%A2ndido_Rondon).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O município de São José do Rio Preto, localizado no noroeste do Estado de São Paulo, entre 49°22'44'' O e 20°49'12''S, apresenta uma área de 431 Km^2, com altitude de 489 metros. O clima é tropical com uma temperatura média anual de 25,3°C. Conta com uma população humana de 402.770 habitantes e canina de aproximadamente 51.551 cães. É considerada a décima maior cidade do Estado de São Paulo, sendo a maior cidade do noroeste do Estado, com economia baseada no comércio, prestação de serviços, indústrias diversas e agricultura (IBGE 2009; SAVANI et al., 2003).

3.2 Animais

Foram utilizados 584 cães, independente de sexo, raça ou idade, residentes no município de São José do Rio Preto e região administrativa, São Paulo, encaminhados para consultas ao Hospital Veterinário "Dr Halim Atique", do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Rio Preto, de janeiro a dezembro de 2008. Após a anamnese os animais eram submetidos a um exame físico, seguido da colheita de sangue para detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* pela técnica de ELISA indireto, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunocromatografia.

Os dados obtidos na resenha, anamnese e no exame físico de cada animal foram anotados em fichas individuais, onde também constavam informações quanto ao tipo de moradia (área urbana ou rural), município de nascimento e deslocamento para áreas endêmicas (com transmissão canina e humana) ou para áreas sob investigação (Anexo B).

.

3.3 Colheita das amostras

A colheita de sangue para realização das provas sorológicas foi realizada após assepsia local por punção da veia jugular. O sangue foi mantido à temperatura ambiente até a coagulação e retração visível do coágulo. Em seguida, a amostra sofreu centrifugação a 1620 g, durante 5 minutos, para aquisição do soro, que foi submetido a congelamento a -4°C até o momento do seu processamento.

Já a colheita de sangue para realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada após assepsia local por punção da veia jugular e acondicionada em tubos plásticos de polipropileno cônicos com anticoagulante do tipo citrato, sendo submetida posteriormente a congelamento a -4°C até o momento do seu processamento.

A punção biópsia aspirativa para a realização da PCR foi realizada nos linfonodos poplíteos com uma agulha hipodérmica 25x8mm acoplada a uma seringa de 10ml. O material obtido foi armazenado em tubos plásticos de polipropileno cônicos e submetido a congelamento a -4°C até o momento do seu processamento.

3.4 Delineamento experimental

Os soros dos 584 animais foram submetidos inicialmente ao teste de ELISA indireto utilizando um antígeno bruto. Nesta primeira avaliação foram encontrados 138 animais positivos. Por se tratar de animais provenientes de área não endêmica para a doença, os resultados foram considerados muito elevados. Sendo assim, optou-se por realizar RIFI nessas 138 amostras, o que resultou em apenas duas positivas. Por essa razão, os resultados do ELISA com antígeno bruto foram desconsiderados e as amostras foram novamente testadas, por ELISA indireto, agora utilizando um antígeno solúvel. Todas as amostras foram também submetidas à sorologia por imunocromatografia. Desta forma as 584 amostras séricas foram processadas por ELISA indireto com

antígeno solúvel e imunocromatografia, e 138 dessas amostras também foram analisadas por RIFI. Posteriormente, de sete animais que retornaram ao Hospital Veterinário, foram colhidos o sangue de todos e o linfonodo de cinco destes, para realização da técnica da PCR para pesquisa de *Leishmania* sp.

3.5 ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*

3.5.a Método de obtenção solúvel do antígeno de *Leishmania (Leishmania) chagasi* para ELISA

Foram isoladas em meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina, formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa46, proveniente de baço de hamster cronicamente infectado. Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 3.000 rpm (1620g) à 4ºC, em centrífuga refrigerada[1] durante 10 minutos e estocadas em freezer à -80ºC na forma de precipitado no fundo do tubo.

Para a preparação do antígeno, este precipitado contendo as formas promastigotas foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por três vezes consecutivas. Após nova centrifugação à 12.000 rpm (15294g) por 30 minutos à 4ºC em centrífuga refrigerada[1] e armazenou-se o sobrenadante à -80ºC. Utilizou-se então uma alíquota para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford [2] Após a dosagem de proteínas, foram feitas alíquotas para que se evitasse congelamentos e descongelamentos sucessivos do antígeno, evitando possível ação de proteases.

---

[1] Eppendorf, Modelo 5804R, Hamburg, Germany

[2] Bio-Rad Protein Assay, Hercules, USA

3.5.b Técnica de ELISA indireto

Após a titulação em bloco, padronizou-se as seguintes condições para o teste de ELISA indireto: as microplacas foram cobertas com antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa46, numa concentração de 10µg/mL em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, e incubadas por 18 horas a 4ºC. As placas foram bloqueadas com 200µL de solução salina tamponada acrescida de leite em pó desnatado a 10%[3] , e incubadas à 37ºC durante duas horas em câmara úmida. Adicionou-se 100µL por poço das amostras de soros dos animais controle positivo e controle negativo, e dos cães a serem testados, diluídas 1:400 em PBS-T e soro fetal bovino a 10%, e as placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

Foram adicionados 100 µL por poço do conjugado anti-IgG total de cão ligado à peroxidase[4] na diluição de 1:80000 em PBS-T. Após 45 minutos de incubação à 37ºC foram adicionados 100µL da solução de tetrametilbenzidina dihidroclorada (TMB)[5] com posterior incubação da placa por 30 minutos, ao abrigo de luz, em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50 µL de ácido sulfúrico 2N e a densidade óptica (D.O.) foi determinada em leitor de ELISA[6] utilizando-se filtro de 450 nm. Entre cada etapa as placas foram lavadas com solução salina tamponada contendo 0,05% de Twen 20 (PBS-T), por quatro vezes.

Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida dos soros em duplicata. Como controle positivo da reação utilizou-se soro de dois cães parasitologicamente positivo com elevados títulos de IgG ant*i-Leishmania chagasi* proveniente do município de Araçatuba, São Paulo, e como controle negativo, soro de cinco cães proveniente de área não endêmica para a doença

---

[3] Molico – Nestlé, São Paulo, Brasil
[4] A40-123P Bethyl, Montgomery, USA
[5] Código 55214, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
[6] Labsystems Multiskan EX - Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham

A determinação do ponto de corte (0,274) foi realizada durante o experimento com 20 amostras de soros dos cães provenientes de área não endêmica. Os valores de densidade óptica média dos animais foram corrigidos em função das médias dos controles positivo e negativo de cada placa, utilizando-se o modelo de A/P, onde:

$$A/P = \frac{\text{DO média da amostra} - \text{DO média do controle negativo}}{\text{DO média do controle positivo} - \text{DO média do controle negativo}}$$

3.6 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para realização da reação de imunofluorescência indireta para leishmaniose visceral, as lâminas foram inicialmente sensibilizadas adicionando-se 20µl da suspensão de promastigotas de *Leishmania chagasi*, cepa MHOM/BR/72/cepa46, em PBS em cada círculo. As lâminas foram então colocadas em estufa, para secagem, por 15 a 20 minutos. Realizou-se a diluição do soro na proporção de 1:40 das amostras a serem testadas e dos controles positivo e negativo. Em seguida, foram adicionados em cada círculo 20 µL das amostras de soro diluído a serem testadas, e soros sabidamente positivos e negativos foram utilizados em cada lâmina como controle positivo e negativo da reação. Como controle positivo foi utilizado um cão do município de Araçatuba, área endêmica para leishmaniose visceral, com exame parasitológico positivo. Como controle negativo foi utilizado cão de área não endêmica. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos em estufa à 37°C e, em seguida lavadas por imersão em PBS por três vezes.

Realizou-se então a diluição do anticorpo anti-IgG de cão fluoresceinado[7] na diluição de 1:100 em azul de Evans e 20µL desta solução foram adicionados em cada círculo das lâminas, as quais foram incubadas durante 30 minutos à 37ºC. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, pH 7,2 por 5 minutos, montadas com glicerina tamponada e recobertas por lamínula para leitura imediata em microscópio de fluorescência.

Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluições iguais a 1:40. As amostras de soros positivas nesta diluição foram novamente testadas para a determinação do título. A diluição em cada círculo da lâmina foi feita por adição de 20µL de diluições sucessivas dos soros testes positivos a partir de 1:80, duplicando-se a diluição até 1:160.

3.7 Imunocromatografia para leishmaniose visceral

Para a realização da técnica de imunocromatografia utilizou-se um Kit comercial[8] que detecta a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de animais. Em uma fita impregnada com o antígeno eram aplicados 20 µl do soro a ser testado e, em seguida, adicionava-se três gotas de tampão em um tubo plástico de polipropileno cônico onde a fita era imersa. A leitura foi realizada após 10 minutos. A fita apresenta uma membrana pré-coberta com o antígeno recombinante (rK39) na região da banda teste e anti-proteína A na região da banda controle. Durante o teste, a amostra de soro reage com o conjugado colorimétrico (conjugado proteína A coloidal de ouro) e a mistura então ascende através da membrana por capilaridade, reagindo com o antígeno e produzindo uma banda vermelha.

---

[7] Anti-dog IgG whole molecule , FITC conjugate- F- 7884 – Sigma, USA
[8] Kalazar Detect Animal Rapid Test – Inbios International, Inc. Seattle, WA.

A despeito da presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro, a mistura continua a migrar na membrana até a região da anti-proteína A, dando origem a uma nova banda vermelha nesta região. A presença desta linha indica um volume adequado da amostra de soro utilizada, um fluxo adequado na fita e a viabilidade dos reagentes. Desta forma, o teste foi considerado positivo quando se formaram duas faixas vermelhas e, negativo, quando aparecia somente a faixa controle. Os resultados foram determinados individualmente, de forma qualitativa (positivo ou negativo), conforme recomendação do fabricante.

3.8 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

3.8.a Extração de DNA de sangue

A extração de DNA de sangue foi realizada após lise (acetato de sódio 0,2M, duodecil sulfato de sódio 10%), digestão com proteinase K, extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol 100% (SAMBROOK et al., 1989).

3.8.b Extração de DNA de linfonodo

Nos casos em que se utilizou como material o linfonodo, todo o material da biópsia aspirativa foi utilizado para extração de DNA, que foi realizada com o Qiamp DNA Mini kit[9], conforme instruções do fabricante, para um volume final de 100 μL.

Após a obtenção do DNA das amostras de sangue e linfonodo, as mesmas foram quantificadas baseadas na espectofotometria, com o auxílio do aparelho NanoDrop®[10] .

---

[9] Qiamp DNA Mini kit, Qiagen®, 51306, Hilden, Germany
[10] NanoDrop® , ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, Wilmingtom, USA
[11] GeneAmp® , PCR System 9700, Applied Biosystems, Cingapura

3.8.c PCR convencional

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990) [13A (5´- GTC GGG GAG GGG CGT TCT –3´)] e [13B (5´- ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT –3´)] que resultam na amplificação de fragmento de 120 pares de base de cinetoplasto de *Leishmania* spp. (kDNA).

A reação foi realizada em tubos de polipropileno de 0,2mL contendo 10mM Tris-HCl, 200µM de desoxiribonucleosídeo trifosfato, 1,5mM $MgCl_2$, 10µM cada primer, 1U Taq DNA polimerase e 2µl de DNA (com aproximadamente 20ng/µl), com volume final de 25µl. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador[11] com desnaturação inicial de 95°C por 5min, 34 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação, 63°C por 45s para anelamento, 72°C por 30s para extensão, e 72°C por 5min para extensão final. As amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata.

3.9 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o programa "Statistical Analysis System" (SAS). O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar a concordância entre os métodos ELISA e imunocromatografia, ELISA e RIFI, RIFI e imunocromatografia. A interpretação da concordância entre os métodos a partir dos valores de Kappa, de acordo com Landis e Koch, (1977), encontra-se apresentada na tabela abaixo.

Kappa	**Concordância**
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

RESULTADOS

A amostragem estudada foi composta por 584 cães atendidos no Hospital Veterinário “Dr Halim Atique” no período de janeiro a dezembro de 2008. Destes, 309 (52,9%) eram fêmeas e 275 (47,1%) machos. No que tange a raça, 403 (69%) apresentam definição racial e 181 (31%) eram cães sem raça indefinida. Quanto a faixa etária, sessenta e um cães (10,5%) apresentavam entre quatro meses e um ano de idade, 117 (20%) de um a três anos, 158 (27%) de três a seis anos e 248 (42,5%) possuíam mais que seis anos de vida.

Da população estudada 501 (85,8%) animais foram encaminhados ao Hospital Veterinário por apresentarem sinais de alguma enfermidade e 83 (14,2%) foram levados para procedimentos cirúrgicos eletivos, vacinação, vermifugação e avaliação geral. Dos animais que apresentavam sinais de enfermidades, 188 (37,5%) possuíam quadro clínico compatível com doenças infecciosas e 313 (62,5%) apresentavam sinais de outras afecções, como problemas ortopédicos, urolitíases, gastroenterites medicamentosas e alimentares, discopatias e neoplasias entre outras. Com relação ao tipo de moradia deste animais, 501(85,8%) viviam em área urbana e 83 (14,2%) em área rural. As características avaliadas na população estudada encontram-se apresentados na Tabela 1.

Quanto ao município de origem a população era composta por 495 cães (84,8%) provenientes de São José do Rio Preto e 89 (15,2%) provenientes de 19 municípios próximos a São José do Rio Preto (Figura 4). Dentre estes encontravam-se Bady Bassit (25 cães), José Bonifácio (12), Guapiaçu (11), Mirassol (9), Monte Aprazível (4), Potirendaba (4), Cedral (3), Macaubal (3), Engenheiro Schimidt (3),Nova Granada (2), Catanduva (2), Nipoã (2), Ibirá (2), Nova Aliança (2), Cajubi (1), Bálsamo (1), Tanabi (1), Ipiguá (1), Urupês (1). A população de cães de São José do Rio Preto encontrava-se distribuída em 151 bairros distintos, evidenciados por meio da Figura 3.

Tabela 1-Distribuição de uma população de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008 submetidos à sorologia para leishmaniose visceral canina quanto ao sexo, raça (com raça definida – CRD; sem raça definida – SRD), faixa etária, sintomas e moradia. Número absoluto e percentagem (Araçatuba-SP, 2010)

Variável	Categoria	Número	Percentagem
Sexo	Macho	275	47,1%
	Fêmea	309	52,9%
Raça	CRD	403	69%
	SRD	181	31%
Faixa etária	4 meses a 1 ano	61	10,5%
	1 a 3 anos	117	20%
	3 a 6 anos	158	27%
	> 6 anos	248	42,5%
Sintomas	Assintomático	83	14,2%
	Sintomático	501	85,8%
Tipo sintomas	Infeccioso	188	37,5%
	Não infeccioso	313	62,5%
Moradia	Zona urbana	501	85,8%
	Zona rural	83	14,2%

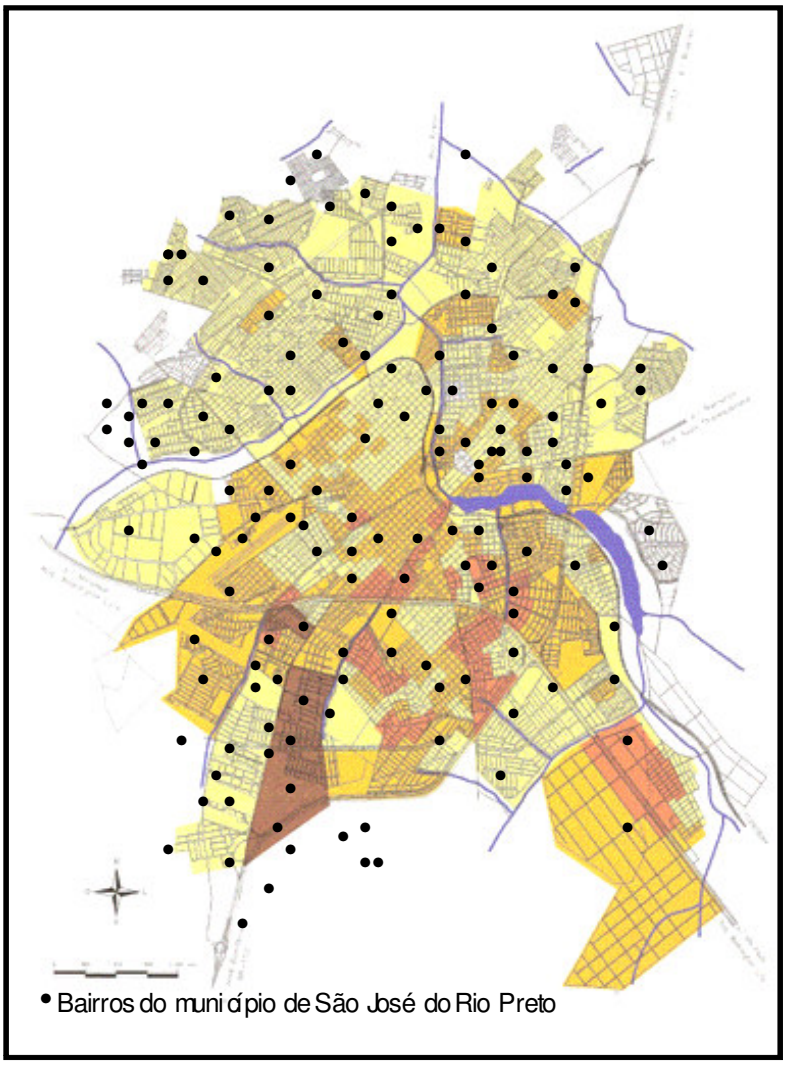

FIGURA 3 - Mapa relativo aos bairros do município de São José do Rio Preto dos quais eram provenientes 495 cães atendidos no Hospital Veterinário " Dr Halim Atique" no ano de 2008, submetidos à sorologia para leishmaniose visceral canina. (Araçatuba, 2010). (Fonte: www.ub.es/geocrit/sn/sn-24524.htm).

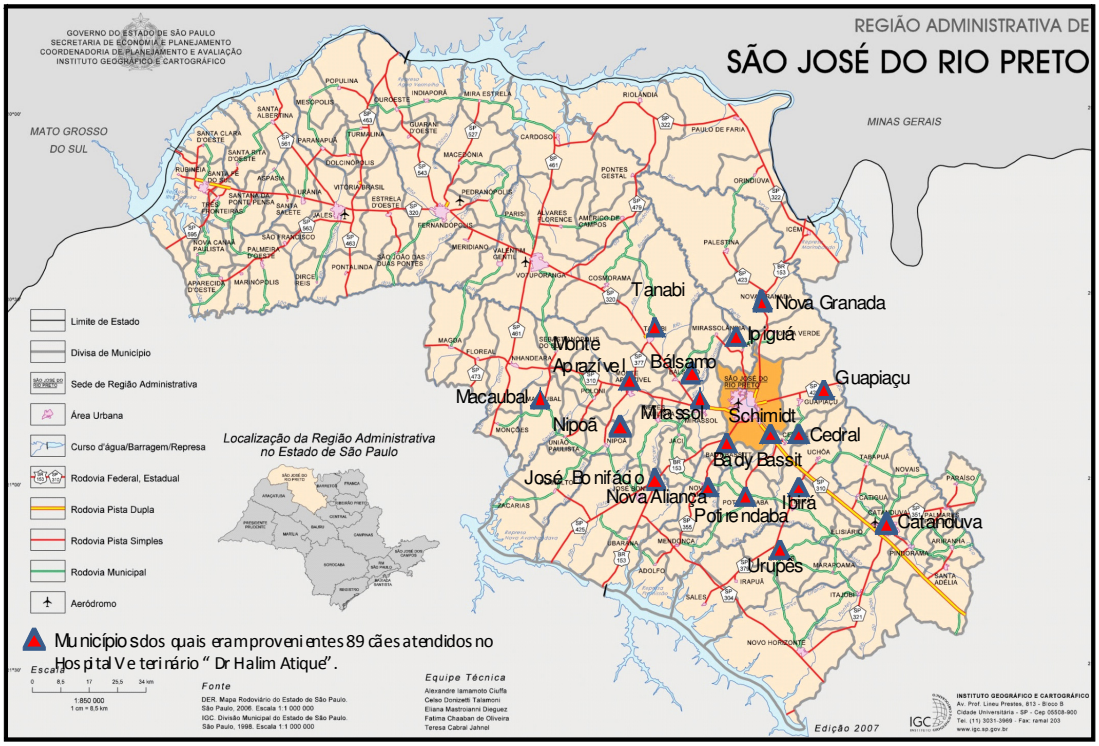

FIGURA 4 - Mapa dos municípios da região administrativa de São José do Rio Preto dos quais eram provenientes 89 cães atendidos no Hospital Veterinário " Dr Halim Atique" no ano de 2008, submetidos à sorologia para leishmaniose visceral canina. (Araçatuba, 2010) (Adaptado de: www.igc.sp.gov.br/mapasRas.htm).

Das 584 amostras testadas pela técnica de ELISA indireto e por imunocromatografia, cinco foram consideradas reagentes no primeiro teste e uma no segundo. A reação de imunofluorescência indireta evidenciou dois cães com títulos acima de 1:40, dos quais um havia sido submetido à vacinação para leishmaniose visceral. O número de animais reagentes e sua respectiva percentagem em cada uma das técnicas, bem como os resultados individuais dos seis animais considerados positivos por, pelo menos, uma das técnicas, encontram-se apresentados nas Tabelas 2 a 5. Os valores individuais das médias das absorbâncias (densidades ópticas) da técnica de ELISA indireto, bem como os resultados da RIFI e imunocromatografia encontram-se apresentados no Quadro 1 (Anexo A).

Tabela 2 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral por meio das técnicas de ELISA, imunocromatografia e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) de seis animais considerados positivos, provenientes de uma amostragem de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008 (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	ELISA	Imunocromatografia	RIFI
C 52	**Positivo**	Negativo	Negativo
C107	**Positivo**	Negativo	Negativo
C232	**Positivo**	Negativo	Negativo
C235	**Positivo**	Negativo	Negativo
C511	**Positivo**	**Positivo**	**Positivo**
C583	Negativo	Negativo	**Positivo**

Tabela 3 - Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pelo método de ELISA indireto, em número absoluto e percentagem, de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008 (Araçatuba-SP, 2010)

ELISA	Número de animais	Percentagem
Positivo	5	0,86%
Negativo	579	99,14%
Total	584	100%

Tabela 4 – Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunocromatografia, em número absoluto e percentagem, de 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008 (Araçatuba-SP, 2010)

Imunocromatografia	Número de animais	Percentagem
Positivo	1	0,17%
Negativo	583	99,83%
Total	584	100%

Tabela 5 – Resultados da sorologia para leishmaniose visceral pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em número absoluto e percentagem, de 138 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto, no ano de 2008 (Araçatuba-SP, 2010)

RIFI	Número de animais	Percentagem
Positivo	2	1,45%
Negativo	136	98,55%
Total	138	100%

As concordâncias entre as técnicas de ELISA e imunocromatografia, e de ELISA e RIFI foram consideradas sofríveis (K=0,3314 e k= 0,2706, respectivamente). Já a concordância entre RIFI e imunocromatografia foi considerada boa (k=0,6634).

Após a obtenção dos resultados sorológicos os proprietários de cães supostamente infectados foram contactados a fim de que retornassem ao Hospital Veterinário para a colheita de material e realização da técnica de PCR. No entanto, um cão (positivos nos três métodos) veio a óbito logo após a consulta inicial, outro animal era vacinado para leishmaniose visceral e o proprietário se recusou a trazê-lo e, dos outros cinco positivos, somente dois proprietários concordaram em submeter seus cães a novas investigações. Além destes, foram colhidas amostras séricas e de linfonodos de outros cinco animais para a realização da técnica de PCR. Os resultados da PCR para pesquisa de *Leishmania* sp encontram-se apresentados, de forma individual, na Tabela 6.

Tabela 6– Resultados da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para pesquisa de *Leishmania* sp em sangue periférico e linfonodo, e da avaliação sorológica por meio das técnicas de ELISA, imunocromatografia (ICR) e RIFI, de sete cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto no ano de 2008 (Araçatuba-SP, 2010)

Animal	PCR sangue	PCR linfonodo	ELISA	ICR	RIFI
C 107	Negativo	Negativo	**Positivo**	Negativo	Negativo
C 155	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C 235	Negativo	-----	**Positivo**	Negativo	Negativo
C 251	Negativo	------	Negativo	Negativo	Negativo
C 308	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C 426	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C 544	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Deste modo considerou-se somente um animal (C 511) positivo dentro da população estudada, já que apresentou resultado positivo nos três testes sorológicos. Tratava-se de um cão macho, sem raça definida, de um ano e seis meses, que vivia na zona urbana e que não apresentava histórico de deslocamento para outros municípios. O animal foi adquirido pelo proprietário quando apresentava um mês de idade no município de Valparaíso, região com transmissão canina e humana para LV. O cão foi encaminhado ao Hospital Veterinário com histórico de êmese e diarréia. Ao exame físico constatou-se a presença de desidratação severa, mucosas oculares e orais pálidas e discretamente ictéricas, hipertrofia de linfonodos submandibulares e poplíteos, caquexia, atrofia muscular, descamação cutânea generalizada e infestação por carrapatos.

Logo após o exame físico, colheu-se sangue para realização de hemograma, creatinina e sorologia para LV. O hemograma revelou uma anemia normocítica normocrômica com leucocitose (30.100/µL) por neutrofilia e monocitose, associada a linfopenia e trombocitopenia discreta (150.000/µL). O exame bioquímico demonstrou aumento da dosagem sérica de creatinina (3,62 mg/dl) indicando nefropatia. Promoveu-se a internação do cão e instituiu-se

tratamento com fluidoterapia à base de Ringer Lactato, aplicação intravenosa de ampicilina, aplicação subcutânea de ranitidina e metoclopramida. O animal permaneceu internado durante um dia, mas veio a óbito após 24 horas do atendimento inicial. Por esta razão não foi possível realizar exame parasitológico e PCR deste cão.

5 DISCUSSÃO

Com a endemia de leishmaniose visceral canina dispersando-se por grande parte do Estado de São Paulo, existe uma preocupação crescente em identificar possíveis municípios com transmissão da doença. O fato de terem sido atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" quatro cães infectados, entre janeiro de 2006 e setembro de 2007, fez com que houvesse a suspeita de uma possível transmissão da doença no município. Por esta razão foram colhidas amostras séricas de cães atendidos no mesmo Hospital durante o ano de 2008.

A população do presente estudo encontrava-se distribuída em vários bairros do município de São José do Rio Preto (Figura 3) e em 19 municípios da região administrativa de São José do Rio Preto (Figura 4). Deste modo todos os cães residiam em municípios silenciosos, não receptivos e vulneráveis para LVC. Apesar da amostragem populacional ter sido obtida toda no Hospital Veterinário, pode se verificar que os 495 cães do município não estavam concentrados em uma única área, ao contrário, encontravam-se dispersos em 151 bairros. A grande maioria da população (85,8%) habitava a área urbana, enquanto 14,2% era proveniente de zona rural próxima à cidade de São José do Rio Preto. Estes cães viviam, geralmente, em sítios ou chácaras convivendo livremente com outros animais domésticos. Já os cães provenientes de área urbana eram, em sua quase totalidade, domiciliados e sem livre acesso à rua.

A eleição dos métodos sorológicos avaliados neste estudo baseou-se no fato do ELISA e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) serem os métodos recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, sendo amplamente empregados no Brasil. Utilizou–se ainda o teste comercial de imunocromatografia por ser um teste que utiliza um antígeno recombinante (rK39) o que, supostamente, deve conferir uma maior especificidade ao teste. A soroprevalência de infecção por *Leishmania* sp na população estudada foi de 0,86% utilizando-se a técnica de ELISA (Tabela 3) e 0,17% por imunocromatografia (Tabela 4). A reação de

imunofluorescência indireta, realizada em apenas 138 cães, apresentou 1,45% de soropositividade (Tabela 5). Tais resultados se aproximam daqueles obtidos por Savani et al. (2003), que verificaram taxas de 0,6% em 2104 cães do mesmo município. Estes autores avaliaram cães domiciliados e cães encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São José do Rio Preto no período compreendido entre novembro de 1998 e junho de 2000, e evidenciaram positividade em 12 animais. Destes, foram realizados exame parasitológico direto de lesões cutâneas em apenas três e, somente em um foram evidenciadas formas amastigotas do parasita. No entanto, tratava-se de um cão proveniente de Belo Horizonte, área endêmica para a doença.

A primeira técnica sorológica utilizada para a pesquisa de anticorpos anti- *Leishmania chagasi* nesses animais foi o ELISA indireto com um antígeno bruto. No entanto, esta resultou em 138 amostras positivas, o que foi considerado um número muito elevado (23,6%) em se tratando de animais provenientes de um município silencioso. Tais resultados corroboram as observações de Zanette (2006) que afirmou que a sensibilidade e a especificidade da técnica de ELISA são influenciadas pelo tipo de antígeno empregado, sendo que, as técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade. Por este motivo, as 138 amostras positivas foram, então, testadas por reação de imunofluorescência indireta, que confirmou o resultado positivo em apenas dois cães. Sendo assim, optou-se por desconsiderar os resultados da primeira avaliação por ELISA com antígeno bruto e, procedeu-se nova avaliação utilizando um antígeno solúvel.

A técnica que evidenciou um maior número de cães sororeagentes no presente estudo foi o ELISA indireto com antígeno solúvel, por meio do qual foram identificados cinco animais positivos. Esta técnica apresentou uma concordância sofrível tanto em relação à RIFI quanto à imunocromatografia. Este fato concorda com os achados de Oliveira (2004), que observou 1,5% de soropositividade por meio da técnica de ELISA, e nenhum animal positivo por RIFI, quando da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp no município de Jaboticabal- SP, área não endêmica para a doença. Ao testar as amostras

destes cinco animais por RIFI e imunocromatografia, houve confirmação do resultado em apenas um cão (Tabela 2). Este, foi o único positivo por meio de imunocromatografia e foi um dos dois cães que apresentou títulos acima do ponto de corte pela RIFI. Estes resultados confirmam as observações de Carvalho et al. (2009), os quais sugerem que deve-se realizar a associação de dois métodos sorológicos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. De acordo com o Ministério da Saúde, o ELISA deve ser utilizado como exame de triagem para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, e a RIFI para a confirmação dos cães sororeagentes ao ELISA (SÃO PAULO, 2006).

Em função desses resultados, e por se tratar de animais provenientes de municípios considerados silenciosos não receptíveis e vulneráveis, optou-se por considerar infectado apenas o cão que reagiu positivamente aos três testes diagnósticos. O outro animal que apresentou títulos acima do ponto de corte na RIFI possuía histórico de vacinação contra leishmaniose visceral. Esse fato foi omitido pelo proprietário no momento da primeira consulta mas, após ser contactado para retornar ao Hospital Veterinário em função do resultado sorológico, o mesmo apresentou o atestado de vacinação do animal. O fato desse cão não apresentar reatividade por meio do ELISA indireto, e sim pela RIFI, discorda dos relatos de Ikeda-Garcia (2009), que acompanhou, por ELISA, a soroconversão de cães submetidos à vacinação contra leishmaniose visceral com a mesma vacina, comprovando a existência de reação cruzada entre os anticorpos vacinais e aqueles decorrentes de infecção.

Apesar do histórico de vacinação, o cão em questão poderia estar infectado, uma vez que a eficácia vacinal é da ordem de 76% a 80% como salientado por Parra et al. (2007). Para tentar identificar se a resposta imune era decorrente de infecção ou apenas uma resposta vacinal, tentou-se realizar PCR de órgãos linfóides neste cão, entretanto, não houve consentimento por parte do proprietário para a colheita das amostras. A técnica de PCR foi realizada em sete animais (Tabela 6), na tentativa de confirmar presença do parasita em algum cão, em especial em dois cães que também haviam sido

reagentes no ELISA indireto (cães 107 e 235), os quais, no entanto, não demonstraram positividade ao exame de PCR. A técnica da PCR é uma ferramenta diagnóstica com elevada sensibilidade, no entanto, dependendo da fase da doença, diferentes amostras biológicas devem ser coletadas para a pesquisa do parasita, conforme relataram Osman et al (1997). O cão número 107, positivo por ELISA, foi submetido à PCR de sangue e linfonodo, o que aumenta a sensibilidade do teste uma vez que, mesmo não havendo mais parasitemia, é comum o achado de parasitas em órgãos linfóides de animais infectados, conforme salientado por Feitosa et al (2000). Por outro lado, só foi possível realizar PCR no sangue do cão 235, uma vez que o proprietário não consentiu na realização de punção biópsia aspirativa de linfonodo.

A presença de densidades ópticas acima do ponto de corte quando da sorologia por ELISA elevadas em quatro cães, considerados negativos pelas outras técnicas utilizadas, pode ser devida à reações cruzadas com outros agentes infecciosos, tais como *Erlichia canis* e *Babesia canis*, como foi observado por Zanette et al. (2008b e 2008c), ao pesquisar anticorpos anti-*Leishmania chagasi* em amostras séricas de cães acometidos por erliquiose e com co-infecção por *E. canis* e *B. canis.* O escopo deste estudo não foi pesquisar a soroprevalência destes agentes infecciosos na mesma população de cães, entretanto, no Hospital Veterinário " Dr Halim Atique" é grande o número de cães sabidamente infectados por *E. canis* e *B. canis* [12].

Por outro lado, no presente estudo não parece ter havido reação cruzada com outros agentes infecciosos quando da realização da RIFI e da imunocromatografia, uma vez que, exceto o cão vacinado, somente uma amostra foi considerada positiva pelos testes. Estas observações concordam com os relatos de Oliveira (2004), que não comprovou a existência de reação cruzada entre *L. chagasi* e *Babesia canis* ou *Ehrlichia canis* pela

---

[12] Castro, K.F. Informação dada no dia 20 de março de 2010: Hospital Veterinário "Dr Halim Atique". 2010 (Informação Pessoal)

RIFI, mas discordam dos achados de Zanette, (2006) e Zanette et al. (2008a e 2008c) que identificaram reações cruzadas com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* por RIFI e, com *Erlichia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* por imunocromatografia.

A soroprevalência observada na população de cães do presente ensaio foi bem inferior à observada por Camargo-Neves et al. (2001) no município de Araçatuba (média de 12,1%, variando entre 4,1% e 25,8% nos diversos bairros) e por Camargo-Neves (2007) em outros municípios considerados endêmicos no Estado de São Paulo (média de 7,3%).

O cão (C 511) foi o único considerado positivo. Tratava-se de um animal sem raça definida, macho, de um ano e meio de idade. Apesar deste cão não apresentar histórico de deslocamento para municípios com transmissão da doença, segundo o proprietário o animal havia sido adquirido com um mês de idade no município de Valparaíso, região com transmissão canina e humana para leishmaniose visceral. Por esse motivo, há que se considerar a possibilidade de uma infecção prévia, antes de seu deslocamento para São José do Rio Preto.

No momento da consulta o animal apresentava sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral, tais como caquexia, atrofia muscular, hipertrofia de linfonodos submandibulares e poplíteos e descamação cutânea, anteriormente descritos por Albuquerque et al. (2007), Baneth (2006) e Feitosa et al. (2000).

Os achados hematológicos também foram compatíveis com a doença, uma vez que o animal possuía uma anemia normocítica normocrômica, associada à uma leucocitose por neutrofilia, monocitose, linfopenia e trombocitopenia. O exame bioquímico do paciente, demonstrou aumento da dosagem sérica de creatinina indicando nefropatia, o que também pode ser verificado em cães com leishmaniose visceral canina. No entanto, tanto os achados de exame físico como as alterações hematológicas e bioquímicas, não são patognomônicas da doença e podem ser decorrentes da infecção por outros agentes infecciosos, tais como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, conforme

salientado por Zanette (2006), doenças estas freqüentes na rotina de atendimento do Hospital Veterinário “Dr Halim Atique”. Não foi possível confirmar o diagnóstico de leishmaniose visceral por meio de exame parasitológico direto ou por PCR, e nem excluir a ocorrência de outras enfermidades infecciosas pois o cão veio a óbito 24 horas após o atendimento inicial.

Os valores de soroprevalência observado no presente estudo, aliados ao fato de que o único animal que apresentava sorologia positiva por mais de uma técnica, ter sido adquirido em uma área endêmica para leishmaniose visceral, faz supor que não existiam casos autóctones de leishmaniose visceral canina na população estudada.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na população do presente estudo permitem concluir que São José do Rio Preto deve ser, ainda, área não endêmica para leishmaniose visceral canina.

7 REFERÊNCIAS

AFONSO, M.O.; ALVES-PIRES. Bioecologia dos vectores. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira, 2008. p. 27-40.

ALBUQUERQUE A.R.; ARAGÃO, F.R.; FAUSTINO M.A.G.; GOMES Y.M.; LIRA R.A.; NAKASAWA M.; ALVES L.C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária***,* v.12, p. 78-80, 2007.

ALEXANDRE-PIRES, G.M.; CORREIA, J.J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira, 2008. p. 53-67.

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

ALMEIDA, M.A.O.; JESUS, E.E.V., SOUSA-ATTA, M.L.B.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.A.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3-4, p. 227-232, 2005.

ALVES, C.F.; AMORIM, I.F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN-γ , TNF-α, IL-10 and TGF-β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.

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. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n. 1, p.259-265, 2004.

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

BANETH, G. Leishmaniases. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases**. 3.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 73, p. 685-698.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis – A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, v. 175, n.1, p.14-15, 2008.

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

BORGES, B.K.A.; SILVA, J.A.; HADDAD, J.P.A.; MOREIRA, E.C.; MAGALHÃES, D.F.; RIBEIRO, L.M.L.; FIÚZA, V.O.P. Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p. 1035-1043, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRITO, F.L.; ALVES, L.C.; LAUS, J.L. Manifestações oculares na leishmaniose visceral canina: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 11, n. 64, p. 68-74, 2006.

CAMARGO-NEVES, V.L. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 1, n. 6, p.1-4, 2004.

CAMARGO-NEVES, V.L. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 48, p.12-14, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F., KATZ, G.; RODAS, L. A.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPINOLA, R.M.; CRUZ, O. G Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998 -1999. **Caderno de Saúde Pública,** v.17, n.5, p. 1263-1267, 2001.

CARVALHO, D.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29. n.2, p. 120-124, 2009.

CAVALCANTI, M.P.; FAUSTINO, M.A.G.; SILVA, L.B.G.; ALVES, L.C. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 10, n. 58, p. 36-42, 2005.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; De LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; Da COSTA, R.T.; ROCHA, N.M.M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.24, n.1, p. 21-25, 1991.

COSTA, R.T.; FRANÇA, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v.2, p. 26-28, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.48, n.3, p.151-156, 2006.

DIAS, F.O. P.; LOROSA, E.S.; REBÊLO, J.M.M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomya longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

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

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v.136, n. 20, p.514-516,1995.

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

IBGE. **Cidades**. Disponível em: <http: www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em 5 outubro. 2009.

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

IKEDA-GARCIA, F.A.. **Avaliação das subclasses de IgG em cães naturalmetne acometidos por leishmaniose visceral, submetidos ou não a tratamento, e em animais vacinados contra a doença**. 2009. 101f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICH, M.; FOUCHEAUX, C.; DELEURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. Controlo da leishmaniose canina – protecção de cães contra picadas de mosquitos do gênero flebotomos com coleiras de deltametrina. **Medical and Veterinary Entomology**, v.11, p. 105-111, 1997.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p. 159-174, 1977.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomya longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na LVA canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.67, p. 13-23, 2009.

LAURENTI, M.D.; MARCONDES, M.; ROSSI, C.N.; IKEDA-GARCIA, F.A.; TOMOKANE, T.Y.; RIZZARDI, R.L.; SECUNDINO, N.F.C.; PIMENTA, P.F.P.; CORBETT, C.E.P. Canine leishmaniasis: potential of symptomatic and asymptomatic dogs on the parasite transmissibility to the vector. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIASIS, 14., 2009. **Anais**…Lucknow: Editora, 2009.

LAURENTI, M.D.; LEMOS, E.M.; REIS, A.B.; MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CORBETT, C.E.P.; DIETZE, R. Evaluation of Kalazar detect rapid test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. In: **World Congress On Leishmaniasis**, 3., 2005. Italy. **Abstract book**...Italy, 2005. p. 160.

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

LEMOS, E.M.; LAURENTI, M.D.; MOREIRA, M.A.B.; REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C.; RAYCHAUDHURI, S.; DIETZE, R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect TM) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 205-207, 2008.

LEONTIDES, L.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A.F.; GALATOS, A.D.; MYLONAKIS, M.E. A cross-sectional study of *Leishmania spp*. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.109, n, 1-2, p.19-27, 2002.

LLERA, J.L.G.; GARCÍA, M.L.L.; REINOSO, E.M.; GONZÁLEZ, D.V. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 3-4, p. 185-190, 2002.

LINDOSO, J.A.L.; GOTO, H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. . **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.68, p. 7-11, 2006.

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

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 71, p. 50-58, 2007b.

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

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Caderno Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 294-2947, 2008.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbente assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n.1, p.13-21, 1995.

MAURÍCIO, IL.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi.* **Parasitology Today**, v.16, n. 5, p.188-189, 2000.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., 2004. **Anais**...Ouro Preto: Editora, 2004.

METTLER, M.; GRIMN, 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 infectious in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.11, p.5515-5519, 2005.

MISSAWA, N.A.; LOROSA, E.S.; DIAS, E.S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.4, p. 365-368, 2008.

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

MOREIRA JUNIOR, E.D.; De SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M.;NASCIMENTO, E.G.; PONTES DE CARVALHO, L. Assessment of na optimized dog-culling program in the dynamics of canine Leishmania transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245-252, 2004.

MOREIRA JUNIOR, E.D.; De SOUZA, V.M.M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.L.; BARRETO, R.B.; De CARVALHO, L.P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Jounal of Tropical Medicine**, v.69, n.4, p. 393-397, 2003.

MORENO, P. Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v.144, n. 7, p. 169-171, 1999.

NUNES, C.M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; De PAULA, H.B.; De AZEVEDO, M.A.A.; De LIMA, V.M.F.; GARCIA, J.F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leismaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p. 5-9, 2007.

NUNES, C.M.; LIMA, V.M.F.; PAULA, H.B.; PERRI, S.H.V.; ANDRADE, A.M.; DIAS, F.E.F.; BURATTINI, M.N. Dog culling and replacement in an área endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 19-23, 2008.

OLIVEIRA, T.M.F.S. **Detecção de anticorpos anti-*Leishamania chagasi*, em soros de cães do município de Jaboticabal, área não endêmica para a doença**. 2004. 46f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

OSMAN, O.F.; OSKAM, L.; ZIJLSTRA, E.; KROON, N.C.M.; SCHOONE, G.J.; KHALIL, E.T.A.G.; EL-HASSAN, A.M.; KAGER, P.A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.10, p. 2454-2457, 1997.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; De CAPRARIIS, D.; STANNECK, D.; TESTINI, G.; GRIMM, F.; DEPLAZES, P.; CAPELLI, G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. **Clinical and Vaccine Imunology**, v.16, n.3, p. 337-343, 2009.

PARRA, L.E.; BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; SOUZA, L.O.P.; PALATNIK de SOUZA, C.B; MENZ, I. Safety Trial using the Leishmune ® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2180 – 2186, 2007.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao programa de vigilância e controle da LVA no estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.68, p. 4-13, 2009.

PORROZZI, R.; Da COSTA, M.V.S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; Dos SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI-JUNIOR, G. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n.5, p. 544-548, 2007.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 3, n.11, p. 13-14, 1997.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 71, p. 66-76, 2007.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detectionand diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

ROSÁRIO, E.Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; Da COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.2, p. 197-203, 2005.

ROSSI, C.N. **Ocorrência de *Leishmania sp.* em gatos do município de Araçatuba – São Paulo – Brasil.** 2007. 78f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

RYAN, J.R.; SMITHYMAN, A.M.; RAJASEKARIAH, G.; HOCHBERG, L.; STITELER, J.M.; MARTIN, S.K. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 3, p.1037-1043, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANTA BRÍGIDA, R.J.B.S. **Estudo comparativo de diferentes substratos antigênicos de *Leishmania* spp (Kinetoplastida, Trypanossomatidae) utilizando teste imunoenzimático Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), no diagnóstico laboratorial sorológico das leihsmanioses.** 2004. 54f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2004.

SANTOS-GOMES, G.M.; RODRIGUES, O.R.; MARQUES, C. Resposta imunológica. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira, 2008. p. 69-82.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2006. 160p.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. **Classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana**. Estado de São Paulo, abril de 2008. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5, n. 52, p.20-25, 2008.

SAVANI, E.S.M.M.; SCHIMONSKY, B.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista Saúde Pública**, v.37, n.2, p. 260-262, 2003.

SOUZA, M.B.; MARZOCHI, M.C.A.; CARVALHO, R.W.; RIBEIRO, P.C.; PONTES, C.S.; CAETANO, J.M.; MEIRA, A.M. Ausência da Lutzomya longipalpis em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n.6, p. 1881-1885, 2003.

STRAUSS, A.I.D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis (last update: 26 - Sep – 2001). In: CARMICHAEL, L. (Ed.) **Recent advances in canine infectious diseases.** Disponível em : < http:// www. Ivis.org/advances/Infect Dis Carmichael/baneth.> Acesso em : 30 dez. 2007.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.5, p. 951-958, 2002.

TOMÁS, A.M.; ROMÃO, S.F. In: SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I.P. **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira, 2008. p. 7-26.

TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALÉS, J.; FRANCH, J.; PENA,T; CABRERA, B.; PASTOR,J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 11, p. 549-552, 2005.

TRONCARELLI, M.Z.; MACHADO, J.G.; CAMARGO, L.B.; HOFFMANN, J.L.; CAMOSSI, L.; GRECA, H.; FACCIOLI, P.Y.; LANGONI, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Veterinária e Zootecnica**, v. 15, n.1. p. 39-46, 2008.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; STOLF, A.M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excretesd antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas's disease. **Parasitology**, v.39, n. 3, p.169-176, 2001.

WHO. World Heath Organization. **Magnitude of the problem**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em 10 abril 2010.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

ZANETTE, M.F.; LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D.; VIDES, J.P.; SILVA, D.L.; ROSSI, C.N.; IKEDA-GARCIA, F.A.; ROSA, F.A.; SOBRINHO, L.S.V.; COSTA, D.C.; PERRI, S.H.V.; CAMACHO, A.A.; MARCONDES, M. Occurrence of cross-reaction between canine visceral leishmaniasis and Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and immunochromatographic dipstick test. **Journal of Veterinary Internal Medicine**,v. 22, n.3, 783, 2008a

ZANETTE, M.F., LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D., VIDES, J.P.; SILVA, D.L.; ROSSI, C.N., IKEDA-GARCIA, F.A.; ROSA, F.A.; SOBRINHO, L.S.V.; COSTA, D.C.; PERRI, S.H.V.; HAGIWARA, M.K.; MARCONDES, M. Occurrence of cross-reaction between canine visceral leishmaniasis and babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and immunochromatographic dipstick test. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 3, 783, 2008b.

ZANETTE, M.F., LIMA, V.M.F.; LAURENTI, M.D., VIDES, J.P.; SILVA, D.L.; ROSSI, C.N., IKEDA-GARCIA, F.A.; ROSA, F.A.; SOBRINHO, L.S.V.; COSTA, D.C.; PERRI, S.H.V.; HAGIWARA, M.K.; MARCONDES, M. Occurrence of cross-reaction between canine visceral leishmaniasis and ehrlichiosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and immunochromatographic dipstick test. **Journal of Veterinary Internal Medicine**,v. 22, n.3, 783, 2008c.

ANEXO A

Quadro 1 – Valores individuais das densidades ópticas médias (DO) obtidas por meio da técnica de ELISA indireto e corrigidas pelo modelo A/P; títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* obtidos por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e resultados da técnica de imunocromatografia (ICR) para o diagnóstico de leishmaniose visceral em 584 cães atendidos no Hospital Veterinário "Dr Halim Atique" de São José do Rio Preto. (Araçatuba, 2010)

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
1	-0,037	-------	Negativo	24	0,021	-------	Negativo
2	-0,024	-------	Negativo	25	0,204	-------	Negativo
3	-0,071	-------	Negativo	26	-0,010	-------	Negativo
4	-0,036	-------	Negativo	27	0,182	-------	Negativo
5	0,106	-------	Fraco	28	0,069	<1:40	Negativo
6	-0,064	-------	Negativo	29	0,020	<1:40	Negativo
7	0,042	<1:40	Negativo	30	-0,009	-------	Negativo
8	-0,080	-------	Negativo	31	0,153	-------	Negativo
9	0,049	<1:40	Negativo	32	0,220	-------	Negativo
10	-0,126	-------	Negativo	33	0,062	-------	Negativo
11	-0,023	<1:40	Negativo	34	-0,465	-------	Negativo
12	0,157	-------	Negativo	35	0,257	-------	Negativo
13	0,220	-------	Negativo	36	-0,035	-------	Negativo
14	-0,076	-------	Negativo	37	0,084	-------	Negativo
15	0,091	<1:40	Negativo	38	-0,191	-------	Negativo
16	-0,035	-------	Negativo	39	0,114	-------	Negativo
17	-0,121	-------	Negativo	40	0,052	-------	Negativo
18	0,182	<1:40	Negativo	41	0,036	<1:40	Negativo
19	0,021	-------	Negativo	42	0,170	-------	Negativo
20	0,192	-------	Negativo	43	-0,288	-------	Negativo
21	-0,040	-------	Negativo	44	0,243	-------	Negativo
22	-0,022	-------	Negativo	45	0,097	-------	Negativo
23	0,184	<1:40	Negativo	46	0,217	-------	Negativo

continua

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
47	0,155	-------	Negativo	71	-0,014	<1:40	Negativo
48	0,251	-------	Negativo	72	0,162	-------	Negativo
49	0,182	-------	Negativo	73	-0,067	-------	Negativo
50	-0,011	-------	Negativo	74	-0,053	<1:40	Negativo
51	-0,543	-------	Negativo	75	-0,007	-------	Negativo
52	0,324	<1:40	Negativo	76	0,053	<1:40	Negativo
53	0,048	<1:40	Fraco	77	0,092	-------	Negativo
54	0,205	-------	Negativo	78	0,058	-------	Negativo
55	0,077	<1:40	Negativo	79	-0,020	-------	Negativo
56	0,067	-------	Negativo	80	0,066	-------	Negativo
57	0,219	-------	Negativo	81	0,09	-------	Negativo
58	-0,175	-------	Negativo	82	0,263	-------	Negativo
59	0,201	-------	Negativo	83	0,019	-------	Negativo
60	0,030	<1:40	Negativo	84	0,003	<1:40	Negativo
61	-0,043	-------	Negativo	85	0,152	-------	Negativo
62	-0,076	-------	Negativo	86	-0,037	-------	Negativo
63	0,134	-------	Negativo	87	-0,078	-------	Negativo
64	0,121	<1:40	Negativo	88	-0,055	-------	Negativo
65	0,130	-------	Fraco	89	0,138	-------	Negativo
66	0,029	-------	Negativo	90	0,147	-------	Negativo
67	-0,478	-------	Negativo	91	0,019	<1:40	Negativo
68	0,044	-------	Negativo	92	-0,245	-------	Negativo
69	0,259	-------	Negativo	93	0,111	-------	Negativo
70	0,265	-------	Fraco	94	0,167	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
95	0,104	<1:40	Negativo	119	0,069	-------	Negativo
96	-0,050	<1:40	Negativo	120	-0,051	<1:40	Negativo
97	0,140	-------	Negativo	121	0,145	<1:40	Negativo
98	0,081	<1:40	Negativo	122	0,137	-------	Negativo
99	0,024	<1:40	Negativo	123	0,003	-------	Negativo
100	0,193	-------	Negativo	124	0,021	<1:40	Negativo
101	-0,042	<1:40	Negativo	125	0,115	<1:40	Negativo
102	0,242	-------	Negativo	126	0,065	-------	Negativo
103	0,002	-------	Negativo	127	0,056	-------	Negativo
104	-0,031	<1:40	Negativo	128	0,001	-------	Negativo
105	-0,021	-------	Negativo	129	-0,004	-------	Negativo
106	0,119	-------	Negativo	130	0,131	-------	Negativo
107	0,418	<1:40	Fraco	131	-0,031	-------	Negativo
108	0,256	-------	Negativo	132	-0,003	<1:40	Negativo
109	0,090	<1:40	Negativo	133	0,154	-------	Negativo
110	-0,066	<1:40	Negativo	134	0,245	-------	Negativo
111	0,024	-------	Negativo	135	-0,011	-------	Negativo
112	-0,006	-------	Negativo	136	0,133	-------	Negativo
113	-0,024	-------	Negativo	137	0,002	-------	Negativo
114	0,088	-------	Negativo	138	0,030	-------	Negativo
115	0,076	-------	Negativo	139	-0,136	-------	Negativo
116	-0,008	<1:40	Negativo	140	-0,024	-------	Negativo
117	0,064	-------	Negativo	141	0,046	<1:40	Negativo
118	0,178	-------	Negativo	142	0,164	<1:40	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
143	0,068	<1:40	Negativo	167	-0,055	<1:40	Negativo
144	-0,031	-------	Negativo	168	-0,021	-------	Negativo
145	-0,024	-------	Negativo	169	-0,050	<1:40	Negativo
146	0,140	<1:40	Negativo	170	0,243	-------	Negativo
147	0,136	-------	Negativo	171	0,044	<1:40	Negativo
148	-0,042	<1:40	Negativo	172	-0,047	<1:40	Negativo
149	0,130	-------	Negativo	173	-0,062	<1:40	Negativo
150	0,138	-------	Negativo	174	0,155	<1:40	Negativo
151	0,122	-------	Negativo	175	0,190	-------	Negativo
152	0,018	<1:40	Negativo	176	-0,028	-------	Negativo
153	-0,146	-------	Negativo	177	0,065	<1:40	Fraco
154	0,164	-------	Negativo	178	0,025	-------	Negativo
155	0,121	<1:40	Negativo	179	0,036	<1:40	Negativo
156	0,057	-------	Negativo	180	0,207	-------	Negativo
157	-0,052	<1:40	Negativo	181	0,184	-------	Negativo
158	0,082	-------	Negativo	182	-0,222	-------	Negativo
159	0,071	-------	Negativo	183	-0,056	<1:40	Negativo
160	-0,065	-------	Negativo	184	0,239	-------	Negativo
161	0,116	-------	Negativo	185	0,110	-------	Negativo
162	0,121	-------	Negativo	186	0,153	<1:40	Negativo
163	-0,025	-------	Negativo	187	-0,012	-------	Negativo
164	0,021	-------	Negativo	188	0,030	<1:40	Negativo
165	-0,026	<1:40	Negativo	189	0,148	-------	Negativo
166	0,267	-------	Negativo	190	-0,047	<1:40	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
191	0,128	<1:40	Negativo	215	0,218	-------	Negativo
192	-0,148	-------	Negativo	216	0,058	-------	Negativo
193	0,073	-------	Negativo	217	-0,002	<1:40	Negativo
194	-0,193	-------	Negativo	218	0,048	-------	Negativo
195	-0,062	<1:40	Negativo	219	0,113	<1:40	Negativo
196	-0,047	-------	Fraco	220	0,113	-------	Negativo
197	-0,090	-------	Negativo	221	-0,165	-------	Negativo
198	-0,173	-------	Negativo	222	0,143	-------	Negativo
199	0,088	-------	Negativo	223	0,205	<1:40	Negativo
200	0,055	-------	Negativo	224	0,179	-------	Negativo
201	0,077	-------	Negativo	225	0,135	<1:40	Negativo
202	0,196	-------	Negativo	226	0,058	-------	Negativo
203	0,040	<1:40	Negativo	227	0,056	<1:40	Negativo
204	-0,029	-------	Negativo	228	-0,265	-------	Negativo
205	0,131	-------	Negativo	229	-0,127	-------	Negativo
206	0,040	-------	Negativo	230	0,020	-------	Negativo
207	0,310	<1:40	Negativo	231	-0,056	-------	Negativo
208	0,077	-------	Negativo	232	0,292	<1:40	Fraco
209	-0,031	<1:40	Negativo	233	-0,045	<1:40	Negativo
210	0,154	<1:40	Negativo	234	0,008	<1:40	Negativo
211	-0,022	-------	Negativo	235	0,610	<1:40	Fraco
212	-0,018	-------	Negativo	236	0,045	-------	Negativo
213	0,057	-------	Negativo	237	0,079	-------	Negativo
214	0,093	-------	Negativo	238	0,165	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
239	0,093	<1:40	Fraco	263	0,230	-------	Negativo
240	0,254	<1:40	Negativo	264	0,028	-------	Negativo
241	-0,031	-------	Negativo	265	-0,091	-------	Negativo
242	0,096	-------	Negativo	266	-0,009	-------	Negativo
243	-0,050	<1:40	Negativo	267	0,133	-------	Negativo
244	0,096	-------	Negativo	268	-0,071	<1:40	Negativo
245	0,064	-------	Negativo	269	0,039	<1:40	Negativo
246	0,248	-------	Negativo	270	-0,055	-------	Negativo
247	-0,002	<1:40	Negativo	271	0,083	<1:40	Fraco
248	0,241	-------	Negativo	272	0,077	-------	Negativo
249	0,248	-------	Negativo	273	0,117	<1:40	Negativo
250	0,085	-------	Negativo	274	0,112	-------	Negativo
251	0,064	<1:40	Negativo	275	0,147	-------	Negativo
252	-0,040	<1:40	Negativo	276	0,142	-------	Negativo
253	0,080	-------	Negativo	277	0,254	-------	Negativo
254	0,067	-------	Negativo	278	0,229	-------	Negativo
255	0,165	-------	Negativo	279	0,054	<1:40	Negativo
256	-0,003	-------	Negativo	280	0,124	-------	Negativo
257	-0,052	-------	Negativo	281	0,105	-------	Negativo
258	0,116	-------	Fraco	282	0,215	<1:40	Negativo
259	0,145	-------	Negativo	283	0,129	-------	Negativo
260	0,069	-------	Negativo	284	0,057	-------	Negativo
261	-0,044	<1:40	Negativo	285	0,253	-------	Negativo
262	0,083	-------	Negativo	286	0,121	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
287	0,142	-------	Negativo	311	0,049	-------	Negativo
288	0,172	-------	Negativo	312	-0,071	<1:40	Negativo
289	0,124	-------	Negativo	313	0,165	-------	Negativo
290	0,018	-------	Negativo	314	-0,087	-------	Negativo
291	-0,050	-------	Negativo	315	0,071	-------	Negativo
292	-0,153	-------	Negativo	316	-0,054	-------	Negativo
293	-0,052	-------	Negativo	317	0,165	<1:40	Negativo
294	0,003	-------	Negativo	318	0,019	-------	Negativo
295	0,148	-------	Negativo	319	-0,036	-------	Negativo
296	0,258	-------	Negativo	320	-0,045	<1:40	Negativo
297	0,013	<1:40	Negativo	321	0,115	-------	Negativo
298	-0,088	-------	Negativo	322	0,033	-------	Negativo
299	0,155	-------	Negativo	323	0,016	-------	Negativo
300	0,097	<1:40	Negativo	324	-0,002	<1:40	Negativo
301	0,087	-------	Negativo	325	0,018	-------	Negativo
302	0,008	<1:40	Negativo	326	0,222	-------	Negativo
303	0,092	-------	Negativo	327	0,164	<1:40	Negativo
304	-0,049	-------	Negativo	328	0,106	-------	Negativo
305	-0,087	-------	Negativo	329	-0,011	-------	Fraco
306	0,202	-------	Negativo	330	0,044	-------	Negativo
307	0,210	-------	Negativo	331	0,093	-------	Negativo
308	0,078	<1:40	Negativo	332	-0,027	<1:40	Negativo
309	-0,012	-------	Negativo	333	-0,056	-------	Negativo
310	0,130	-------	Negativo	334	0,217	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
335	0,149	-------	Negativo	361	0,099	-------	Negativo
336	0,061	-------	Negativo	362	0,109	<1:40	Negativo
337	-0,045	<1:40	Negativo	363	0,185	-------	Negativo
338	0,036	-------	Fraco	364	0,031	<1:40	Negativo
339	0,060	-------	Negativo	365	0,102	-------	Negativo
340	-0,059	-------	Negativo	366	-0,131	-------	Negativo
341	0,195	-------	Negativo	367	0,184	-------	Negativo
342	0,132	-------	Negativo	368	-0,100	-------	Negativo
343	0,259	-------	Negativo	369	0,128	-------	Negativo
344	0,024	-------	Negativo	370	0,131	-------	Negativo
345	-0,013	-------	Negativo	371	0,036	-------	Negativo
346	0,065	-------	Negativo	372	-0,007	-------	Negativo
347	-0,047	-------	Negativo	373	0,214	-------	Negativo
348	-0,004	-------	Negativo	374	0,085	-------	Negativo
349	0,004	-------	Negativo	375	0,053	-------	Negativo
350	0,208	-------	Negativo	376	-0,036	-------	Negativo
351	-0,082	<1:40	Negativo	377	-0,008	-------	Negativo
352	-0,007	-------	Negativo	378	-0,072	-------	Negativo
353	0,048	-------	Negativo	379	-0,011	-------	Negativo
354	0,145	-------	Negativo	380	0,097	-------	Negativo
355	0,004	-------	Negativo	381	0,210	-------	Negativo
356	0,222	-------	Negativo	382	0,094	<1:40	Negativo
357	0,005	<1:40	Negativo	383	0,077	<1:40	Negativo
358	-0,017	<1:40	Negativo	384	0,115	-------	Negativo
359	0,021	<1:40	Negativo	385	-0,058	-------	Negativo
360	0,174	-------	Negativo	386	0,058	<1:40	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
387	-0,011	-------	Negativo	411	-0,107	-------	Negativo
388	-0,114	-------	Negativo	412	0,131	-------	Negativo
389	0,111	<1:40	Negativo	413	0,136	-------	Negativo
390	-0,136	-------	Negativo	414	-0,123	-------	Negativo
391	0,205	-------	Negativo	415	-0,029	-------	Negativo
392	0,121	<1:40	Negativo	416	0,082	-------	Negativo
393	0,029	-------	Negativo	417	-0,033	-------	Negativo
394	0,044	-------	Negativo	418	-0,065	-------	Negativo
395	0,133	-------	Negativo	419	-0,010	-------	Negativo
396	0,032	-------	Negativo	420	-0,058	-------	Negativo
397	0,183	-------	Negativo	421	0,021	-------	Negativo
398	-0,057	-------	Negativo	422	0,025	-------	Negativo
399	-0,016	-------	Negativo	423	-0,031	-------	Negativo
400	-0,033	-------	Negativo	424	0,020	-------	Negativo
401	0,223	-------	Negativo	425	0,036	-------	Negativo
402	0,081	<1:40	Negativo	426	0,145	<1:40	Negativo
403	0,002	<1:40	Negativo	427	0,064	-------	Negativo
404	-0,132	-------	Negativo	428	0,075	-------	Negativo
405	0,050	-------	Negativo	429	0,018	-------	Negativo
406	-0,057	-------	Negativo	439	0,088	-------	Negativo
407	-0,167	-------	Negativo	431	-0,020	<1:40	Negativo
408	-0,091	-------	Negativo	432	0,007	<1:40	Negativo
409	0,032	<1:40	Negativo	433	-0,005	-------	Negativo
410	0,120	<1:40	Negativo	434	0,109	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
435	0,038	-------	Negativo	459	0,047	-------	Negativo
436	-0,116	-------	Negativo	460	-0,104	-------	Negativo
437	0,077	-------	Negativo	461	-0,068	-------	Negativo
438	0,233	-------	Negativo	462	0,140	<1:40	Negativo
439	-0,142	-------	Negativo	463	-0,090	-------	Negativo
440	-0,051	-------	Negativo	464	0,229	-------	Negativo
441	-0,021	-------	Negativo	465	-0,006	-------	Negativo
442	0,136	-------	Negativo	466	0,128	-------	Negativo
443	-0,056	-------	Negativo	467	-0,009	-------	Negativo
444	-0,009	-------	Negativo	468	-0,092	-------	Negativo
445	0,170	-------	Negativo	469	0,068	-------	Negativo
446	0,040	-------	Negativo	470	-0,144	-------	Negativo
447	-0,087	-------	Negativo	471	-0,138	-------	Negativo
448	0,223	<1:40	Negativo	472	-0,075	-------	Negativo
449	0,015	-------	Negativo	473	0,063	-------	Negativo
450	0,072	-------	Negativo	474	0,266	-------	Negativo
451	0,107	-------	Negativo	475	0,009	<1:40	Negativo
452	0,145	-------	Negativo	476	-0,012	-------	Negativo
453	0,048	-------	Negativo	477	0,064	-------	Negativo
454	-0,008	<1:40	Negativo	478	-0,071	-------	Negativo
455	-0,128	-------	Negativo	479	0,084	-------	Negativo
456	0,256	-------	Negativo	480	-0,127	-------	Negativo
457	-0,095	-------	Negativo	481	0,003	-------	Negativo
458	0,009	<1:40	Negativo	482	0,081	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
483	0,071	-------	Negativo	507	0,100	-------	Negativo
484	-0,054	-------	Negativo	508	0,143	-------	Negativo
485	-0,136	-------	Negativo	509	0,076	<1:40	Negativo
486	0,005	-------	Negativo	510	0,011	-------	Negativo
487	0,252	-------	Negativo	511	0,854	1:80	Positivo
488	0,213	-------	Negativo	512	0,212	<1:40	Negativo
489	0,192	-------	Negativo	513	0,074	-------	Negativo
490	-0,113	-------	Negativo	514	0,219	-------	Negativo
491	-0,003	<1:40	Negativo	515	-0,061	-------	Negativo
492	-0,021	-------	Negativo	516	0,095	-------	Negativo
493	0,066	<1:40	Negativo	517	0,005	<1:40	Negativo
494	0,108	-------	Negativo	518	0,176	-------	Negativo
495	0,041	<1:40	Negativo	519	-0,113	-------	Negativo
496	-0,074	-------	Negativo	520	-0,017	-------	Negativo
497	-0,117	-------	Negativo	521	0,153	-------	Negativo
498	0,175	-------	Negativo	522	-0,044	-------	Negativo
499	0,034	<1:40	Negativo	523	0,182	<1:40	Negativo
500	0,047	-------	Negativo	524	-0,017	-------	Negativo
501	0,165	-------	Negativo	525	0,025	-------	Negativo
502	0,268	-------	Negativo	526	0,078	-------	Negativo
503	-0,036	<1:40	Negativo	527	0,119	-------	Negativo
504	-0,079	-------	Negativo	528	0,142	-------	Negativo
505	0,095	-------	Negativo	529	-0,025	-------	Negativo
506	0,010	-------	Negativo	530	0,101	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
531	0,047	-------	Negativo	555	-0,020	-------	Negativo
532	0,198	-------	Negativo	556	0,103	-------	Negativo
533	-0,044	<1:40	Negativo	557	0,020	-------	Negativo
534	-0,008	-------	Negativo	558	-0,033	-------	Negativo
535	0,006	-------	Negativo	559	-0,112	-------	Negativo
536	0,053	-------	Negativo	560	0,038	<1:40	Negativo
537	0,027	-------	Negativo	561	0,135	-------	Negativo
538	-0,011	<1:40	Negativo	562	0,030	-------	Negativo
539	0,037	<1:40	Negativo	563	-0,146	-------	Negativo
540	-0,087	-------	Negativo	564	0,083	<1:40	Negativo
541	-0,005	-------	Negativo	565	-0,078	-------	Negativo
542	0,140	-------	Negativo	566	-0,040	<1:40	Negativo
543	-0,012	-------	Negativo	567	0,116	-------	Negativo
544	-0,050	-------	Negativo	568	-0,163	-------	Negativo
545	-0,027	-------	Negativo	569	0,239	-------	Negativo
546	0,026	<1:40	Negativo	570	0,006	-------	Negativo
547	0,015	-------	Negativo	571	-0,043	-------	Negativo
548	0,218	-------	Negativo	572	0,029	<1:40	Negativo
549	0,096	-------	Negativo	573	0,243	-------	Negativo
550	0,059	-------	Negativo	574	-0,016	-------	Negativo
551	-0,051	-------	Negativo	575	0,163	-------	Negativo
552	0,097	-------	Negativo	576	0,122	-------	Negativo
553	0,128	<1:40	Negativo	577	0,119	-------	Negativo
554	0,023	-------	Negativo	578	0,176	-------	Negativo

continuação

Animal	ELISA	RIFI	ICR	Animal	ELISA	RIFI	ICR
579	-0,025	<1:40	Negativo	_____			
580	0,071	-------	Negativo	_____			
581	0,105	-------	Negativo	_____			
582	0,111	-------	Negativo	_____			
583	0,139	1:80	Negativo	_____			
584	-0,004	-------	Negativo	_____			

ANEXO B

Detecção de anticorpos anti - *Leishmania Chagasi* em São José do Rio Preto-SP | **RG projeto:**

Nome: _____ **RGHV**:_____

Sexo: ☐ macho **Raça:** _____

☐ fêmea **Peso:** _____

Idade: _____ **Cor:** _____

Vive em : ☐ zona urbana ☐ zona rural

Proprietário: _____

Endereço: _____

_____

Telefone: _____

Adquiriu o cão: ☐ filhote _____ meses ☐ adulto _____ anos

Local de Nascimento: ☐ São José do Rio Preto ☐ Outra cidade (qual)_____ ☐ Não sabe

Procedência cão: ☐ feira de animais (comprou) ☐ CCZ ☐ canil ☐ adoção

☐ outros _____ ☐ Não sabe

Deslocamento do cão:

Já viajou com o cão: ☐ NÃO ☐ SIM (local) _____ (tempo) _____☐ Não sabe

Vacinação: ☐ somente qdo filhote ☐ V8 / V10 ☐ Raiva ☐ Outras _____

☐ adulto – anual ☐ V8 / V10 ☐ Raiva ☐ Outras _____

☐ não sabe

Qual motivo consulta ? ☐ doente (queixa)_____☐ cirurgia (qual) _____

☐ avaliação anual ☐ vacinação ☐ outros _____

Está sendo tratado com alguma medicação? ☐ SIM (qual) _____ (tempo)_____ ☐ NÃO

Foi tratado com alguma medicação nos últimos 60 dias? ☐ SIM (qual) _____(tempo)_____☐ NÃO

Doença anterior : ☐ NÃO ☐ SIM (qual) _____

Realizará algum exame? ☐ NÃO ☐ hemograma ☐ urinálise ☐ bioquímicos ☐ citologia ☐diag imagem

☐ Outros _____

Exame Físico: T°: _____ FC: _____ bpm FR: _____ mpm TPC: _____ seg

Hidratação: ☐ normal ☐ desidratação leve ☐ desidratação moderada ☐ desidratação severa

Linfonodos:☐ normais ☐ aumentados (quais) _____

Mucosas: ☐ normais ☐ hipocoradas ☐ pálidas ☐ ictéricas ☐ congestas

Palpação abdominal: ☐ ndn ☐ alterada _____

Outros achados clínicos: ☐ caquexia ☐ inapetência ☐ onicogrifose ☐ atrofia muscular

☐ alteração locomoção ☐ vômito ☐ diarréia ☐ esplenomegalia ☐ ceratoconjuntivite seca ☐ uveíte

☐ epistaxe ☐ descamação cutânea ☐ alopecia ☐ ulcerações cutâneas ☐ nódulos ☐ pústulas

Outros _____

_____

Já ouviu falar sobre a leishmaniose? ☐ SIM ☐ NÃO

OBS:_____

_____

_____

Ciente e de acordo com a pesquisa:

_____

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo