

VANESSA FIGUEREDO PEREIRA

Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina
por PCR

Pirassununga

2013

VANESSA FIGUEREDO PEREIRA

Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina
por PCR

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

Pirassununga

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2781
FMVZ

Pereira, Vanessa Figueredo
Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina por PCR /
Vanessa Figueredo Pereira. -- 2013.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

1. *Leishmania* spp. 2. Cão. 3. RIFI. 4. PCR. 5. Suabe conjuntival. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso de swab conjuntival para detecção da leishmaniose canina por PCR", protocolado sob o nº 2203/2011, utilizando 200 (duzentos) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Conjunctival swab samples for canine leishmaniasis detection by PCR", protocol number 2203/2011, utilizing 200 (two hundred) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 23 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEREIRA, Vanessa Figueredo

Título: Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina por PCR

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe **Adriana** e ao meu pai **Cláudio**, que passaram por momentos de dificuldade, de muita luta, mas nunca deixaram de acreditar na conquista de uma vida mais digna através do conhecimento e do estudo.*

Hoje agradeço do coração, essa oportunidade que surgiu com o sacrifício de vocês, que fizeram o possível e o impossível para minha formação.

*À minha querida irmã **Rafaella**, que é um exemplo para mim, pelo seu amor, humildade e simplicidade!*

*Ao meu namorado **Kleber**, que tem sido meu companheiro e amigo, e com quem quero compartilhar os melhores momentos da minha vida!*

Amo vocês!

*À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Trícia M. F. de Sousa Oliveira, por compartilhar comigo a sua amizade. Uma orientadora disposta a oferecer estímulos e, principalmente, percorrer novos caminhos, ouvindo com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiram durante o processo de reflexão. Por ser paciente, dedicada e generosa, e pela coragem de ousar a me aceitar como pós graduanda, mesmo diante dos riscos inerentes a esta atitude. Pela compreensão nos momentos difíceis pelos quais passei. Pela alegria de trabalharmos juntos!
Sou agradecida por ter sido orientada pela profissional que você é.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

Deixo expressos meus sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas, sem as quais o presente trabalho teria sido impossível:

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, à coordenação do curso de pós-graduação e aos professores pela oportunidade de realizar um sonho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelos esclarecimentos, valiosos para o aprimoramento deste trabalho e pelo belo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Prof.^a Dr.^a Lara Borges Keid pela receptividade, amizade e incondicional ajuda para a realização de meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar, alunos, estagiários, funcionários, pelo apoio moral, pelas conversas e momentos de descontração, aonde o trabalho é sempre agradável.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ, e aos pós graduandos, pelo acolhimento, apoio técnico e amizade.

À querida amiga Júlia, técnica dedicada, que além de ter me ajudado nos trabalhos do laboratório, foi amiga e conselheira.

Às amigas da Graduação Vet-Pira, com as quais passei momentos muito divertidos e apesar do pouco tempo de convivência se tornaram verdadeiras amigas

Aos funcionários do VPS de Pirassununga, pela paciência, apoio e momentos de alegria.

À Prof.^a Dr.^a Wilma Starke Buzetti, pela parceria, ajuda na coleta e processamento das amostras em Ilha Solteira.

Ao Firmezza (Diogo) que me ajudou muito durante a coleta, e no processamento das amostras, me acolhendo em sua casa durante o período de coleta.

À todo o pessoal do VPS de São Paulo, que me receberam muito bem e me fizeram sentir em casa.

Aos amigos da Pós Graduação: Danilo, Piauí, Dani, Rui, Mayra, Amália, Jonas, Thiaguinho, Tati, Júlia, pelos momentos de diversão, estresse e alegria, e principalmente pela amizade que conquistamos.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Ilha Solteira, e funcionários, com os quais realizei minhas coletas.

À bibliotecária Elza Faquim, pela correção das referências bibliográficas e execução da ficha catalográfica.

Aos animais, motivo maior de meu respeito e gratidão.

À todos agradeço, profundamente, e dedico o resultado deste trabalho.

RESUMO

PEREIRA, V. F. **Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina por PCR.** [Use of conjunctival swab for detection Canine Visceral Leishmaniasis by PCR]. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

A leishmaniose visceral canina é uma zoonose, no Brasil causado pelo protozoário *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*). É endêmica em 88 países, os quais compreendem regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, com incidência estimada em 2 milhões de casos por ano. No ambiente urbano, o cão doméstico é considerado o principal reservatório do parasito. A transmissão da doença ocorre através da picada do vetor, díptero flebotomíneo, da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O diagnóstico pode ser feito através de métodos diretos, como esfregaço preparado com os diferentes órgãos linfoides, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cultivo in vitro do parasito, ou por métodos sorológicos, como ELISA (Ensaio Imunoenzimático) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta). O controle epidemiológico da doença humana envolve o tratamento sistemático dos casos humanos, borrifação de inseticida em região domiciliar e peridomiciliar e eliminação de cães soropositivos, ponto mais controverso do programa de controle. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a técnica não invasiva do suabe conjuntival na identificação por PCR de leishmaniose canina. As amostras, de sangue e suabe conjuntival, foram coletadas durante inquérito epidemiológico realizado na cidade de Ilha Solteira - SP. A prevalência de animais positivos em pelo menos um dos três testes (RIFI, PCR de sangue, e PCR de suabe conjuntival) foi de 28,17% (60/213). No teste sorológico RIFI, um total de 13,6% (29/213) dos cães reagiram positivamente. Na PCR do suabe conjuntival, 13,1% (28/213) dos cães foram positivos, e na PCR de sangue total também obtivemos 13,1% (28/213) positivos. Comparando os animais testados pela RIFI e pela PCR de suabe conjuntival, 7,9% (17/213) animais foram positivos em ambos os testes, enquanto 81,2% (173/213) animais foram negativos em ambos os testes (PCR-SC e RIFI). Dos animais testados para PCR-SC, 5,1% (11/213) foram positivos apenas neste teste. Na sorologia, 5,6% (12/213) reagiram positivamente apenas pela RIFI. A

sensibilidade e especificidade da PCR-SC foram respectivamente 58,6% e 94,0%, valor preditivo positivo de 61,0%, valor preditivo negativo de 94,0%, e o índice kappa 0,53, o qual demonstra moderada concordância entre os testes. Ao se comparar a RIFI com a PCR-SG, dos animais testados, 3,3% (7/213) foram positivos nos dois testes simultaneamente, 13,6% (29/213) foram positivos apenas na RIFI, logo, 9,9% (21/213) foram positivos apenas na PCR-SG. Foram negativos nos dois testes 76,5% (163/213). A PCR-SG demonstrou sensibilidade de 24,1%, especificidade de 88,5%, valor preditivo positivo de 25,0% e valor preditivo negativo de 88,0% e índice kappa de 0,13, quando comparado à RIFI, indicando uma fraca concordância. Além disso, foram positivos em todos os três testes 2,35% (5/213), e apenas 0,47% (1/213) foi positivo nos testes de PCR-SG e PCR-SC. Os resultados demonstraram que o suabe conjuntival é uma boa alternativa, fácil e pouco invasiva, que pode ser utilizada para auxiliar inquéritos e estudos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina.

Palavras-chave: *Leishmania* spp. Cão. RIFI. PCR. Suabe conjuntival

ABSTRACT

PEREIRA, V. F. **Use of conjunctival swab for detection Canine Visceral Leishmaniasis by PCR.** [Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral Canina por PCR]. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Canine visceral leishmaniasis is a zoonosis in Brazil caused by the protozoan *Leishmania chagasi* (syn. *L. infantum*). It is endemic in 88 countries, which include tropical and subtropical regions of the Old and New World, with an estimated incidence of 2 million cases per year. In the urban environment, the domestic dog is the main reservoir of the parasite. Disease transmission occurs through the bite of the vector, sandfly, *Lutzomyia longipalpis* species. The diagnosis by direct methods can be made, such as smear prepared with different lymphoid organs, Polymerase Chain Reaction (PCR) in vitro culture of the parasite, or by serological methods such as ELISA (enzyme immunoassay) and IFAT (Indirect Immunofluorescence Test). The epidemiological control of human disease involves the systematic treatment of human cases, insecticide spraying in domiciliary area and elimination of seropositive dogs, most controversial point of the control program. The objective of this study was evaluate the noninvasive technique of conjunctival swab for canine leishmaniasis PCR identification. Were collected Samples of blood and conjunctival swab during an epidemiological survey conducted in the city of Ilha Solteira – SP. The prevalence of positive animals in at least one of the three test (IFAT, blood PCR, and swab PCR) was 28.17% (60/213). In IFAT serological test, 13.6% (29/213) of the dogs responded positively. In conjunctival swabs PCR, 13.1% (28/213) dogs were positive, and PCR of whole blood obtained 13.1% (28/213) positive. Comparing the animals tested by IFAT and conjunctival swab PCR, 7.9% (17/213) were positive in both tests, while 81.2% (173/213) animals were negative in both tests. Of the tested animals for swab PCR, 5.1% (11/213) were positive only in this test. In serology, 5.6% (12/213) reacted positively only by IFAT. The sensitivity and specificity of swab PCR were respectively 58.6% and 94.0%, positive predictive value 61.0%, negative predictive value of 94.0%, and kappa 0.53, which demonstrates moderate agreement between tests. Comparing the IFAT with blood PCR, the animals tested, 3.3%

(7/213) were positive in both tests simultaneously, 13.6% (29/213) were positive only by IFAT, so, 9, 86% (21/213) were positive only by blood PCR. Were negative in both tests 76.5% (163/213). The blood PCR demonstrated a sensitivity of 24.1%, specificity 88.5%, positive predictive value 25% and negative predictive value of 88% and coefficient of agreement (kappa) of 0.13, compared to IFAT, indicating poor agreement. Furthermore, were positive in all three tests 2.35% (5/213), and only 0.47% (1/213) were positive in the PCR-SC and PCR-SG test. The results showed that conjunctival swab is a good alternative, easier and less invasive that can be used to aid investigations and epidemiological studies of Canine Visceral Leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania* spp. Dog. IFA. PCR. Conjunctival swab.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concordância estimada pelo Índice Kappa entre o padrão ouro (RIFI) e os demais testes avaliados (PCR-SC e PCR-SG), realizado com amostras de sangue, soro e suabe conjuntival de cães, considerando a RIFI como padrão ouro – Ilha Solteira – 2011.....	66
Tabela 2 -	Valores de sensibilidade, especificidade, VPP (valor preditivo positivo), VPN (valor preditivo negativo) dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral canina, realizado com amostras de sangue, soro e suabe conjuntival de cães, considerando a RIFI como padrão ouro - Ilha Solteira – 2011.....	67
Tabela 3 -	Comparação entre frequência de positividade pela RIFI, PCR-SC e PCR-SG segundo a presença ou ausência de sinal clínico para leishmaniose visceral canina, com a respectiva significância estatística dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral canina, realizado com amostras de sangue, soro e suabe conjuntival de cães, considerando a RIFI como padrão ouro – Ilha Solteira – 2011.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Coleta de sangue dos cães, durante Inquérito Epidemiológico realizado juntamente com a equipe do CCZ, no período de julho à agosto - Ilha Solteira – 2011.....	57
Figura 2 -	Coleta de suabes conjuntivais dos cães, durante Inquérito Epidemiológico realizado juntamente com a equipe do CCZ, no período de julho à agosto – Ilha Solteira – 2011.....	57
Figura 3 -	Total de cães amostrados, classificados segundo sinais clínicos - Ilha Solteira – 2011.....	58
Figura 4 -	Imagens de cães com sinais clínicos compatíveis com Leishmaniose Visceral Canina, obtidas durante Inquérito Epidemiológico realizado juntamente com a equipe do CCZ, no período de julho à agosto – Ilha Solteira – 2011.....	59
Figura 5 -	Fragmentos obtidos pela PCR com o DNA de suabe conjuntival. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Controle negativo. Linha 3: Controle positivo. Linhas de 4 a 8: Reações com o DNA extraído de amostras de suabe conjuntival de 5 cães diferentes - Pirassununga – 2012.....	60
Figura 6 -	Fragmentos obtidos pela PCR com o DNA de sangue canino. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Controle positivo. Linha 18: Controle negativo. Linhas de 3 a 17: Reações com o DNA extraído de amostras de sangue de 15 cães diferentes – Pirassununga – 2012.....	61
Figura 7 -	Número de cães positivos pela RIFI de acordo com o título da reação, em amostras coletadas nos meses de julho e agosto - Ilha Solteira – 2011.....	62
Figura 8 -	Porcentagem e número de cães positivos em todos os testes simultaneamente, positivos apenas na RIFI, PCR-SC ou PCR-SG, respectivamente - Ilha Solteira – 2011.....	63
Figura 9 -	Comparação (porcentagem e número) entre os cães que foram positivos na RIFI, na PCR de suabe conjuntival, e os que foram positivos nos dois testes simultaneamente - Ilha Solteira – 2011.....	64
Figura 10 -	Comparação (porcentagem e número) entre os cães que foram positivos na RIFI, na PCR de sangue e os que foram positivos nos dois testes simultaneamente - Ilha Solteira – 2011.....	64

Figura 11 - Comparação (porcentagem e número) entre os cães que foram positivos na PCR de suabe conjuntival, na PCR de sangue e os que foram positivos nos dois testes simultaneamente – Ilha Solteira – 2011..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses,
EDTA: "Ethylenediaminetetracetic Acid" (Ácido Etilenodiaminotetracético);
ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (Ensaio Imunoenzimático);
kDNA: DNA de cinetoplasto;
LC: Leishmaniose Cutânea;
LT: Leishmaniose Tegumentar;
LVH: Leishmaniose Visceral Humana;
LV: Leishmaniose Visceral;
LVC: Leishmaniose Visceral Canina;
pb: Pares de base;
PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral;
PCR: "Polymerase Chain Reaction" (Reação em Cadeia da Polimerase);
PCR-SC: PCR de suabe conjuntival;
PCR-SG: PCR de sangue;
qPCR: PCR quantitativa em tempo real;
RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta;
RBCL: "*red blood cell lysis*" (tampão de lise de hemácia);
SC: Suabe conjuntival
SDS: Sulfato Dodecil de Sódio;
TBE: Tris Borato EDTA;
TE: Tris EDTA;
WHO: "World Health Organization" (Organização Mundial de Saúde).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	28
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
4.1 AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO DE TRANSMISSÃO.....	29
4.2 EPIDEMIOLOGIA.....	31
4.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO CÃO.....	34
4.4 ASPECTOS PATOLÓGICOS E PATOGÊNESE DA LVC.....	36
4.5 DIAGNÓSTICO.....	39
4.5.1 Diagnóstico Direto.....	39
4.5.2 Diagnóstico Indireto.....	40
4.5.3 Métodos Moleculares como Instrumento Epidemiológico e Diagnóstico da LVC.....	43
4.6. CONTROLE.....	46
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5.1 DESENHO DO ESTUDO.....	49
5.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	50
5.3 AMOSTRAS CONTROLE DE <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i>	50
5.4 DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE CANINA EM ILHA SOLTEIRA.....	50
5.5 AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES.....	51
5.5.1 Sangue Periférico.....	51
5.5.2 Suabe Conjuntival.....	51
5.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	52

5.6.1 Extração de DNA dos suabes conjuntivais.....	52
5.6.2 Extração de DNA do sangue.....	52
5.7 PCR.....	53
5.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	54
5.9 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	54
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
6 RESULTADOS.....	56
6.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	56
6.2 CLASSIFICAÇÃO DOS CÃES QUANTO AO SINAL CLÍNICO.....	58
6.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	59
6.4 PCR DE SUABE CONJUNTIVAL (PCR-SC) E PCR DE SANGUE (PCR-SG)....	60
6.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	61
6.6 CONCORDÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRE OS TESTES RIFI, PCR DE SANGUE E PCR DE SUABE CONJUNTIVAL.....	62
6.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS E A CONDIÇÃO CLÍNICA DOS CÃES.....	67
7. DISCUSSÃO.....	69
8 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa de caráter crônico, zoonótico e de distribuição mundial, caracterizada por um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, causadas por espécies distintas do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por hospedeiros invertebrados, capazes de infectar desde o homem até animais silvestres e domésticos (DESJEUX, 2004).

De acordo com o comportamento evolutivo do parasita no tubo digestório do vetor, o gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania*, com desenvolvimento restrito à porção anterior e média (ROSS, 1903) e *Viannia*, com desenvolvimento desde o intestino posterior até a porção anterior do tubo digestório (LAINSON; SHAW, 1987). Inclui várias espécies que eliciam manifestações viscerais e cutâneas, que, classicamente, são subdivididas em duas formas: leishmaniose tegumentar (LT), que apresenta manifestação cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa e leishmaniose visceral (LV) com alterações sistêmicas e por vezes cutâneas (MICHALSKY et al., 2002).

A LV foi inicialmente descrita como uma doença esporádica, de ambiente rural, que atingia seres humanos e cães que viviam em contato direto com ambientes silvestres. Posteriormente, a LV foi caracterizada como sendo de ocorrência endêmica, com surtos ocasionais, em áreas rurais do Nordeste brasileiro (DEANE; DEANE, 1962). Neste ambiente, a doença foi descrita associada aos bolsões de pobreza característicos da região (DE OLIVEIRA; DE ARAUJO, 2003), em virtude das políticas econômicas e sociais que ocasionaram um quadro de exclusão social. A partir da década de 70, foi observado um processo de transição epidemiológica, com a mudança do perfil de morbimortalidade, característico do meio rural, para o ambiente urbano (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

Este aumento do número de casos nas metrópoles deve-se, em parte, ao aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos e notificação obrigatória da doença. Outros fatores também contribuíram e contribuem para expansão da LV em ambientes urbanos, a saber: desflorestamento, migração de pessoas das áreas rurais endêmicas para os centros urbanos e peri-urbanos, precárias condições socioeconômicas em áreas de vilas e favelas (REITHINGER; DAVIES, 2002;

DESJEUX, 2004). Além disso, fatores como a boa adaptação do vetor ao ambiente doméstico, limitação das campanhas de controle vetorial e do reservatório, presença de coinfeção em pacientes imunossuprimidos e a seleção de cepas resistentes, também contribuem para a disseminação e urbanização da LV, gerando um aumento considerável da doença (REITHINGER; DAVIES, 2002; DESJEUX, 2004).

A principal forma de transmissão do parasita para o cão e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie nas Américas (REY, 2001) e do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (DESJEUX, 1996; BATES, 2007). O flebotomíneo tem papel de hospedeiro intermediário, e no seu intestino o parasito realiza a divisão de sua forma flagelada extracelular. Os insetos veiculam as formas promastigotas, uma vez que o protozoário possui duas principais formas em seu ciclo, uma intracelular amastigota, encontrada em hospedeiros mamíferos e outra, promastigota, a qual é encontrada no hospedeiro invertebrado (DESJEUX, 1992).

Muitas espécies de mamíferos, como cães, gatos, canídeos silvestres, marsupiais e roedores são naturalmente infectados por *Leishmania* spp. Mas o cão doméstico atua como reservatório natural no ciclo urbano da doença e principal elo na cadeia epidemiológica (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006). Raposas e marsupiais são conhecidos como hospedeiros silvestres da *L.(L.) infantum chagasi*, no Brasil. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (DEANE, 1956a); e *Cerdocyus thous* no Pará (LAINSON et al., 1990) e em Minas Gerais (SILVA et al., 2000). *L.(L.) infantum chagasi* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia (SHERLOCK et al., 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA et al., 2003). Mais recentemente três animais silvestres de cativeiro, uma raposinha (*Cerdocyus thous*), um cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e um lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), foram sorologicamente positivos para *Leishmania* no interior de São Paulo (JUSI, et al., 2011). O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre o ciclo silvestre e doméstico.

A emergência da doença em áreas não endêmicas e manutenção em regiões endêmicas se devem principalmente ao fato das mudanças ecológicas e distribuição do vetor. Parece evidente que algumas estimativas sobre o quadro da leishmaniose canina estão subestimadas, pois enquanto alguns cães desenvolvem os sinais

clínicos progressivamente, outros conseguem controlar a infecção e não apresentam sinais clínicos por muito tempo ou até mesmo por toda a vida. A presença da infecção latente contribui a longo termo para manutenção da doença em regiões endêmicas. Com isso, o controle da doença representa um sério problema, uma vez que tanto cães sintomáticos como assintomáticos podem infectar o inseto vetor (MOLINA,1994; MICHALSKY et al., 2007). Nos países endêmicos, a LV continua negligenciada pelo setor privado da economia e tem cabido ao setor público, apesar dos recursos escassos e infraestrutura inadequada, investir no desenvolvimento de novas drogas e métodos de diagnóstico mais eficientes.

Nos cães, a sintomatologia clínica é muito variada podendo haver confusão com uma série de outras doenças. Classicamente a leishmaniose em cães manifesta-se por febre, perda de peso, linfadenomegalia localizada ou generalizada, lesões dermatológicas e oftálmicas, diarreia, anemia e onicogribose (GENARO, 1993). Dependendo das propriedades do parasito e do hospedeiro a leishmaniose visceral canina (LVC) pode desenvolver-se sob a forma de infecção aguda ou crônica. Pode, também, ocorrer uma evolução de característica latente e, até mesmo, a cura espontânea (GENARO, 1993). Características genéticas podem determinar diferentes respostas imunológicas na espécie canina, sendo que alguns animais ou raças podem apresentar uma resposta mais efetiva do que outros (FERRER, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

O diagnóstico preciso da LVC é de grande complexidade uma vez que muitos cães infectados não apresentam sinais clínicos evidentes, alguns se autocuram e outros desenvolvem a doença após um longo período infectados. Quando presentes, as manifestações clínicas sugestivas da doença permitem uma avaliação do cão e auxiliam no diagnóstico. No entanto, não há um sinal clínico patognomônico para a LVC e as características consideradas típicas no animal doente podem se confundir com as de outras enfermidades como erliquiose, babesiose, rickettsiose, neoplasia cutânea, entre outras (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; REIS et al., 2006).

A combinação da avaliação clínica com os testes diagnósticos laboratoriais torna-se imperativa para um diagnóstico mais seguro. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para esta doença de notificação compulsória. Devem-se considerar parâmetros clínicos e epidemiológicos, bem como a pesquisa parasitológica direta ou a detecção indireta do parasito, baseado na detecção de anticorpos específicos da doença (CAMPINO et al., 2000; SCALONE et al.; 2002).

A pesquisa parasitológica direta, realizada por meio da observação de formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodos, medula óssea, aspirado esplênico, biópsias hepáticas e esfregaços sanguíneos, constitui-se no método mais antigo e seguro para o diagnóstico desta enfermidade. Porém, a sensibilidade desse método é bastante baixa e depende do tipo de material biológico colhido, grau de parasitemia e tempo de leitura da lâmina (GENARO, 1993).

Até recentemente os testes sorológicos como o imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), eram recomendados pelo Ministério da Saúde em inquérito epidemiológico canino (BRASIL, 2006), porém apresentam reação cruzada com *Trypanossoma cruzi* e outras espécies de *Leishmania* (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996).

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda para triagem o uso do DPP (“Dual Path Platform”), que se trata de um sorodiagnóstico por meio de imunocromatografia. Em testes experimentais, este teste apresentou alta sensibilidade para cães com sinais clínicos e alta especificidade para cães sem expressão clínica para LV (GRIMALDI JR. et al., 2012).

Os testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado, pois a sensibilidade pode variar e podem falhar na detecção de cães no período pré patente e antes da soroconversão. Existem cães que nunca farão a soroconversão e cães soropositivos que se convertem em soronegativos, mas ainda apresentam-se infectados (FERRER, 1992, 2002; FEITOSA, 2006; LEONTIDES et al., 2002). Animais com menos de três meses de idade podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos, por esse motivo não devem ser avaliados através de métodos sorológicos (BRAGA et al., 1998).

Rosário et al., (2005) relatam que embora o teste de imunofluorescência seja um método bastante empregado, as reações cruzadas com outras doenças, a baixa sensibilidade para a detecção de cães assintomáticos e a falta de adaptação para estudos soroepidemiológicos em larga escala, são as principais limitações desta técnica. O desempenho dos métodos sorológicos utilizados atualmente é limitado pelos antígenos empregados, que são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas íntegros ou moléculas solúveis, apresentando reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae (SUNDAR; RAI, 2002).

A biologia molecular tem sido bastante utilizada na detecção de LVC e vem ganhando cada vez mais importância no diagnóstico da doença (BERRAHAL et al.,

1996; REALE et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; LACHAUD et al., 2002). Dentre estes métodos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito. A detecção de DNA é possível em uma variedade de tecidos, como medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodos e sangue. Um novo tipo de material biológico, o suabe da conjuntiva ocular, tem demonstrado resultados consideráveis na detecção por PCR, além de ser pouco invasivo e oferecer rapidez e praticidade na coleta (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

As mucosas do hospedeiro são regiões normalmente colonizadas pelo parasito e por isso são alvos propícios para a detecção do mesmo. Além disso, as mucosas são tecidos de constante reposição celular e, portanto, as células esfoliativas daí provenientes podem ser facilmente coletadas utilizando-se suabes (FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010; GRAMICCIA et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012).

O suabe pode ser utilizado para coleta de células conjuntivais e ter seu potencial comparado a métodos de coleta convencionais e invasivos, como punção sanguínea, biópsia e aspirados. Com isso, torna-se estratégico e relevante avaliar a combinação da praticidade destas amostras clínicas de coleta não invasiva com a robustez da técnica de PCR para o diagnóstico da LVC. Os testes moleculares podem ser especialmente úteis para confirmação diagnóstica de cães imunossuprimidos, de casos subclínicos ou suspeitos que apresentem reações cruzadas em testes diagnósticos sorológicos.

Um dos principais fatores que contribuiu para a expansão da LV nos centros urbanos é a limitação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). No Brasil, o PCLV se iniciou na década de 50 e seu objetivo principal era romper os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença. Entretanto, os procedimentos de controle adotados têm sido questionados com base na falta de evidências da redução da incidência da leishmaniose visceral humana (LVH) no país. Diante disso, o Ministério da Saúde e a Fundação Nacional da Saúde convocaram um comitê de especialistas para reavaliar o programa e redirecionar as estratégias de controle (COSTA; VIEIRA, 2001). Essa análise vem sendo direcionada com base em argumentos respaldados na literatura especializada e em aspectos operacionais como a falta de padronização dos métodos diagnósticos para

a LVH e LVC; discordância entre a eliminação de cães soropositivos e a prevalência da infecção humana; necessidade da comprovação da existência de outros reservatórios, além do cão, como marsupiais e canídeos silvestres; pouco entendimento sobre os reais efeitos das ações de combate ao vetor; possível existência de formas de transmissão sem a participação de flebotomíneos (FERREIRA, 2012).

No Brasil, os protocolos terapêuticos para cães têm sido avaliados durante os últimos anos, mas o tratamento de cães infectados não é recomendado devido ao risco potencial para a saúde pública (HOLLAND et al., 2002). Estudos demonstram que o tratamento medicamentoso em cães infectados não é capaz de alcançar a cura parasitológica, devido à permanência de infecção latente em algumas células (BANETH; SHAW, 2002; NOLI; AUXILIA, 2005). Este fato está relacionado à inabilidade dos antimoniais em promover cura parasitológica no cão, mantendo a transmissão do parasito para flebotomíneos devido à permanência do parasitismo dérmico, mesmo após a terapêutica (GUARGA et al., 2002). Desta forma, o cão possivelmente comporta-se como um reservatório do parasito favorecendo a seleção de cepas resistentes aos medicamentos.

Diante das dificuldades operacionais de combate à LV, especialmente nas regiões urbanas, tornam-se necessários mais investimentos na área técnico-científica e aperfeiçoamento das estratégias de controle e vigilância da doença. Todas as medidas de controle devem ser integradas de modo que elas possam ser mais efetivas (ELKHOURY, 2005). Neste sentido, é essencial a utilização de ferramentas que possam contribuir nos estudos e inquéritos epidemiológicos, como a coleta não invasiva, fácil e prática de espécimes biológicas; que pode ser utilizada em larga escala e não precisa de profissional especializado.

O presente trabalho buscou contribuir com novas abordagens de investigação diagnóstica, visando disponibilizar para sociedade uma ferramenta valiosa no controle da leishmaniose visceral canina, bem como em novos delineamentos para as medidas de vigilância que poderão ser utilizadas pelos órgãos sanitários competentes no controle canino.

2 JUSTIFICATIVA

Com a introdução da biologia molecular na detecção e caracterização de agentes patogênicos, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos, com resultados bastante animadores, principalmente no que concerne à identificação e caracterização das espécies de *Leishmania*. Estudos têm demonstrado que podem existir graus variados de virulência e que pacientes infectados podem responder diferentemente ao tratamento quimioterápico, de modo que a caracterização desse parasito torna-se essencial nas investigações clínicas e patológicas da leishmaniose visceral (PETERS et al., 1983). Além disso, o conhecimento das espécies de *Leishmania* é extremamente importante em regiões onde a leishmaniose visceral e a leishmaniose cutânea (LC) são prevalentes, especialmente, porque foi demonstrado dispersão de *L. (L.) i. chagasi* em áreas endêmicas para *L. braziliensis*, como São Paulo e Rio de Janeiro (MADEIRA et al., 2006; SÃO PAULO, 2009).

Nesse contexto, a PCR vem ganhando bastante destaque (GOMES et al., 2007). A PCR é uma técnica de rápido diagnóstico para a detecção de *Leishmania* spp. e o seu procedimento é suficientemente sensível, específico e reproduzível para uso na confirmação do diagnóstico clínico da LV em animais e em humanos (OZBEL et al., 2000; SILVA et al., 2001).

Roura, Sanchez e Ferrer (1999) demonstraram que a PCR apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100% quando realizada corretamente e Ozbel et al. (2000) relataram que a PCR apresenta sensibilidade superior a pesquisa de parasitas em esfregaços. Adicionalmente, Ikonopoulus et al. (2003) sugerem a utilização da PCR como método de diagnóstico rotineiro da leishmaniose, especialmente a partir de amostras de sangue, uma vez que a correlação deste método com a RIFI foi de 91,8%. Reale et al. (1999) demonstraram que cães sorologicamente negativos apresentaram-se positivos na PCR, e Gomes et al. (2007) observaram que cães negativos ao exame parasitológico, demonstraram-se positivos para *L. (L.) i. chagasi* pela técnica de PCR. E recentemente, Gomes et al. (2007) ressaltaram a importância da PCR no diagnóstico da leishmaniose, em especial, como forma de diferenciar *L. (L.) i. chagasi* e *L. braziliensis*.

É importante ressaltar que, dentro da população canina, pode ocorrer grande variabilidade quanto à resposta imune frente à infecção por *L. infantum*. Existem

cães com altos níveis de anticorpos sendo estes facilmente detectados pelas metodologias disponíveis. Também há animais com claros sinais da doença, porém com sorologia duvidosa ou negativa devido à imunossupressão (FISA et al., 2001). Neste sentido, a combinação da PCR com métodos sorológicos tem sido recomendada para o aumento da eficácia do diagnóstico da LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Além disso, a associação da PCR com a sorologia abre novas perspectivas para a avaliação das relações existentes entre a carga parasitária e a produção de anticorpos no hospedeiro (ALVES, 2009). Pesquisas mais aprofundadas sobre estas variáveis são muito importantes para auxiliar na identificação de possíveis marcadores de doença ou resistência canina à LVC, bem como de processos relacionados ao prognóstico da enfermidade.

Diversos tipos de espécimes clínicos (incluindo sangue, biópsias de pele, linfonodos, medula óssea e baço) são utilizados para detecção de DNA do parasita através da PCR. No entanto, amostras menos invasivas são muito desejáveis, uma vez que dependendo do tipo de coleta e amostra sua obtenção pode ser menos complexa, não requerendo mão de obra especializada, o que facilitaria a amostragem em massa. Um exemplo que tem se mostrado promissor é a utilização do suabe para coleta de amostras biológicas no diagnóstico molecular da LVC. Este método de coleta é fácil e rápido, além de ser um procedimento não invasivo que permite a obtenção de células de diferentes regiões anatômicas do hospedeiro, como as mucosas conjuntivais.

O suabe conjuntival (SC), que utiliza um suabe estéril para retirada de amostras de células epiteliais da conjuntiva de cães, é um método não invasivo e seria uma alternativa no diagnóstico da LVC. Este método já foi testado por alguns pesquisadores e mostrou-se altamente sensível no diagnóstico da LVC por PCR em pacientes sintomáticos (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; GRAMICCIA et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012) e cães assintomáticos (LEITE et al., 2010; DI MUCCIO, et al., 2012).

Esforços devem ser realizados no intuito de confirmar a infecção em cães sorologicamente positivos, através de técnicas de detecção molecular do parasita, que por serem métodos altamente específicos, permitem um diagnóstico mais preciso e também a diferenciação das espécies de *Leishmania* encontradas nas diferentes regiões. O uso do SC facilitaria a coleta e aumentaria o número de amostras para diagnóstico da leishmaniose canina e seria um incentivo a novas

investigações e pesquisas aplicadas, como fontes importantes de informações, para subsidiar o PCLV no Brasil. Com isso, estratégias de controle e de prevenção poderão ser postas em prática de forma mais rápida, racional e efetiva, com o intuito de garantir a proteção do ser humano contra os efeitos deletérios deste parasito.

Sabendo-se da importância da leishmaniose visceral no Brasil e sua expansão, e a importância do cão como reservatório da enfermidade em áreas urbanas, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de utilização da PCR com amostras de DNA extraídos de suabe conjuntival (PCR-SC), provenientes de inquéritos epidemiológicos, para detecção de LVC, comparando com a PCR de sangue (PCR-SG) e com o teste ouro, reação de imunofluorescência indireta (RIFI). E também oferecer uma alternativa eficaz no diagnóstico da LVC, que facilite a coleta de espécimes biológicos para os testes laboratoriais, menos invasiva, que possa ser utilizada no diagnóstico de um grande número de animais em menor espaço de tempo e que apresente boa sensibilidade e especificidade.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de utilização da PCR com amostras de DNA extraídos de suabe conjuntival (PCR-SC), comparando com a PCR de sangue (PCR-SG) e com o teste ouro, reação de imunofluorescência indireta (RIFI), na detecção da LVC. Além disso, comparar, dentro de cada grupo de cães, sintomáticos e assintomáticos, os resultados obtidos na RIFI, PCR-SC e PCR-SG e obter a prevalência de cães positivos na cidade de Ilha Solteira, SP.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO DE TRANSMISSÃO

A Leishmaniose é causada por um protozoário pleomórfico da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Os primeiros casos de leishmaniose visceral, que se tem relato, aconteceram na Índia no ano de 1885 e, somente alguns anos mais tarde, em 1903, é que o agente causador desta enfermidade foi descoberto e descrito por William Boog Leishman e Charles Donovan. William B. Leishman descreveu o parasita, mas associando-o às formas de *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903). Charles Donovan encontrou o parasita em baço de uma criança hindu com febre irregular, mas o confundiu com outro protozoário, o *Trypanosoma brucei*. Após algumas descrições equivocadas, Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e batizou o agente causador do calazar de *Leishmania donovani*, em homenagem a William Boog Leishman e Charles Donovan (PESSÔA; MARTINS, 1988; REY, 2001).

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico heteroxênico, necessitando assim de dois hospedeiros, um vertebrado, representado por canídeos silvestres e domésticos, além de roedores e humanos, e de um invertebrado, representado pelo inseto vetor (SCHLEIN, 1993). *Leishmania donovani* e *L. infantum* são exemplos de espécies causadoras da LV na África, Europa e Ásia e *L.(L.) infantum chagasi* é o agente etiológico encontrado nas Américas. A *L. donovani* é responsável pela infecção em humanos, enquanto que a *L. infantum* e *L.(L.) infantum chagasi* causam LV tanto em humanos quanto em cães (MICHALICK; GENARO, 2005).

As *Leishmanias* são organismos pleomórficos, isto é, nos invertebrados encontram-se as formas paramastigotas e promastigotas, e nos vertebrados a forma aflagelar, denominada amastigota (MICHALICK; GENARO, 2005). São parasitas intracelulares obrigatórios, multiplicando-se nos fagócitos mononucleares do sistema mononuclear fagocítico. As *Leishmanias*, quando são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado pelos flebótomos, invadem os macrófagos e neles se multiplicam. Cerca de três horas pós inóculo, são observados vários neutrófilos e

alguns macrófagos parasitados tanto por promastigotas quanto por amastigotas. Os leucócitos migram progressivamente da pele para outros locais do organismo e se encontram ausentes 24 horas depois (SANTOS-GOMES et al., 2000).

Os hospedeiros vertebrados são representados pelo homem e pelos mamíferos domésticos ou silvestres. A forma flagelar infectante da *Leishmania* é encontrada no aparelho bucal do vetor e as formas amastigotas se multiplicam nas células do sistema mononuclear fagocitário dos mamíferos. Uma vez que o vetor entra em contato com a forma amastigota através da picada no hospedeiro vertebrado, essa forma modifica-se no aparelho digestivo do inseto, até chegar a forma infectante, e pode ser inoculada em outro hospedeiro ou reservatório (GALATI et al., 1997; GONTIJO; MELO, 2004).

A possível participação dos cães no ciclo epidemiológico da LVC começou a ser aventada por Nicolle e Comte em 1908, na Tunísia, a partir da detecção, nos animais, do agente etiológico (NICOLLE; COMTE, 1908).

No Brasil, uma das primeiras observações da infecção canina por *Leishmania* foi realizada por Evandro Chagas quando demonstrou a existência da doença no homem e no cão e a infecção do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*. Neste período o parasita foi classificado como *Leishmania chagasi* (CHAGAS, 1936; CHAGAS et al., 1938). Em 1956, Deane incrimina o cão e a raposa como reservatórios naturais nas áreas de maior expressão da endemia, definindo a doença como uma zoonose (DEANE, 1956b). Em 1958, outros animais foram encontrados infectados com o parasita em florestas do sul do Brasil (DEANE; DEANE, 1962), dando início às primeiras campanhas governamentais sobre as áreas de ocorrência da doença e o controle da LV no Brasil.

A distribuição coincidente de *L. longipalpis* e a presença de LV em quase toda a América Central e América do Sul muito reforçou a convicção dos pesquisadores de que este era o vetor principal da doença (LAINSON; RANGEL, 2005). No Brasil, a transmissão de *L.(L.) infantum chagasi*, principal agente etiológico da LVC, se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, tendo como principal vetor *Lutzomyia longipalpis*. Galati et al. (1997) encontraram *Lutzomyia cruzi* também atuando como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul.

A espécie *L. longipalpis* está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre aves, homem e outros animais silvestres ou domésticos (MONTEIRO et al., 2005).

A primeira demonstração de infecção natural de hamsters (*Mesocricetus auratus*) por picada de flebotomíneo ocorreu em 1931, após observação de que a distribuição do vetor *Phlebotomus argentipes* era coincidente com a distribuição da doença (ADLER; THEODOR, 1931).

É conhecido que a densidade da população de *L. longipalpis* esteja associada ao peridomicílio, sendo este propício para população de vetores, como aqueles com presença de lixo, abrigo de animais, galinheiros, estábulos, arborização abundante, lagos, rios ou matas caducifólias ou caatinga (FORATTINI, 1960; SHERLOCK; GUITTON, 1969).

Consideram-se habitats naturais da *L. longipalpis* as fendas de rochas, as cavernas e o solo úmido rico em matéria orgânica vegetal ou animal em decomposição, os quais são encontrados em abundância em matas. A devastação de áreas silvestres fez com que os vetores e os reservatórios silvestres migrassem para o peridomicílio humano em busca de alimento (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Camargo-Neves et al. (2001) consideram a necessidade de analisar a superfície da densidade vetorial e correlacioná-la com os aspectos ambientais do peridomicílio, tais como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando possíveis abrigos e criadouro para o vetor.

4.2 EPIDEMIOLOGIA

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. A urbanização dessa doença é um fenômeno relatado em diversos países como o Irã (OSHAGHI et al., 2010), Marrocos (BOUSSAA et al., 2005), México (SÁNCHEZ-GARCÍA et al., 2010) e Itália (TARALLO; DANTAS-TORRES; LIA, 2010).

Acredita-se que este novo panorama tenha relação com diversos fatores, como o adensamento populacional nas grandes cidades, o agravamento das desigualdades sociais concomitante com a precariedade das condições de moradia, alimentação e saneamento básico, o grande número de pessoas susceptíveis, numerosos cães vadios e adaptação do inseto vetor ao ambiente urbano. Além

disso, a inadequação dos investimentos em educação e saúde, descontinuidade das ações de controle e fatores associados à resistência do parasito a quimioterápicos e à imunossupressão, como as coinfeções *Leishmania*/HIV, têm sido apontados como causas em potencial da expansão da LV (REITHINGER; DAVIES, 2002; DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004; HARHAY et al., 2011).

Pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo, pouco se conhece sobre a epidemiologia da LVC nos focos urbanos. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas do que no rural.

A relação da LVC com o risco de ocorrência da LVH tem sido tema de intenso debate. Alguns estudos minimizam esta relação ao demonstrarem que a eutanásia em massa de cães soropositivos tem baixo impacto na redução de casos de LVH em regiões endêmicas do Brasil (DIETZE et al., 1997; MILES et al., 1999; COURTENAY et al., 2002). Mais de dois milhões de cães foram examinados no Brasil entre 2002 e 2007 e mais de 160.000 cães soropositivos foram eutanasiados. Entretanto, não se observou uma redução da incidência de casos humanos a níveis razoáveis (LE MOS et al., 2008).

Este fato demonstra que há falhas nas campanhas de controle da LV, e aponta para a necessidade de reavaliação da política de combate à doença no Brasil. Entre as possíveis causas da ineficiência do controle da LV estão as limitações dos testes diagnósticos sorológicos utilizados em larga escala nos inquéritos caninos (BRAGA et al., 1998; MOREIRA JR. et al., 2004; ROSÁRIO et al., 2005), a demora entre a coleta de amostras clínicas caninas, sua análise e a eutanásia dos cães infectados (VIEIRA; COELHO, 1998; COURTENAY et al., 2002; MOREIRA JR. et al., 2004) e a rápida reposição de cães susceptíveis pela população (DYE, 1996; MOREIRA JR. et al., 2004).

Atualmente, diversos países da América do Sul, tais como Argentina e Paraguai, vem apresentando, de forma crescente, relatos da enfermidade em cães e em humanos, entretanto, o Brasil é responsável por 90% dos casos da América Latina (BRASIL, 2010b). Entre os anos de 2000 a 2010, foram notificadas 31.098 pessoas com leishmaniose visceral, em todo território brasileiro, além de ser verificado um aumento nas taxas de letalidade que elevou de três para sete, o número de óbitos em cada 100 indivíduos doentes, com cerca de 200 casos fatais

por ano. A maior parte dos pacientes infectados concentra-se na região nordeste, centro-oeste e sudeste do país (BRASIL, 2010a).

Segundo dados do IBGE, 85% da população do país vive em área urbana, o que cria condições favoráveis para a emergência e reemergência de doenças, entre elas a leishmaniose. Associado a isto há ainda um complexo de fatores, como mudanças ambientais e climáticas, redução dos investimentos em saúde e educação, descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem, fatores pouco estudados ligados aos vetores (variantes genéticas), e dificuldades de controle da doença em grandes aglomerados urbanos, onde problemas de desnutrição, moradia e saneamento básico estão presentes (GONTIJO; MELO, 2004).

Com a ação do homem no meio ambiente, secundária aos desmatamentos, e o crescimento desordenado das cidades, houve a destruição de ecótopos silvestres. A mudança no contexto da doença foi desencadeada pela adaptação de vetores à nova realidade. A devastação de áreas silvestres fez com que os vetores e os hospedeiros silvestres migrassem para o peridomicílio humano em busca de alimento (BARATA et al., 2005). O entendimento das interações entre as mudanças do meio ambiente urbano e os flebótomos é fundamental, visto que a *L. longipalpis* é uma espécie sinantrópica, com alta adaptabilidade ao ambiente doméstico, e considerado um dos fatores mais importantes na cadeia da transmissão da LVC.

O grupo de doenças causadas pelas várias espécies de *Leishmania* é considerado a terceira mais importante infecção transmitida por vetor, ficando atrás somente da malária e da filariose linfática. Está presente em regiões tropicais e subtropicais do velho e do novo mundo, são endêmicas em 88 países, com mais de 350 milhões de pessoas em área de risco. A incidência estimada é de 500 mil novos casos por ano de LVH (DESJEUX, 2004). O número de casos letais por ano da LVH é de 59.000 mortos, entre as doenças parasitárias é superada apenas pela malária (DESJEUX, 2004). Em medicina veterinária, a infecção causada pela *Leishmania infantum* é mais importante na espécie canina (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Até o momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença, o cão é considerado epidemiologicamente o mais importante, pois apresenta um grande parasitismo cutâneo, constituindo-se o principal elo na cadeia de transmissão da doença (BANETH, 2006). Os canídeos podem ser infectados por outras espécies de *Leishmania*, responsáveis pela forma cutânea e mucocutânea da

doença humana (DANTAS-TORRES, 2007; JUSI et al., 2011). Para outras espécies de *Leishmania* o cão não é considerado um importante reservatório da infecção em humanos (DANTAS-TORRES, 2007).

A importância epidemiológica dos cães vem sendo reforçada, uma vez que outros estudos têm evidenciado que a LVC se constitui como um fator de risco para a LVH. Em regiões urbanas, com transmissão recente da LV, foi corroborada a hipótese de que casos caninos da doença precedem casos humanos. Nesses locais, foi comprovada uma associação na distribuição espacial da LV em cães e no homem (BEVILACQUA et al., 2001). O reservatório canino tem sido apontado como fator importante para o surgimento de novos focos da doença (PARANHOS et al., 1998). Uma relação próxima entre as infecções canina e humana, especialmente entre crianças, também já foi relatada em países europeus (SÁNCHEZ et al., 1996; PAPADOPOULOU et al., 2005).

Paralelamente, o flebótomo acabou por encontrar no ambiente urbano um habitat favorável à sua reprodução. Como resultado, o *Lutzomyia longipalpis*, por exemplo, tornou-se muito numeroso nessas regiões, o que tem aumentado o número de casos da doença (WHO, 2007).

A adaptação do vetor aos ambientes urbanos foi concretamente comprovada no Brasil no final da década de 1980. Nesse cenário, os flebotomíneos passaram a ser encontrados em paióis, canis e também no ambiente intradomiciliar. Desde então, muitas cidades brasileiras como Fortaleza (CE), Aracaju (SE), Santarém (PA), Corumbá (MS), Palmas (TO), Araçatuba (SP), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Campo Grande (MS), Montes Claros e Belo Horizonte (MG) vêm apresentando, de maneira preocupante, mais casos autóctones da doença (BRASIL, 2012).

4.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO CÃO

A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso. A LVC é uma doença sistêmica severa cuja manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos

cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2006).

Na LVC o cão desenvolve lesões cutâneas, principalmente descamações e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, ulcerações na pele localizadas frequentemente na orelha, focinho, cauda e articulações, e pelo opaco. Na fase avançada observa-se onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, vômito, hemorragia intestinal, edema de pata e hiperqueratose. Na fase terminal ocorre paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte (BRASIL, 2006).

Os cães resistentes, que podem chegar a uma taxa de 10 a mais de 50% da população de cães infectados, não desenvolvem a doença permanecendo assintomáticos, ou então apresentando cura clínica espontânea (MORENO et al., 1995). Nestes cães a Interleucina 2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) podem desempenhar um papel protetor contra o desenvolvimento da doença clínica (PINELLI et al., 1994). Além disso, esse estado de resistência tem sido associado com o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células T (“cell mediated immunity”, CMI) específica para *Leishmania*, enquanto a doença ativa tem sido associada com altos níveis de anticorpos e uma CMI suprimida (PINELLI et al., 1994; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007).

Os cães são classificados em três grupos, de acordo com os sinais clínicos:

- Cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*.
- Cães oligossintomáticos: presença de adenopatia linfoide, pequena perda de peso e pelo opaco.
- Cães sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores (BRASIL, 2006).

4.4 ASPECTOS PATOLÓGICOS E PATOGÊNESE DA LVC

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (KRAUSPENHAR et al., 2007). O período de 2 a 12 meses é necessário para que um cão infectado desenvolva sinais clínicos, e o período de incubação observado em condições experimentais, pode alcançar 25 meses (OLIVEIRA; SANTORO; SADIGURSKY, 1993). O quadro clínico é variável e depende da resposta imune do cão e da cepa do parasita inoculado pela picada do inseto vetor (MICHALICK; GENARO, 2005). Inicialmente surge febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia (LIMA et al., 2004). Alguns cães curam espontaneamente enquanto que outros evoluem até a morte em poucas semanas (MICHALICK; GENARO, 2005).

A LVC é uma doença crônica, fatal e sistêmica, sendo os principais sinais clínicos no cão representados pela caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; LIMA et al., 2004; BRITO et al., 2004; LANGONI et al., 2005; LINHARES et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007). Na pele, são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal. As preparações citológicas de pele de orelha podem demonstrar a presença de formas amastigotas da *Leishmania* (CIARAMELLA et al., 1997; LINHARES et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007).

A pele é um órgão importante na determinação do progresso da infecção por *Leishmania*. Fondevila, Vilafranca e Ferrer (1997), através da quantificação, por imunocitoquímica, das células de Langerhans, queratinócitos expressando MHC II +, macrófagos, células T e de parasitas, analisaram a resposta imune da pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, e correlacionaram os resultados desta quantificação com diferentes aspectos dermatológicos encontrados (alopecia, descamação, lesões nodulares não ulceradas e dermatose ulcerativa). Na dermatite alopécica, a presença de células de Langerhans e de queratinócitos MHC II + esteve associada com um infiltrado discreto de células T e um número significativo de parasitas. Na pele com lesões nodulares, onde foi detectada ausência de células

apresentadoras de antígenos, houve um infiltrado significativo de parasitas e de macrófagos. A pele com lesões ulceradas mostrou padrões intermediários de inflamação. Neste contexto, a pele com alopecia se mostrou mais eficiente em processar e apresentar antígenos de *Leishmania* do que a pele com lesões nodulares generalizadas.

As lesões hepáticas caracterizam-se por inflamações granulomatosas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, que se encontram albergando parasitas (OLIVEIRA; SANTORO; SADIGURSKY, 1993; XAVIER et al., 2006). Krauspenhar et al. (2007) observaram reação linfohistioplasmocitária marcante e imunomarcção positiva para *Leishmania*.

Nos órgãos linfoides ocorre a proliferação linfoplasmohistiocitária, resultando na linfadenomegalia generalizada (KRAUSPENHAR et al., 2007).

No baço ocorre reação inflamatória crônica e difusa, com macrófagos organizados em granulomas e repletos de amastigotas (XAVIER et al., 2006).

Os linfonodos podem conter lesões hipertróficas nas regiões corticais e medulares com amastigotas dentro de macrófagos medulares (LIMA et al., 2004).

Na medula óssea, como em outros órgãos linfoides, é característica a hipertrofia e a hiperplasia das células (TAFURI et al., 2001; KRAUSPENHAR et al., 2007). A hipoplasia e aplasia medular podem resultar em anemia e trombocitopenia.

O coração pode apresentar miocardite multifocal com inflamação linfohistioplasmocitária acentuada, acompanhada por necrose e degeneração das fibras miocárdicas. A presença e envolvimento do parasita como sendo a causa de tais lesões foi evidenciada por técnicas de imunomarcção (FERRARI et al., 2006).

Nos rins, a deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode acarretar em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial com comprometimento da função renal (LOPEZ et al., 1996), muitas vezes sendo a principal causa de morte de cães com leishmaniose. A nefropatia pode ser causada pelo infiltrado de células T CD4+ detectadas na região glomerular e intersticial dos rins de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (COSTA et al., 2000). A insuficiência renal pode estar presente em cães sem os sinais clínicos sistêmicos de leishmaniose (CIARAMELLA et al., 1997).

Lesões oculares como ceratoconjuntivite, blefarite, inflamação mononuclear plasmocitário do trato uveal e edema de córnea, formação de sinéquia, lesões em corpo ciliar e íris podem estar associado a depósito de imunocomplexos nestas

áreas, fato que pode ser corroborado pela presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em vários tecidos intraoculares, podendo significar lesões de origem imunopatológica (GARCIA-ALONSO et al., 1996; CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; BRITO et al., 2004).

No intestino é observada diarreia crônica e melena, devido às ulcerações na mucosa gástrica intestinal. Colite ulcerativa e erosiva também pode estar presentes (FERRER, 1999). As inflamações do trato intestinal podem alcançar desde a mucosa até a muscular da submucosa (LUVIZOTTO, 2006).

Na leishmaniose canina pode ocorrer acometimento de hemorragias devido a hiperglobulinemia (que interfere na formação da malha de fibrina), sequestro esplênico de plaquetas, hipoplasia medular, vasculite por imunocolplexos, uremia (dificultando a atividade plaquetária) (LUVIZOTTO, 2006) e epistaxe (provavelmente por lesões na cavidade nasal) (FERRER, 1999).

Os estudos concernentes às alterações neurológicas associadas com LV em humanos podem ter os cães como bons modelos. Os cães doentes podem apresentar, além dos sintomas clássicos de LVC, alterações neurológicas tais como letargia, convulsões, mioclonias, nistagmo, tremores, paralisia de mandíbula, ptose labial, andar em círculos, tetraparesia e rigidez raquial e cervical. Os sintomas neurológicos na LVC estão associados à inflamação meningial crônica com infiltrado linfoplasmocitário (VIÑUELAS et al., 2001). Altos níveis de anticorpos contra *Leishmania* são encontrados no líquido cefalorraquiano vindos, provavelmente, da circulação sanguínea através do rompimento da barreira hematoencefálica ocasionado pelo parasito (LIMA et al., 2003).

A LVC também pode manifestar lesões osteolíticas e osteoproliferativas de diáfises ósseas com sinais de atrofia muscular (BURRACO; ABATE; GUGLIELMINO, 1997; SOUZA et al., 2005).

Os pulmões apresentam quadro de pneumonia intersticial crônica e difusa com infiltrado linfoplasmocitário (LUVIZOTTO, 2006).

A desordem imunológica pode originar doenças oportunistas concomitantes à LVC como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, malasseziose, dermatofitoses, demodicose e ainda coinfeções com outros agentes, como *Babesia* e *Dirofilaria* (LUVIZOTTO, 2006).

4.5 DIAGNÓSTICO

4.5.1 Diagnóstico Direto

Até a década de 30, o diagnóstico canino era realizado por meio dos exames diretos, através da punção de fígado, baço e raspados de pele. Esses métodos, entretanto, apresentavam limitações, pois apesar da grande especificidade, possuíam baixa sensibilidade (GONTIJO; MELO, 2004).

A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório (ALVAR et al., 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). Porém, a sensibilidade desse método é bastante baixa e dependem do tipo de material biológico colhido, grau de parasitemia e tempo de leitura da lâmina (GENARO, 1993).

Cultivos de diferentes materiais clínicos como punções de medula óssea, linfonodos, baço e fígado podem ser adicionados aos meios de cultura para isolamento do parasito. Para este fim, distintos meios de cultura podem ser utilizados, uma vez que diferentes espécies ou cepas de *Leishmania* têm diferentes taxas de crescimento e/ou requerimentos nutricionais. O material semeado em cultura é armazenado sob condições controladas de temperatura e periodicamente analisados ao microscópio óptico para a identificação de formas promastigotas do parasito crescendo no meio (EVANS, 1989).

Materiais de biópsia ou aspirados podem ainda ser inoculados em animais de laboratório, geralmente hamsters (*Mesocricetus auratus*), para verificação posterior do desenvolvimento da doença nestes animais. Com isso, o parasito pode ser posteriormente recuperado a partir de biópsias ou necropsia do animal experimentalmente infectado (HERWALDT, 1999).

A imunistoquímica, por sua vez, é considerada um teste parasitológico de detecção indireta do parasito para o qual se utilizam anticorpos anti-*Leishmania* ligados a conjugados marcados. A presença do agente etiológico é revelada por meio de uma reação enzimática em preparações histológicas com colorações

específicas (HOFMAN et al., 2003, XAVIER et al., 2006). Esta técnica tem revelado um aumento na sensibilidade e especificidade do diagnóstico e ainda tem a vantagem de permitir uma análise quantitativa. Por isso, a imunistoquímica pode ser utilizada para acompanhamento da evolução da doença e de tratamentos específicos em animais infectados (TAFURI et al., 2004; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010).

O xenodiagnóstico também pode ser utilizado, embora sua aplicação seja muito restrita. Neste caso, é preciso dispor de uma colônia bem estabelecida de flebotômíneos, os quais são induzidos a realizar repasto sanguíneo, sob condições controladas, em animais supostamente infectados. Após um período determinado, os insetos são dissecados e analisados a fresco para identificação do parasito. Sua utilização é mais comum na pesquisa acadêmica e é especialmente importante para investigação de questões epidemiológicas acerca do papel de hospedeiros como possíveis reservatórios. No entanto, seu uso não é indicado para rotina (MAIA; CAMPINO, 2008).

As punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala, e muitas vezes são também inadequados para diagnósticos individuais (SUNDAR; RAI, 2002).

O diagnóstico molecular é outro tipo de método parasitológico e é baseado na detecção de sequências de DNA específicas do parasito sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a principal técnica utilizada. Esta metodologia tem demonstrado alta sensibilidade, superando, em diversos estudos, as outras técnicas convencionais de diagnóstico da LVC. Sua robustez também tem sido demonstrada com alta especificidade de acordo com o tipo de oligonucleotídeo utilizado (REALE et al., 1999; SILVA et al., 2001; MANNA et al., 2004; STRAUSS-AYALI et al., 2004).

4.5.2 Diagnóstico Indireto

A LV é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, resultando em hipergamaglobulinemia ou grande produção de anticorpos. Isso

facilita o diagnóstico através de testes sorológicos, evitando os métodos parasitológicos, que são menos sensíveis.

Diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LVH e LVC. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Os testes têm limitações, podem permanecer positivos durante longo tempo após o tratamento, não permitindo avaliação do efeito da terapia e podendo ocorrer reações cruzadas com outras doenças. Como há infecções subclínicas, um teste positivo necessariamente não indica doença ativa. Os clínicos e os epidemiologistas sempre solicitam exames sorológicos para confirmar o diagnóstico e esperam que os resultados sejam confiáveis, sendo a especificidade e sensibilidade dos testes características essenciais para isto (GONTIJO; MELO, 2004).

A RIFI começou a ser utilizada a partir da década de 60. Esta reação apresentava sensibilidade variando de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80%, devido a reações cruzadas com Doença de Chagas, leishmaniose cutânea, e erliquiose (EL AMIN et al., 1986; ANDRADE et al., 1987; DA COSTA et al., 1991; BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; PORROZZI et al., 2007). Entretanto, trabalhos mais recentes provaram que a RIFI não apresenta reação cruzada com *Ehrlichia canis* ou *Babesia canis* (GUILLÉN LLERA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008). Outros trabalhos também demonstram que a RIFI apresenta baixa sensibilidade na detecção de animais assintomáticos (METTLER et al., 2005; QUEIROZ et al., 2010).

A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, vários trabalhos avaliando o teste de *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), assim como suas diversas variações metodológicas (HOMMEL et al., 1978; PAPPAS et al., 1983; CABRERA et al., 1999). A utilização de antígenos recombinantes (rA2, rK9, rK26 e rK39) e purificados de glicoproteínas de membranas (gp63, gp72 e gp70), aumentaram a sensibilidade e a especificidade da técnica ELISA (BOARINO et al., 2005; PORROZZI et al., 2007).

O *Direct Agglutination Test* (DAT), citado como um método alternativo para o diagnóstico da LV, foi descrito pela primeira vez em 1975 e adaptado para o diagnóstico da infecção canina no final da década de 80 (EL SAFI; EVANS, 1989). Em trabalhos comparativos entre ELISA, RIFI e DAT, este último demonstrou semelhante sensibilidade e especificidade quando comparado aos outros testes (EVANS et al., 1990; DA SILVA et al., 2006).

As metodologias RIFI e ELISA, são utilizadas nos inquéritos populacionais caninos, nas áreas endêmicas do Brasil, onde a prevalência da LV é a maior das Américas (DIETZE, 2006). Para triagem da infecção é utilizado o ELISA, por ser um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (EVANS et al., 1990).

A eficiência destes testes pode diminuir quando essas técnicas são utilizadas em regiões onde é comum a existência de animais imunossuprimidos (FISA et al., 2001). Além do mais, a sensibilidade da detecção de anticorpos é geralmente baixa em infecções recentes e animais assintomáticos (LEONTIDES et al., 2002). Um resultado positivo de RIFI em um cão clinicamente suspeito assume grande relevância. Por outro lado, um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção, pois existe a possibilidade de existir alguns animais capazes de desenvolver imunidade celular predominante sobre a imunidade humoral (CABRAL et al., 1998; PINELLI et al., 1994).

Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis. Estes antígenos apresentam reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae, e mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes (SUNDAR; RAI, 2002). Oliveira et al. (2008) demonstraram não haver reação cruzada entre *Leishmania* spp., *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*. Entretanto, no diagnóstico sorológico da LVC é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças, como a leishmaniose cutânea.

Estudos já demonstraram que mais de uma espécie de *Leishmania* pode infectar um animal (MADEIRA et al., 2006), e na sorologia as espécies que causam a leishmaniose tegumentar podem reagir positivamente à *L. (L.) i. chagasi*, sendo indicada a realização de métodos complementares para investigação dos animais soropositivos. Além disso, temos ainda a resistência dos proprietários à remoção de seus cães, pois estes não entendem porque cães aparentemente saudáveis, mas sorologicamente positivos devam ser condenados à morte. Muitos proprietários burlam o sistema de vigilância escondendo seus cães ou transferindo-os para outras áreas, mantendo assim uma fonte de infecção para flebotomíneos. Diante do exposto, ferramentas moleculares podem confirmar o diagnóstico, pois permitem a

identificação do DNA do protozoário em amostras biológicas (HEADINGTON et al., 2002; ADHYA, et al., 2002).

4.5.3 Métodos Moleculares como Instrumento Epidemiológico e Diagnóstico da LVC

A partir da década de 80, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura.

Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA, e PCR para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasita. Diferentes tipos de amostras biológicas tais como aspirados esplênicos, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel-filtro, podem ser utilizados como fonte de material para as reações (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003).

Embora diferentes métodos moleculares tenham sido avaliados com sucesso para o diagnóstico da leishmaniose, os ensaios de PCR atualmente constituem o principal diagnóstico molecular empregado por pesquisadores e profissionais da área.

A hibridização do DNA foi o primeiro método de biologia molecular desenvolvido para diagnóstico. Sua especificidade é alta, mas sua sensibilidade é baixa (WEISS, 1995).

O melhor alvo para PCR e para as sondas de DNA tem sido o DNA presente nos minicírculos do kDNA, genes que codificam o cinetoplasma, da região conservada, ou a amplificação do minicírculo completo (GONTIJO; MELO, 2004). Isto se deve principalmente ao fato de os minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) terem aproximadamente 10000 cópias por célula (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; SMYTH et al., 1992).

Muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso da PCR para o diagnóstico de LV utilizando o sangue periférico, considerando que a biópsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente

hospitalar (LACHAUD et al., 2001). Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR é mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina (SOLANO-GALLEGO, 2001). Para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo (GONTIJO; MELO, 2004).

Na era pós-genômica há um número crescente de sequências de nucleotídeos de DNA de *Leishmania*, obtidos não só no projeto genoma, mas também de trabalhos individuais. Esses dados podem ser utilizados para estudar a função de diversos genes, esclarecer aspectos da relação hospedeiro/parasita e eventualmente ser utilizados como instrumento de diagnóstico e ainda indicar possíveis alvos quimioterápicos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) possui diversos formatos, que são amplamente classificados em “high-tech”, “mid-tech” e “low-tech”, com diferentes tipos de abordagens. O tipo mais utilizado nos laboratórios é de média tecnologia (“mid-tech”), que compreende a PCR convencional, a qual utiliza eletroforese para separar os fragmentos amplificados, e eventualmente a PCR-RFLP, que é feita com enzimas de restrição para clivar o fragmento em questão (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Os métodos de alta tecnologia (“high-tech”), como são chamados os ensaios de PCR em tempo real, estão cada vez mais frequentes conforme avançam as pesquisas. Nesse tipo de teste, os produtos são analisados conforme vão sendo amplificados. Apesar de ainda ser mais oneroso, tem menor risco de contaminação e é mais específico e capaz de quantificar exatamente a quantidade de DNA existente na amostra. (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Uma alternativa a ser usada em laboratórios com pouco equipamento e menos recursos financeiros são as técnicas de baixa tecnologia (“low-tech”), por exemplo, o LAMP, do inglês “loop mediated isothermal amplification”. É um ensaio de PCR simplificado, no qual são necessários basicamente dois principais passos para a reação, identificação/amplificação e detecção dos produtos. É preciso apenas banho-maria para amplificação, que é isotérmica, e a detecção pode ser feita visualmente usando o SYBR-green, o qual se torna verde na presença de produto amplificado, ou permanece laranja na ausência. O método se mostrou bastante

sensível na detecção de *Trypanossoma brucei* (KUBOKI et al., 2003). Entretanto ainda não tem sido muito utilizado na detecção de *Leishmania*.

Existem várias questões a serem levadas em conta na utilização de práticas moleculares para detecção de leishmaniose, é importante saber se a PCR é um teste sensível e específico o bastante na detecção do parasita, independente da espécie. Este tipo de exigência é importante antes de iniciar qualquer tipo de tratamento, ou conduta com o animal, na obtenção de um diagnóstico diferencial preciso.

A PCR tem demonstrado resultados consistentes quando comparado a outros testes diagnósticos como microscopia, cultura do parasita, e principalmente quando é utilizado em amostras com baixa quantidade do parasita como sangue (GARCIA et al., 2005) e células conjuntivais (STRAUSS-AYALI, et al., 2004). Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente.

A contribuição da PCR aparece também como particularmente relevante para o diagnóstico de leishmaniose em pacientes humanos coinfectados com o vírus HIV (CRUZ et al., 2002; BOSSOLASCO et al., 2003; DE DONCKER et al., 2005).

A quantidade de parasita nos diversos tecidos biológicos do animal ou humano também pode ser avaliada pelo PCR, essa ferramenta é bastante relevante para o monitoramento do paciente, avaliando a progressão da doença e verificando a eficácia da terapia contra *Leishmania*, no Brasil permitida apenas em humanos. Alguns protocolos de PCR em tempo real atende a esse tipo de expectativa, tem a amplificação quantificada e são altamente sensíveis, capazes de detectar uma quantidade ínfima do DNA do parasito (MARY et al., 2004).

As técnicas moleculares também são importantes no diagnóstico da leishmaniose, pois permitem a diferenciação das diversas espécies de *Leishmanias* existentes. Isto é relevante pois são necessários tratamentos diversificados de acordo com a espécie que acomete o paciente humano, e no caso dos cães se for acometido com (*L.*) *Leishmania infantum chagasi* a medida indicada é a eutanásia.

Nos estudos epidemiológicos também são importantes os testes de PCR, e outras ferramentas moleculares como os marcadores moleculares; assim pode-se analisar a sequência genética dos vários tipos de cepas de *Leishmanias*, relacionando-os com o comportamento virulento, mutações gênicas, resistência a

drogas, origem filogenética, filogeografia, e a sua implicância no controle e profilaxia da doença.

O maior consenso na pesquisa, desenvolvimento e implementação de métodos moleculares é o leque de padronização e o controle de qualidade, os estudos vem sendo feitos aleatoriamente, e são poucos os trabalhos que comparam protocolos. Deve-se levar em conta que a comparação entre as diversas técnicas devem ser feitas com o máximo de cuidado possível, considerando o contexto clínico do estudo e critério clínico laboratorial para considerar os casos e não casos.

4.6 CONTROLE

As ações de controle da LVC preconizadas no Brasil incluem o diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos; controles químicos do vetor e controle do reservatório canino através de inquéritos sorológicos amostrais ou censitários seguidos da eutanásia dos cães soropositivos e atividades de educação em saúde.

Ao longo dos anos, a aplicação, muitas vezes, apenas parcial destas ações não proporcionou a redução da incidência da LVC no país (BRASIL, 2003). O controle do reservatório canino tem sido um dos temas mais estudados e controversos quanto sua contribuição na redução da incidência da LVH e LVC (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

A recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) quanto à identificação e sacrifício do cão está respaldada, dentre outras, na consideração de que esse animal é um importante reservatório para LVH. Portanto, se a doença canina precede a humana, conseqüentemente, colabora para a sua disseminação.

Esta estratégia, entretanto, tem apresentado resultados controversos, demonstrando que muitos aspectos relacionados ao papel do cão na epidemiologia da LV ainda são desconhecidos, sugerindo a necessidade de uma reformulação das medidas empregadas para o seu controle (SILVA et al., 2005).

Um aspecto importante que provavelmente está associado com o insucesso do controle da LVC, segundo De Paula et al. (2003), se refere aos critérios usados para a seleção dos cães a serem sacrificados, que se baseia no diagnóstico pelas técnicas sorológicas como RIFI e ELISA e mais recentemente, o teste

imunocromatográfico. Essas metodologias podem apresentar baixa sensibilidade e especificidade, acarretando taxas de infecções subestimadas e consequentemente permitindo a manutenção de animais infectados nas áreas endêmicas.

Atualmente, deve-se considerar a relação homem-cão na sociedade, e tendo em vista que esses animais tem se transformado em verdadeiros “membros” da família, o sacrifício de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, muitas vezes assintomáticos, torna-se cada vez mais inaceitável e de difícil execução.

O impacto da remoção dos cães soropositivos para leishmaniose, no Brasil, tem sido questionado por vários autores devido a sua eficácia dúbia, custo e resistência dos proprietários a aderir ao controle (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). Além disso, após a eutanásia do cão soropositivo, ele é repostado pela população quase imediatamente, interferindo no controle, pois estes novos animais tornam-se infectados em aproximadamente dois meses, dificultando ainda mais o controle dos reservatórios (DYE, 1996; MOREIRA JR. et al., 2004). Outra suposta razão para a falha nesta medida é a demora entre a coleta da amostra biológica, sua análise e a eutanásia dos animais infectados (BRAGA et al., 1998; VIEIRA; COELHO, 1998; MOREIRA JR. et al., 2004).

Uma alternativa para o controle da doença é a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina, cujo efeito dura aproximadamente 34 semanas, e protegeu 96% dos cães contra as picadas dos flebotomíneos, conforme citado em um estudo realizado na França por Killick-Kendrick et al. (1997), corroborado por Reithinger et al. (2004) em estudo no Brasil. O uso dos colares em todos os cães reduziria o contato entre o vetor e este reservatório de maneira significativa para diminuir o risco de infecção tanto no homem quanto no cão (LAINSON; RANGEL, 2005).

Estudos realizados na Amazônia por Courtenay et al. (2007) demonstraram que mosquiteiros impregnados com inseticida tiveram um ótimo impacto na proteção humana contra as picadas do vetor *L. longipalpis*. Esta medida já foi empregada em outras regiões do mundo com bons resultados, sendo uma boa alternativa no controle da LVH, pois além de ser um método mais econômico e eficaz no combate ao vetor, é duradouro, permanecendo por cinco anos, evitando assim o uso convencional de borrifações (DESJEUX, 2004).

O desenvolvimento de novas drogas e vacinas, melhores diagnósticos e o acesso aos proprietários e pacientes a todos esses benefícios, são os principais

desafios para o controle da LVC e LVH. Portanto, o investimento em pesquisas é necessário para minimizar os problemas com doenças negligenciadas, como é o caso das leishmanioses.

Neste contexto, para um melhor controle da LVC é necessário o emprego de testes diagnósticos com maior acurácia e capazes de identificar todos os animais que são fonte de infecção para o vetor. Particularmente aqueles que se encontram entre o período de infecção e o início da infecciosidade, reduzindo efetivamente a transmissão da doença pelos flebotomíneos. Também é evidente a necessidade de reavaliação da política de controle canino no Brasil (COSTA; VIEIRA, 2001; COURTENAY et al., 2002).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Métodos de diagnóstico para a LVC foram avaliados em cães provenientes do município de Ilha Solteira (20° 25' 58" S e 51° 20' 33" O), localizado na Região Noroeste do Estado de São Paulo (IBGE, 2007), considerado endêmico para Leishmaniose Visceral Canina. No estudo foram utilizadas amostras de 213 cães, coletadas em parceria com Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, Associação Protetora dos Animais de Ilha Solteira (APAISA) e Universidade Estadual Paulista – UNESP - Ilha Solteira.

A coleta foi conduzida durante inquérito epidemiológico realizado no município. A amostragem foi realizada no período de julho à agosto de 2011.

Para a realização deste trabalho, foram coletados dois tipos de amostras clínicas: sangue e suabe conjuntival.

Durante a coleta foi avaliada a condição clínica de cada cão e a presença de manifestações compatíveis com LVC. Diante da complexidade do quadro clínico, os animais foram classificados em dois grupos; sem sinal clínico, e com sinal clínico.

Os animais com sinais clínicos foram assim classificados, pois apresentavam manifestações aparentes características da doença, como alterações tegumentares, apatia, linfadenomegalia, pelame seco, alopecia, escamas, onicogrífose, erosões, úlceras, prostração, caquexia, dentre outras. Os animais classificados em sem sinal clínico foram aqueles sem qualquer manifestação clínica aparente.

Dessa forma, todos os cães com as diferentes condições clínicas foram submetidos aos testes diagnósticos: RIFI, PCR de sangue e PCR de suabe conjuntival.

Para o teste de PCR de suabe conjuntival, foi estabelecido um consenso: as amostras foram consideradas positivas, quando em pelo menos um dos dois olhos era positiva no PCR-SC; e considerado negativo quando o PCR-SC era negativo para os dois olhos.

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi apresentado à “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolado sob o número 2203/2011, e aprovado em reunião do dia 04 de maio de 2011.

5.3 AMOSTRAS CONTROLE DE *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Foram utilizados como controles negativos dos testes de imunodiagnóstico soros de cães da cidade de Pirassununga – SP, saudáveis, com diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular negativo para leishmaniose. Soros de cães oriundos de região endêmica para leishmaniose visceral, Ilha Solteira - SP, e com diagnóstico positivo para *L. (L.) i. chagasi* por exames parasitológicos, sorológicos e moleculares, foram utilizados como amostra de sangue (DNA) e soro de referência positivos.

5.4 DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE CANINA EM ILHA SOLTEIRA

O número de amostras (n) foi calculado estatisticamente com base no total de habitantes e no número estimado de cães existentes no município (MEDRONHO et al., 2009). A população humana de Ilha-Solteira-SP corresponde a aproximadamente 24.000 habitantes. Levando-se em conta o cálculo de 1 cão para cada 10 habitantes, estima-se a população canina em 2.400 animais. Para uma população de 2.500 indivíduos, com um intervalo de 95% de confiança, erro relativo de 0,07 e prevalência presumida de 50%, o cálculo de prevalência poderia ser feito em uma amostragem de 195 indivíduos (MEDRONHO et al., 2009).

Para determinar a prevalência sorológica, o número de cães positivos pela RIFI, encontrados em Ilha Solteira - SP, foi dividido pelo número de animais testados. Na prevalência molecular pelo suabe conjuntival, o número de animais com diagnóstico positivo pela PCR com amostras de suabe conjuntival foi dividido pelo número de animais testados e a da mesma forma, o cálculo foi feito para os animais positivos pela PCR de sangue total (MEDRONHO et al., 2009).

5.5 AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES

5.5.1 Sangue Periférico

Foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue, sendo que uma parte foi acrescida de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na proporção de 1 mg/mL de sangue e utilizada nas reações de PCR, e outra parte foi empregada na detecção de anticorpos anti-*L. (L.) i. chagasi* pela RIFI.

5.5.2 Suabe Conjuntival

Para as coletas não invasivas, de células epiteliais foram utilizados suabe estéreis manufaturados para uso em isolamento bacteriológico. Na conjuntiva inferior de ambos os olhos de cada cão, esfregou-se um suabe estéril para a coleta de células esfoliativas. As extremidades destes suabes foram separadas e acondicionadas em microtubos de 1,5 ml livres de DNase e RNase. Estes foram armazenados em gelo e, logo após, foram mantidos a 4°C até seu processamento.

5.6 EXTRAÇÃO DE DNA

5.6.1 Extração de DNA dos suabes conjuntivais

A extração de DNA a partir dos suabes foi conduzida de acordo com Ferreira et al. (2008). Uma mistura de 300 μ L de proteinase K (250g/mL) e Triton X-100 (1%) em tampão de lise (Tris 50mM, NaCl 50mM e EDTA 10Mm [pH = 8,0]) foi adicionada a microtubos de poliestireno esterilizados contendo as extremidades contaminadas artificialmente dos suabes. Tais amostras foram incubadas por 2h a 56°C. A remoção dos contaminantes foi realizada mediante três lavagens com 500 μ L de fenol e clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) em microtubos de 1,5ml. Nas duas primeiras lavagens, foram utilizados 75% e 50% de fenol respectivamente e a última foi realizada com 100% de clorofórmio-álcool isoamílico. Após cada lavagem, as misturas foram centrifugadas a 12.000g por 5min. O DNA foi precipitado com 50 μ L de isopropanol e foi lavado com 250 μ L de etanol 75%. Após centrifugação, a fase contendo DNA foi suspensa em água deionizada. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

5.6.2 Extração de DNA do sangue

A extração de DNA do sangue total dos animais foi realizada utilizando-se a técnica de *salting out* descrita por John et al. (1991) e modificada por Lahiri; Nurnberger (1991) com modificações. Cerca de 300 μ L da amostra de sangue coagulado e tratado para a dissolução do coágulo foram transferidos para microtubos de 1,5mL e a eles foram acrescentados 1,0mL de solução de RBCL (*red blood cell lysis*), composta por sacarose, triton X, MgCl₂6H₂O (1M), Tris pH = 7,5 (1M) e água ultrapura, ao invés de 800 μ L mencionados no protocolo original, para a eliminação total de hemácias. Os microtubos foram agitados por 15 minutos, ao invés de apenas alguns segundos, e centrifugados por 2 minutos a 14.000g. O sobrenadante foi descartado e o processo se repetiu até a obtenção de um

precipitado claro, sem vestígios de hemoglobina. Após esta etapa, foram adicionados às amostras 80µL de tampão de proteinase K[®], 40µL de proteinase K[®] 20U/mg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20µL de SDS[®] (sulfato dodecil de sódio, Sigma Chemical CO, Steinheim, Germany) a 20v/v e 240µL de água ultrapura, com homogeneização em Vortex por 15 segundos. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 56°C por 40 minutos, com uma leve agitação em Vortex aos 20 minutos e, retirados após esse tempo, a fim de atingirem a temperatura ambiente. Foram adicionados 100µL de solução saturada de NaCl (6M), com agitação em Vortex e centrifugação por 5 minutos a 14.000g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 100µL de NaCl (6M), o qual foi centrifugado por 5 minutos a 14.000g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, ao qual foram acrescentados 800µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram vertidos e invertidos, gentilmente, por várias vezes, para a precipitação do DNA e centrifugados a 14.000g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500µL de etanol 70% gelado, foram acrescentados às amostras, o que foi seguido de mais uma centrifugação de 14.000g por 2 minutos. Depois do sobrenadante desprezado, os microtubos foram incubados por 15 minutos (ou até secagem total do microtubo) à temperatura de 56°C, seguido de hidratação do DNA com 50µL de água ultrapura. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

5.7 PCR

A amplificação dos fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) conservados do minicírculo do cinetoplasto, foi realizada pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. descrito por Rodgers; Popper; Wirth (1990): 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3' e, como enzima da reação, a polimerase Platinum[®] Taq (Invitrogen-Carlsbad-Califórnia). A mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5µL de tampão (200mM Tris-HCl; 500mM KCl, pH = 8,4), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de dNTP's (10mM cada), 1,5µL de cada primer (10pmol/µL), 0,15µL de Taq (5 U/µL), quantidade suficiente de água ultrapura para completar 22,5µL e 2,5µL de DNA (10ng/µL), totalizando um volume final de

25µl. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador com ciclos de: Desnaturação Inicial: 94°C (3 min); e 35 ciclos: D: 94°C (40 seg); A: 56°C (30 seg); E: 72°C (30 seg); E final: 72°C (5 min). Como controle positivo das reações, foi utilizado uma amostra de DNA extraído de *L.(L.) i. chagasi* isolada no laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-Unesp – Jaboticabal, e água deionizada estéril como controle negativo.

5.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Após a amplificação, 10µL dos produtos de PCR das amostras foram misturados a 5µL de tampão de amostra (Tris 10mM, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,005% m/v e glicerol 10% v/v) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado em solução de brometo de etídio. Foi utilizado como marcador de peso molecular fragmentos múltiplos de 100pb. A corrida foi realizada em tampão TBE 1X, sendo aplicada uma diferença de potencial de 100V. Para visualizar o resultado o gel foi exposto à luz ultravioleta em um transiluminador. As sequências alvo amplificadas apresentaram 120 pares de base (pb).

5.9 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A RIFI foi realizada conforme técnica descrita por Oliveira et al. (2008). O antígeno, preparado com formas promastigotas de *L. (L.) i. chagasi* mantidas *in vitro*, foi adicionado a pequenos círculos, previamente demarcados em lâminas de microscopia, mantidas a -20°C até o momento do uso.

No momento da realização do teste, as lâminas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente por quinze minutos. Foram depositados aproximadamente 10µL de cada amostra de soro diluída a 1:40 (ponto de corte do teste) em PBS pH = 7,2, reservando-se dois poços para a adição de amostras de soros controle positivo e negativo. O conjunto foi incubado a 37°C em câmara úmida por 30 minutos e as lâminas lavadas 3 vezes, de cinco minutos cada, em solução de

PBS pH = 7,2. Posteriormente, foram adicionados de 10 µL do conjugado anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma catalog n-F7884), diluído conforme orientação do fabricante. Em seguida, nova incubação e lavagens foram realizadas e a lâmina preparada para leitura com glicerol tamponado e lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência e a positividade da reação implicou na observação da fluorescência dos parasitas, comparada a amostras controle positivo e negativo, presente na mesma lâmina.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Microsoft Office Excel foi o aplicativo usado para a construção do banco de dados, contendo características clínicas e resultados dos exames laboratoriais dos cães. A análise estatística foi realizada pelo programa estatístico Minitab. Foram calculadas sensibilidade, especificidade e respectivos intervalos de confiança de 95% para todos os testes estudados.

Para calcular a concordância entre as PCRs de sangue e suabe com o padrão ouro (RIFI), foi utilizado o conjunto de diretrizes descrito por Landis; Koch (1977): $k < 0$, sem concordância; $k = 0$ a $0,2$, fraca; $k = 0,21$ a $0,40$, discreta; $k = 0,41$ a $0,60$, moderada; $k = 0,61$ a $0,80$, substancial; e $k = 0,81$ a $1,00$, quase perfeita.

Para análise estatística dos resultados, foi utilizado o método o Qui-quadrado de Pearson com nível de significância de 5%. Para isso, foram utilizadas tabelas 2 X 2 e o teste RIFI foi utilizado como padrão ouro para obtenção das medidas de acurácia citadas. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

Os diferentes testes diagnósticos foram confrontados dois a dois. Assim, foi verificado se houve ou não diferença significativa entre os resultados obtidos nos testes utilizados.

A fórmula utilizada para calcular o kappa ajustado foi:

$$K = \frac{C - C_0}{1 - C_0}$$

Onde C é a concordância (percentual) observada e C_0 é a concordância esperada pelo acaso.

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram obtidas amostras de sangue e suabe conjuntival de 69 cães da Associação Protetora de Animais e 144 de cães do bairro Jardim Novo Horizonte, durante inquérito soroepidemiológico realizado pela prefeitura da cidade de Ilha Solteira - SP, a coleta ocorreu no final de julho, e início de agosto de 2011, totalizando 213 cães.

Foram coletadas 213 amostras de suabe conjuntival de cada olho do animal (total de 426 amostras); e 213 amostras de sangue periférico.

As figuras 1 e 2 exemplificam como foram as coletas de sangue e suabe conjuntival dos cães.

A coleta do suabe conjuntival demonstrou-se mais prática, fácil, e menos invasiva quando comparada à coleta de sangue, o que evidencia o potencial da utilização desse tipo de amostra em inquéritos e estudos deste tipo.

Figura 1 - Coleta de sangue dos cães, durante inquérito epidemiológico realizado juntamente com a equipe do CCZ, no período de julho à agosto - Ilha Solteira – 2011



Fonte: Pereira, V. F (2011)

Figura 2 - Coleta de suabes conjuntivais dos cães, durante inquérito epidemiológico realizada juntamente com a equipe do CCZ, no período de julho à agosto – Ilha Solteira – 2011

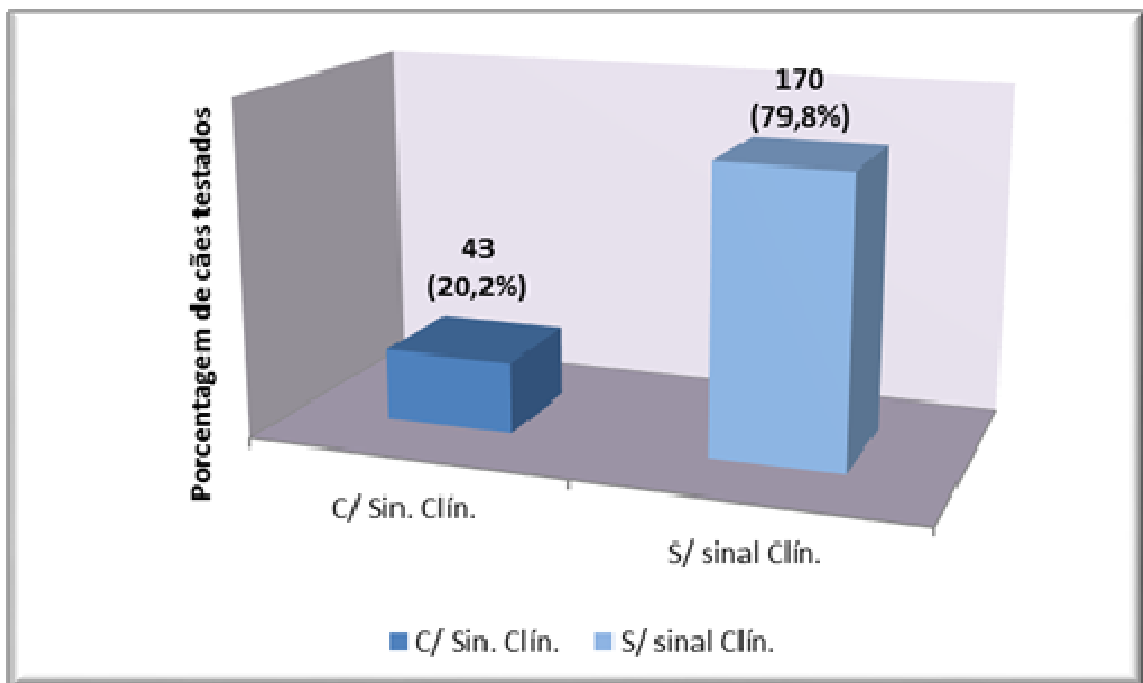


Fonte: Pereira, V. F (2011)

6.2 CLASSIFICAÇÃO DOS CÃES QUANTO AO SINAL CLÍNICO

Dos 213 cães avaliados durante o período de coleta, 170 foram classificados em sem sinais clínicos e 43 foram classificados em com sinais clínicos. Tais dados são ilustrados na figura 3, e exemplo de animais com sinais clínicos são ilustrados na figura 4.

Figura 3 - Total de cães amostrados, classificados segundo sinais clínicos - Ilha Solteira – 2011



Fonte: PEREIRA, V. F. (2011)

Figura 4 - Imagens de cães com sinais clínicos compatíveis com Leishmaniose Visceral Canina, durante Inquérito Epidemiológico realizado juntamente com a equipe do CCZ, no período de julho à agosto – Ilha Solteira – 2011



Fonte: Pereira, V. F. (2011)

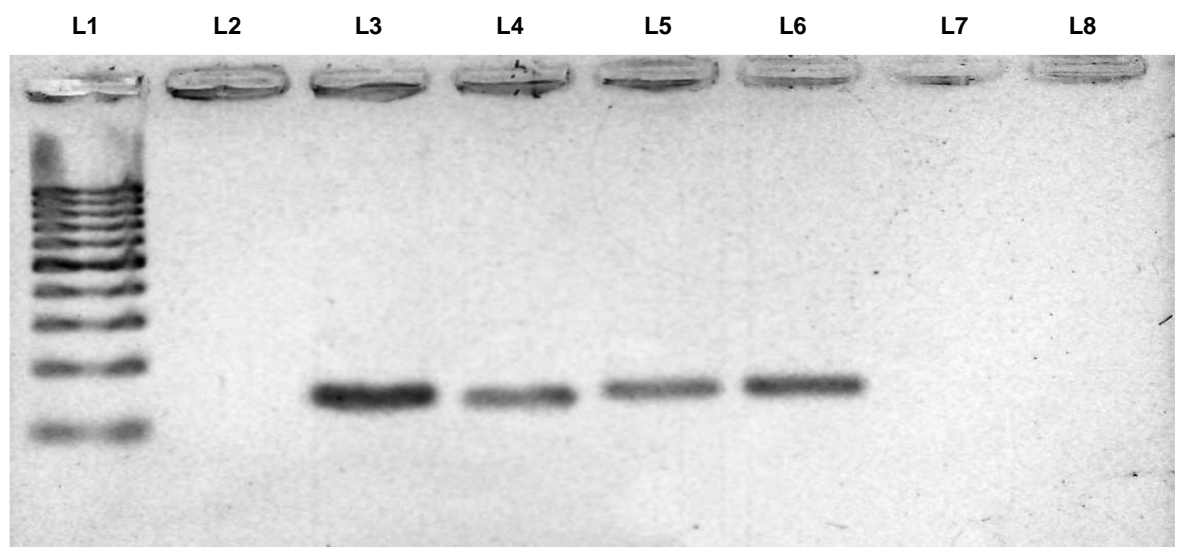
6.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das amostras de suabe conjuntival foi realizada conforme a técnica descrita por Ferreira et al. (2008) modificada, utilizando fenol-clorofórmio. Foram extraídos DNA de um total de 426 amostras de suabe, 213 de cada olho. A técnica de *salting out* descrita por John et al. (1991) e modificada por Lahiri; Nurnberger (1991) se mostrou eficiente para a extração de DNA de amostras de sangue; com algumas modificações. Foram extraídos DNA do total de 213 amostras de sangue.

6.4 PCR DE SUABE CONJUNTIVAL (PCR-SC) E PCR DE SANGUE (PCR-SG)

Nesta etapa realizou-se primeiro a PCR de suabe conjuntival (PCR-SC). Nas amostras positivas houve a amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) conservados do minicírculo do cinetoplasto, utilizando-se o par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. descrito por Rodgers, Popper, Wirth (1990). Do total de 426 amostras de suabe conjuntival (213 de cada olho), 28 (13,1%) foram positivas. Os resultados estão exemplificados na figura 5.

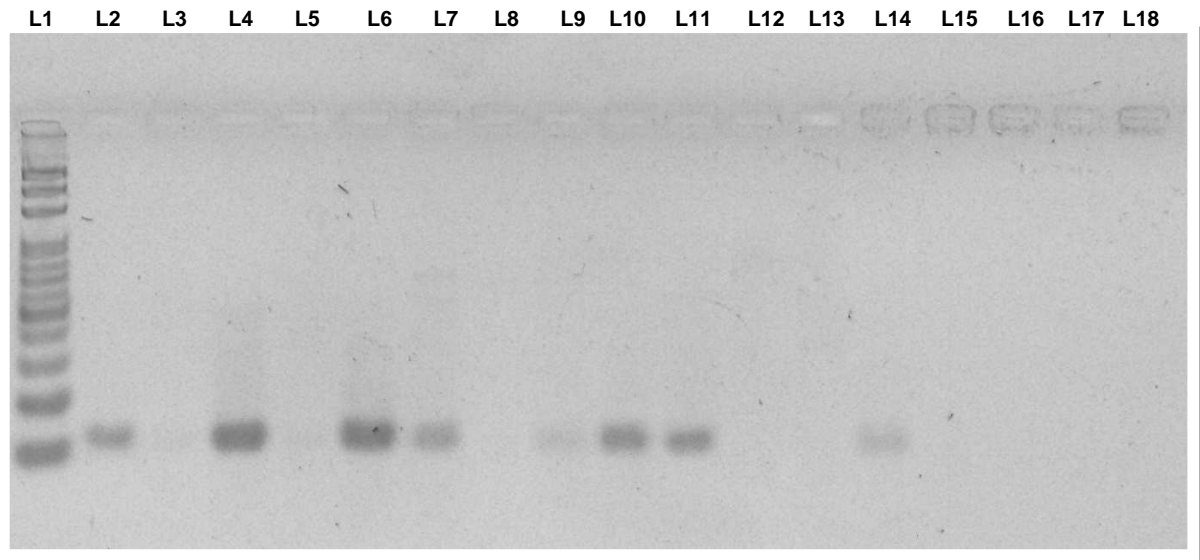
Figura 5 - Fragmentos obtidos pela PCR com o DNA de suabe conjuntival. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Controle negativo. Linha 3: Controle positivo. Linhas de 4 a 8: Reações com o DNA extraído de amostras de suabe conjuntival de 5 cães diferentes – Pirassununga - 2012



Fonte: Pereira, V.F (2012)

Depois de realizados todos os PCRs de suabe, procedeu-se a PCR-SG, foram utilizadas as mesmas condições de amplificação tanto na PCR-SC quanto na PCR-SG. Nas amostras positivas houve a amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) conservados do minicírculo do cinetoplasto, utilizando-se o par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. descrito por Rodgers; Popper; Wirth (1990). Os resultados da PCR de sangue são exemplificados na figura 6.

Figura 6 - Fragmentos obtidos pela PCR com o DNA de sangue canino. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Controle positivo. Linha 18: Controle negativo. Linhas de 3 a 17: Reações com o DNA extraído de amostras de sangue de 15 cães diferentes – Pirassununga - 2012



Fonte: Pereira, V.F (2012)

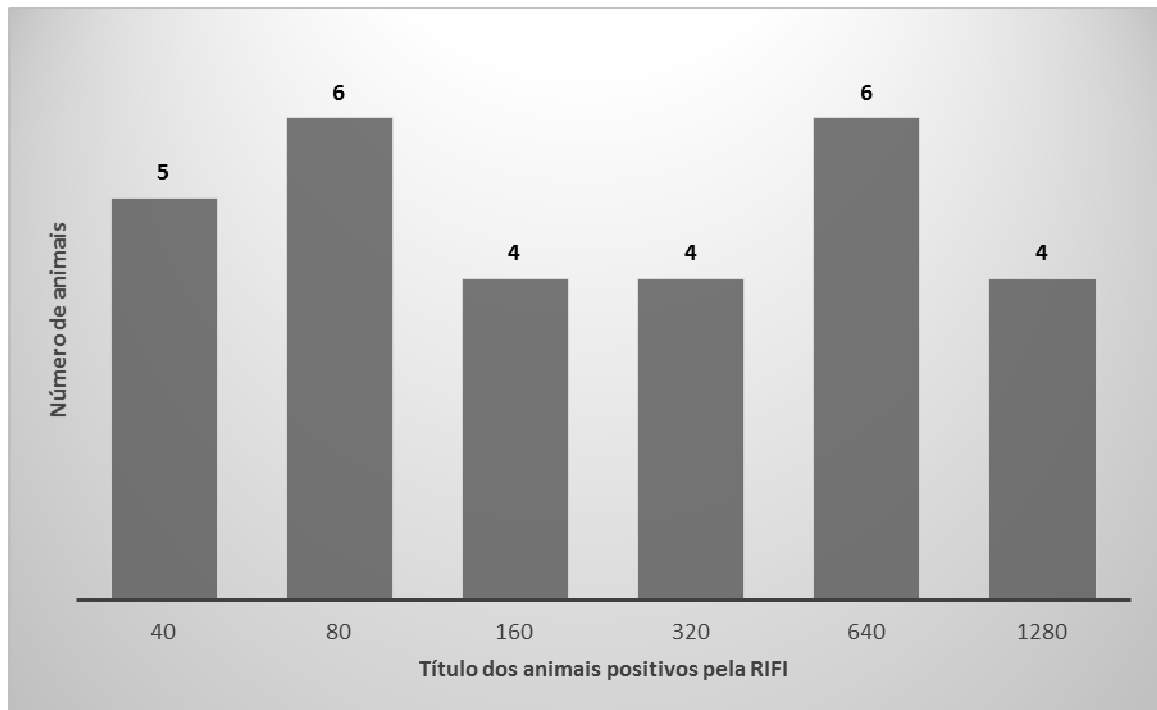
6.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Em relação ao teste sorológico, realizado no Laboratório Multiusuário em Saúde Animal e Segurança Alimentar, do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA/USP, para a realização das reações, lâminas para RIFI, contendo antígeno de *L. (L.) i. chagasi*, foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/Unesp, Jaboticabal - SP.

A triagem e titulação das 213 amostras foi realizada, tendo como ponto de corte a diluição de 1:40. Destas 213 amostras, 29 foram consideradas positivas, das quais 5 animais tiveram título de 40, 6 animais título de 80, 4 animais título de 160, 4 animais título de 320, 6 animais título de 640 e 4 animais de 1280. Foram considerados negativos 184 animais.

A figura 7 ilustra o número de animais, de acordo com o título obtido na reação de imunofluorescência indireta.

Figura 7 - Número de cães positivos pela RIFI de acordo com o título da reação, em amostras coletadas nos meses de julho e agosto - Ilha Solteira – 2011



Fonte: Pereira, V.F (2011)

6.6 CONCORDÂNCIA ESTATÍSTICA ENTRE OS TESTES RIFI, PCR DE SANGUE E PCR DE SUABE CONJUNTIVAL

A prevalência de animais positivos em pelo menos um dos três testes (RIFI, PCR de sangue, e PCR de suabe) foi de 28,17% (60/213).

No teste sorológico RIFI, um total de 13,6% (29/213) dos cães reagiram positivamente. Na PCR de suabe conjuntival, 13,1% (28/213) dos cães foram positivos, e na PCR de sangue total também obtivemos 13,1% (28/213) positivos. A prevalência de animais positivos na RIFI foi semelhante à PCR de sangue e PCR de suabe conjuntival. Entretanto os animais positivos não foram os mesmos.

Comparando os animais testados pela RIFI e pela PCR de suabe conjuntival, 7,9% (17/213) animais foram positivos em ambos os testes, enquanto 81,2 % (173/213) animais foram negativos em ambos os testes (PCR-SC e RIFI). Dos animais testados para PCR-SC, 5,1% (11/213) foram positivos apenas neste teste. Na sorologia, 5,6% (12/213) reagiram positivamente apenas para RIFI.

A sensibilidade e especificidade da PCR-SC foram respectivamente 58,6% e 94,0%, valor preditivo positivo de 61,0%, valor preditivo negativo de 94,0%.

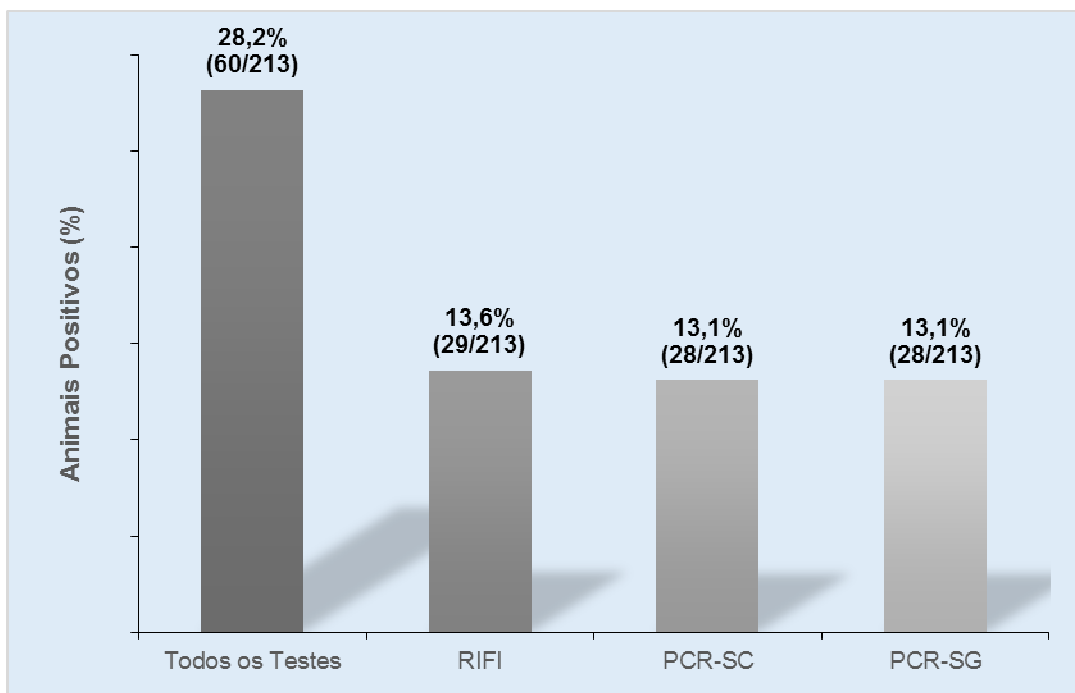
Ao se comparar a RIFI com a PCR-SG, dos animais testados, 3,3% (7/213) foram positivos nos dois testes simultaneamente, 13,6% (29/213) foram positivos apenas na RIFI, logo, 9,9 % (21/213) foram positivos apenas na PCR-SG. Foram negativos nos dois testes 76,5% (163/213).

A PCR-SG demonstrou sensibilidade de 24,1%, especificidade de 88,5%, valor preditivo positivo de 25,0% e valor preditivo negativo de 88,0%, quando comparado ao padrão ouro (RIFI).

Além disso, foram positivos em todos os três testes 2,35% (5/213); e apenas 0,47% (1/213) foi positivo nos testes de PCR-SG e PCR-SC.

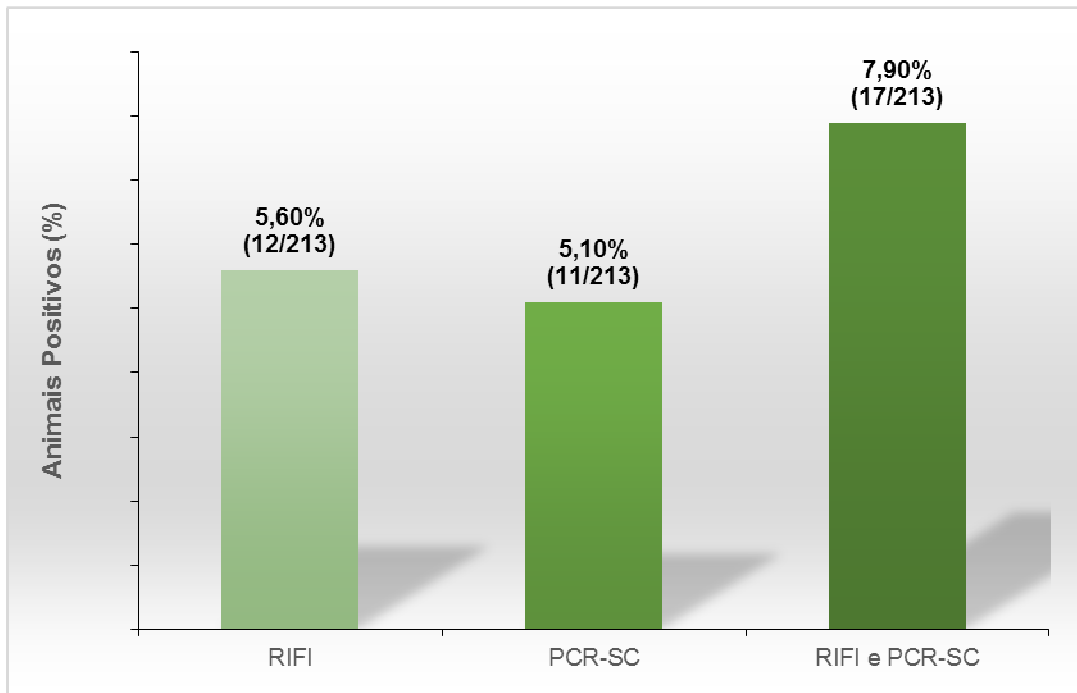
Os resultados consolidados com os números e percentuais de cães e amostras positivas para cada método testado são apresentados nas figuras 8, 9, 10 e 11.

Figura 8 - Porcentagem e número de cães positivos em todos os testes simultaneamente, positivos apenas na RIFI, PCR-SC ou PCR-SG, respectivamente - Ilha Solteira – 2011



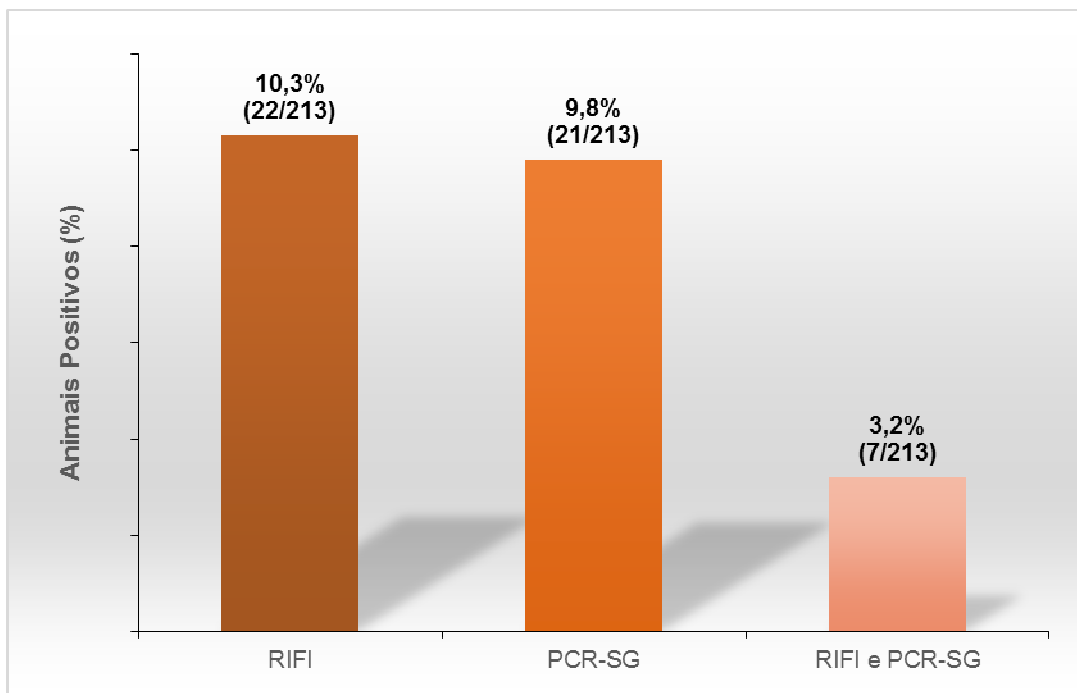
Fonte: Pereira, V.F (2012)

Figura 9 – Comparação (porcentagem e número) entre os cães que foram positivos na RIFI, na PCR de suabe conjuntival, e os que foram positivos nos dois testes simultaneamente - Ilha Solteira – 2011



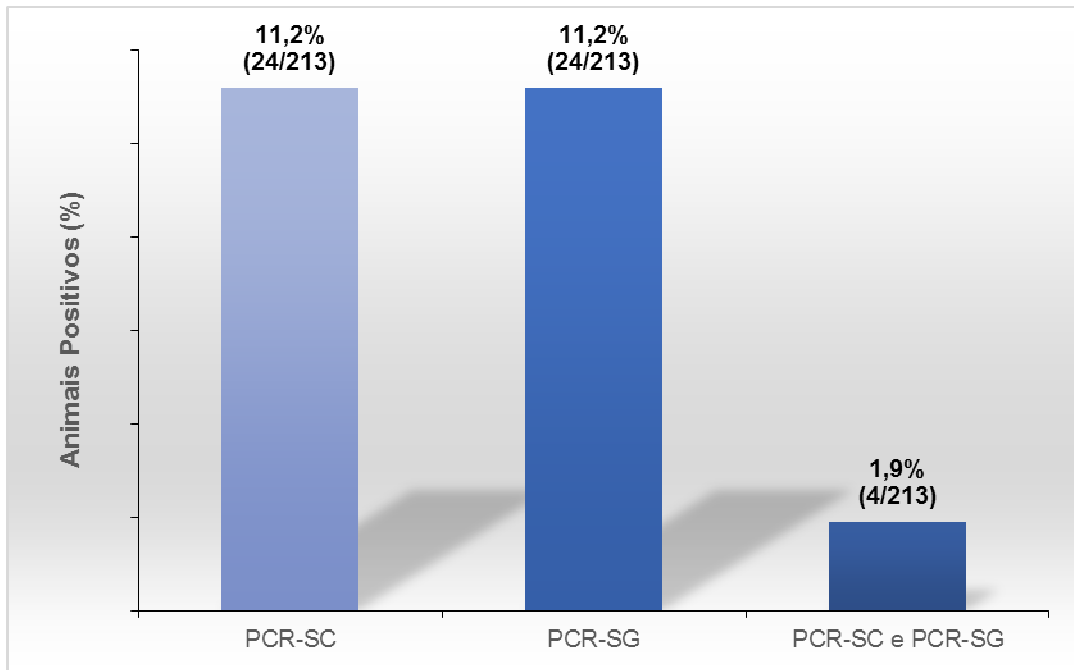
Fonte: Pereira, V.F (2012)

Figura 10 – Comparação (porcentagem e número) entre os cães que foram positivos na RIFI, na PCR de sangue e os que foram positivos nos dois testes simultaneamente - Ilha Solteira - 2011



Fonte: Pereira, V.F (2012)

Figura 11 – Comparação (porcentagem e número) entre os cães que foram positivos na PCR de suabe conjuntival, na PCR de sangue e os que foram positivos nos dois testes simultaneamente – Ilha Solteira - 2011



Fonte: Pereira, V.F (2012)

As concordâncias entre o teste ouro (RIFI), PCR-SC e PCR-SG foram calculadas pelo índice kappa simples e ajustado de acordo com Medronho et al. (2009).

Quando analisamos a concordância entre a PCR-SC com o padrão ouro (RIFI), obtivemos um kappa simples de 0,89, de acordo com a classificação de Medronho et al. (2009), sendo a concordância entre os testes substancial. Entretanto, segundo Medronho et al. (2009), o cálculo do coeficiente kappa simples não leva em consideração a falta de homogeneidade entre os casos discordantes. Portanto, considerou-se também o kappa ajustado: 0,53; o qual segundo a tabela de Landis e Koch (1977), descrita por Shrout (1998), indica uma concordância moderada.

Quanto ao índice dos animais positivos na RIFI e PCR-SG, o kappa ajustado foi de 0,13 e o simples -2,24, tal índice, de acordo com a tabela de Landis e Koch (1977), indica fraca concordância entre os testes. Diante do exposto observamos uma maior concordância entre a PCR-SC e o padrão ouro, em relação a PCR-SG, que revelou-se sem concordância com o padrão ouro (RIFI).

Foi verificado que a associação dos animais positivos obtidos pela PCR-SC e RIFI foi significativa estatisticamente ($p < 0,05$). Observamos também que comparando os resultados positivos obtidos na RIFI e na PCR-SG, a associação não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A frequência de positividade simultânea para PCR-SG e PCR-SC também revelou associação sem significância estatística ($p > 0,05$). Tal dado pode significar que a concordância entre estes testes pode ser devida ao acaso. Tais dados estão ilustrados nas tabelas 1 e 2.

Em relação à concordância entre a PCR-SC, PCR-SG e o padrão ouro, observamos uma maior concordância da PCR-SC e o padrão ouro do que a PCR-SG, o que sugere uma maior efetividade do suabe conjuntival no diagnóstico de cães infectados por *Leishmania*, quando comparado ao sangue.

Comparando as técnicas de PCR de sangue e suabe, percebe-se uma maior sensibilidade e especificidade do suabe em relação ao sangue. Além dessa maior concordância com o padrão ouro (RIFI), a coleta do suabe conjuntival apresentou como principal fator observado a facilidade em realizar este tipo coleta, sendo menos invasiva e dolorosa do que a coleta de sangue, com uma grande aceitação por parte dos proprietários, e até os cães que não colaboraram durante a coleta de sangue permitiram a coleta do suabe.

Tabela 1 – Concordância estimada pelo Índice kappa entre o padrão ouro (RIFI) e os demais testes avaliados (PCR-SC e PCR-SG), realizado com amostras de sangue, soro e suabe conjuntival de cães, considerando a RIFI como padrão ouro – Ilha Solteira – 2011

Padrão Ouro		Testes Diagnósticos					
		PCR-SC ^b			PCR-SG ^c		
		P	N	Total	P	N	Total
RIFI ^a	P ^d	17	12	29	7	22	29
	N ^e	11	173	184	21	163	184
	Total	28	185	213	28	185	213
kappa		0,53*			0,13		

Notas:

- a) RIFI: Reação de imunofluorescência indireta
- b) PCR-SC: PCR de suabe conjuntival
- c) PCR-SG: PCR de sangue
- d) Número de cães positivos
- e) Número de cães negativos

*Estatisticamente significativo pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$). Intervalo de confiança = 95%.

Tabela 2 - Valores de sensibilidade, especificidade, VPP (valor preditivo positivo), VPN (valor preditivo negativo) dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral canina, realizado com amostras de sangue, soro e suabe conjuntival de cães, considerando a RIFI como padrão ouro - Ilha Solteira - 2011

	Testes Diagnósticos	
	RIFI ^a X PCR-SC ^b	RIFI X PCR-SG ^c
Sensibilidade (%)	59	24
Especificidade (%)	94	88,5
VPP (%)	61	25
VPN (%)	93,5	88

Notas:

- a) RIFI: Reação de imunofluorescência indireta
- b) PCR-SC: PCR de suabe conjuntival
- c) PCR-SG: PCR de sangue

6.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS E A CONDIÇÃO CLÍNICA DOS CÃES

Dos 213 animais testados, 170 foram considerados sem sinais clínicos e 43 com sinais clínicos. No que diz respeito à RIFI, dos 29 animais que reagiram positivamente, 51,7% (15/29) apresentaram sinais clínicos, e em 48,3% (14/29) que foram positivos na RIFI não foram observados sinais clínicos.

Em relação à PCR-SC, dos 28 animais positivos, 57,1% (16/28) apresentaram sinais clínicos, e 42,9% (12/28) não apresentaram sinais clínicos.

Para PCR-SG foram oito animais (28,6%) positivos com sinais clínicos, e vinte cães (71,4%) positivos e sem sinais clínicos. Tais dados podem significar que a PCR de sangue foi capaz de detectar um maior número de cães sem sinais clínicos, uma vez que de todos os animais positivos na PCR de sangue, 71,4% (20/28) foram sem sinais clínicos.

Dos 17 animais que foram positivos na PCR-SC e RIFI simultaneamente, doze (70,6%) foram classificados com presença de sinais clínicos, e cinco (29,4%) sem sinais clínicos. Tal fato pode sugerir que a PCR de suabe conjuntival e a RIFI associadas, foram capazes de detectar um maior número de animais com sinais clínicos.

Um total de cinco animais foram positivos nos três testes simultaneamente (PCR-SC, PCR-SG, RIFI), desses cinco, três animais foram considerados com sinais clínicos e dois sem sinais clínicos. De acordo com a análise estatística a associação entre animais positivos na PCR-SC e a presença de sinais clínicos é significativa estatisticamente ($p < 0,05$), e a capacidade da PCR-SG em detectar um maior número de animais sem sinal clínico também foi significativa ($p < 0,05$). Os dados estão ilustrados na tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre frequência de positividade pela RIFI, PCR-SC e PCR-SG segundo a presença ou ausência de sinal clínico para leishmaniose visceral canina, com a respectiva significância estatística dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral canina, realizado com amostras de sangue, soro e suabe conjuntival de cães, considerando a RIFI como padrão ouro – Ilha Solteira - 2011

Teste Diagnóstico	Sinal Clínico		Significância estatística (p)** da diferença de sinais clínicos
	Positivo	Negativo	
PCR-SC ^a	16	12	< 0,05
PCR-SG ^b	8	20	< 0,05
RIFI ^c	15	14	n.s.*

Notas:

- a) PCR-SC: PCR de suabe conjuntival
- b) PCR-SG: PCR de sangue
- c) RIFI: Reação de imunofluorescência indireta

*Não significativo estatisticamente

**Valor de p calculado pelo teste Qui-quadrado

7 DISCUSSÃO

O padrão de transmissão da leishmaniose visceral tem se modificado ao longo das últimas décadas em velocidade proporcional às transformações ambientais e intenso fluxo migratório de pessoas e animais em todo o Brasil (LAINSON; RANGEL, 2005; MONTEIRO et al., 2005).

A rápida expansão da doença da área rural aos espaços urbanos em quase todas as regiões geográficas do país representa atualmente um dos maiores problemas à saúde pública. No Brasil, o problema da LVC e LVH se contextualizam de modo singular, uma vez que existem as influências fisiogeográficas, climáticas, econômicas e socioambientais que diferem entre as regiões. Essas diferenças necessitam ser consideradas para o delineamento de estratégias buscando o controle efetivo da leishmaniose visceral canina e humana (BRASIL, 2006).

Em diferentes locais do mundo como no Brasil, Palestina, regiões da Europa e norte da África, a prevalência registrada da doença humana tem sido inferior a 10%, enquanto a prevalência real da infecção é certamente mais elevada (NEJJAR et al., 1988; PAPADOPOULOU et al., 2005; NASEREDDIN et al., 2006; RONDON et al., 2008). Ainda não está claro se os cães sem expressão clínica da LVC se tornam livres da infecção, ou se irão, e quando irão expressar os sinais clínicos compatíveis à LVC (OLIVA et al., 2006).

Os testes sorológicos realizados em larga escala para triagem de cães apresentam limitações uma vez que podem gerar resultados falsos positivos devido à reatividade cruzada com outras espécies de *Leishmania* e com *Trypanosoma cruzi* nas regiões onde há sobreposição destas espécies com *L. infantum* (ANDRADE et al., 2006; TRONCARELLI et al., 2009). Por outro lado, podem ocorrer resultados falsos negativos em cães imunossuprimidos presentes em regiões endêmicas (FISA et al., 2001).

Embora os testes parasitológicos não moleculares apresentem alta especificidade, a sensibilidade é reduzida especialmente nos cães sem expressão clínica da LVC (PIARROUX et al., 1994; SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). Estes testes também envolvem coletas invasivas de amostras clínicas e requerem a participação de profissionais especializados e experientes para as análises. Além disso, os meios de cultura são passíveis de contaminação e as análises, tanto em

lâminas coradas como em culturas, podem resultar em falsos positivos devido a artefatos. Como estas avaliações são dependentes da carga parasitária, falsos negativos também podem ocorrer se a quantidade de parasitos for muito baixa ou se os aspirados de fluidos biológicos estiverem muito diluídos (PIARROUX et al., 1994).

O método de imunoistoquímica é uma alternativa que incrementa a sensibilidade do diagnóstico (TAFURI et al., 2004; ASSIS et al., 2010). No entanto, estas técnicas não são apropriadas para estudos epidemiológicos ou de larga escala, pois são mais laboriosas, demoradas e envolvem amostragens invasivas, além de alta especialização técnica (GOMES et al., 2008).

Os métodos moleculares baseados em PCR têm sido considerados um importante recurso auxiliar para o diagnóstico da LVC devido às altas sensibilidade e especificidade apresentadas por tais técnicas (GOMES et al., 2007; MOREIRA et al., 2007). Embora a PCR exija infraestrutura mais elaborada e alto treinamento técnico, ela se tornou uma ferramenta de grande valia para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da LVC.

Moreira et al. (2007) compararam a eficácia de métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares em diagnosticar cães com diferentes sinais clínicos. Os resultados obtidos das amostras de aspirados de linfonodo pela PCR apresentaram sensibilidades de 100% para cães sintomáticos, 96% para oligossintomáticos e 95,5% para assintomáticos. De acordo com os resultados a PCR demonstrou ser a mais sensível das técnicas analisadas, indicando ser este método muito eficiente para o diagnóstico da leishmaniose canina.

Assis et al. (2010), ao analisarem a eficiência dos testes imunoistoquímica, histoquímica, RIFI, ELISA e PCR na detecção de LVC em cães com e sem sinais clínicos, concluíram que a PCR foi o teste mais eficiente na detecção de cães que eram suspeitos e negativos pelos outros testes, os quais foram capazes de detectar apenas 12,5 % de cães assintomáticos.

Torna-se claro que o diagnóstico preciso da LVC é complexo e requer, frequentemente, a utilização de diferentes técnicas para a obtenção de um resultado conclusivo. O fato de os cães infectados apresentarem amplo espectro clínico e anormalidades clínico-patológicas diversas e não específicas reforçam a necessidade do uso combinado de métodos laboratoriais para o diagnóstico diferencial da LVC (PALTRINIERI et al., 2010).

Outro fato importante é a existência de um grande contingente de cães infectados sem sinais clínicos da LVC em regiões endêmicas para os quais os testes diagnósticos utilizados rotineiramente exibem reduzida sensibilidade. As estimativas do número de animais infectados sem expressão clínica são muito variáveis, indo de 25% e chegando até 80% de acordo com a região geográfica, com o método de diagnóstico adotado e amostras clínicas utilizadas (BERRAHAL et al., 1996; PAPADOPOULOU et al., 2005; QUEIROZ et al., 2009). Cães recentemente infectados podem apresentar resultados diagnósticos falsos negativos pelas técnicas disponíveis, simplesmente em razão de o parasitismo ou das consequências da infecção se encontrarem em níveis ainda não detectáveis (OLIVA et al., 2006).

Dos 213 animais testados para PCR de suabe conjuntival, 5,1% (11/213) foram positivos apenas neste teste. Na sorologia, de todos os animais testados, 5,6% (12/213) reagiram positivamente apenas pela RIFI. Assim como Di Muccio et al. (2012) este trabalho obteve uma boa concordância entre a PCR de suabe conjuntival e o teste ouro, enquanto a PCR de sangue obteve baixa sensibilidade. Quanto à discordância com a RIFI, o número de cães soronegativos detectados como positivos por PCR de suabe ($n = 11$) foi semelhante ao número de cães soropositivos detectados como negativos por PCR suabe ($n = 12$). Este resultado reflete provavelmente os limites inerentes aos dois testes para detectar diferentes fases de infecção, o que sugere que eles podem atuar em conjunto para contribuir no diagnóstico.

A sensibilidade e especificidade da PCR de suabe conjuntival foram respectivamente 58,6% e 94,0%. O PCR de sangue demonstrou uma baixa sensibilidade, de 24,1% e especificidade de 88,5%. Alguns trabalhos apresentaram resultados satisfatórios para o diagnóstico da LV usando amostras de sangue (REALE et al., 1999; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MAIA et al., 2009), embora outros apontam que amostras de sangue frequentemente apresentam problemas relacionados a preparação de DNA e inibição da PCR (REALE et al., 1999; SILVA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002). Outra desvantagem para o uso de sangue é que a carga parasitaria no sangue tende a diminuir ao longo da infecção. Há relatos de bons resultados obtidos a partir de amostras de pele (MANNA et al., 2004; QUARESMA et al., 2009). Este tecido pode ser uma boa opção para o diagnóstico por PCR uma vez que os flebótomos são infectados pela picada na pele de cães.

Porém, o inconveniente no uso da pele é que sua coleta é relativamente dolorosa e provoca sangramento.

Em estudo realizado por Ferreira et al. (2012), os resultados encontrados na detecção de *L. infantum* em suabe conjuntival foram promissores, relataram que em cães sintomáticos obtiveram 95% de positivos, e assintomáticos 77,5%, sendo cada grupo composto de 40 animais sabidamente positivos por testes sorológicos e parasitológicos. Entretanto tais resultados provêm de testes com uma maior sensibilidade comparados à PCR convencional, uma vez que foi utilizado nested-PCR e PCR quantitativo.

A sensibilidade obtida neste estudo foi inferior ao obtido em outros estudos usando SC para o diagnóstico da LVC. Leite et al. (2010) encontraram uma sensibilidade de 90% com hibridização das amostras e 83,3% usando o nested PCR para suabe conjuntival, Strauss-Ayali et al. (2004) obtiveram 92 % de sensibilidade, Ferreira et al. (2008) detectaram DNA do parasita em 91,7 % dos suabes conjuntivais nos cães estudados, Pilatti et al. (2009) obtiveram entre 73,9% e 95,6 % de positividade dependendo da técnica de PCR utilizada. Gramiccia et al. (2010) obtiveram uma taxa de 80% de positivos, entretanto tais autores utilizaram técnicas mais complexas e caras como hibridização e nested, as quais seriam inviáveis em larga escala.

Adiciona-se o fato de que a maioria dos trabalhos recentes que obtiveram uma sensibilidade alta ao utilizar o suabe conjuntival, em particular, Strauss-Ayali et al. (2004) que relataram uma taxa de 92%, e Ferreira et al. (2008) que relataram 91,7%, os estudos foram realizados, respectivamente, em cães experimentalmente infectados e cães infectados e sintomáticos. Neste trabalho o teste foi realizado sob condições naturais, com amostras de cães domiciliados, ou semidomiciliados provenientes de inquérito censitário, com e sem sinais clínicos. Uma prevalência consideravelmente mais baixa para PCR de suabe conjuntival (43%) em uma amostra de cães soropositivos foi relatada recentemente por Lombardo et al. (2012).

Ao contrário de outros trabalhos, neste estudo não foi realizado hibridização, ou nested, técnicas que aumentam a sensibilidade, esta pode ser uma das causas da sensibilidade alcançada não ter sido tão alta. A hibridização é uma etapa adicional que pode aumentar a sensibilidade da PCR e confirmar seus resultados (DEGRAVE et al., 1994; REITHINGER et al., 2000; HEADINGTON et al., 2002; FERREIRA et al., 2008). Porém, sua desvantagem reside no fato de exigir

infraestrutura mais elaborada para proteção radiológica, uma vez que envolve o uso de radioisótopos.

Devemos considerar que as amostras utilizadas foram obtidas juntamente com o inquérito epidemiológico, as condições de processamento a campo podem ter interferido na qualidade do DNA extraído, que foi um pouco inferior àqueles obtidos em condições experimentais controladas. Tal fato demonstra a possibilidade de aperfeiçoar as ações de controle da LVC, adotando a metodologia de localização de cães soropositivos, e em conjunto a coleta de suabe conjuntival, como uma estratégia complementar aos inquéritos sorológicos tradicionais.

Para o diagnóstico da LVC, as técnicas sorológicas são consideradas rápidas e práticas, mas com sensibilidade variável e especificidade baixa (BADARÓ et al., 1983; INIESTA et al., 2002). Como atualmente testes sorológicos são preconizados pelo ministério da saúde como teste diagnóstico em inquéritos, adotamos a RIFI como padrão ouro. Mesmo com a cultura de medula óssea sendo muitas vezes eleita como método de referência nos estudos de acurácia diagnóstica, admite-se atualmente não existir um padrão ouro definitivo para o diagnóstico da LVC (FERREIRA et al., 2007, RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2010). O teste padrão a ser adotado pode variar de acordo com o foco investigativo do pesquisador e a escolha da técnica de referência deve ser orientada de acordo com o custo, operacionalidade, sensibilidade e especificidade envolvida (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2010).

Embora existam muitos estudos e pesquisas que conduzem à formas alternativas de detecção e controle da LVC, um dos maiores desafios colocados às equipes de vigilância da doença refere-se ao diagnóstico de cães reservatórios de *L. (L.) i. chagasi*. O procedimento diagnóstico orienta a eutanásia de cães, contudo, os métodos atualmente disponíveis na rede pública (ELISA e RIFI) fazem uso de antígenos brutos das formas promastigotas de *Leishmania* e apresentam problemas de sensibilidade, precisão e reprodutibilidade (REITHINGER et al., 2002a; GOMES et al., 2008).

Frente à complexidade do diagnóstico da LVC, um único método de detecção não é capaz de identificar todos os cães infectados, que albergam o parasito, e sobretudo atuam como fonte importante de infecção ao vetor (COURTENAY et al., 2002). Sendo assim, esse estudo compara o diagnóstico sorológico (RIFI) e molecular (PCR de suabe conjuntival e PCR de sangue), verificando os benefícios

da utilização da PCR com DNA de células conjuntivais, como uma nova ferramenta de auxílio no diagnóstico da LVC em estudos e inquéritos epidemiológicos. Os testes foram utilizados em cães do município de Ilha Solteira, SP, uma área com percentual considerável de cães infectados e atuando como reservatório para infecção de outros cães e humanos.

Problemas associados a atual execução dos inquéritos caninos como: o baixo desempenho diagnóstico da RIFI utilizado pelos CCZs (LEONTIDES et al., 2002; SCALONE et al., 2002), a demora na divulgação dos resultados e a retirada tardia dos cães soropositivos das áreas trabalhadas (CRINGOLI et al., 2002), são apontados por diversos autores como prováveis causas dos resultados insatisfatórios desta medida em reduzir o risco de infecção nas populações humanas e caninas (DESJEUX, 1992; MOREIRA JR. et al., 2004), sendo que as consequências destes problemas se agravam de acordo com a abrangência do inquérito sorológico.

Comparando os resultados deste estudo demonstrou-se o intuito de oferecer aos órgãos de controle e vigilância epidemiológica a possibilidade de utilizar um método alternativo de coleta em estudos e inquéritos, uma vez que foram coletadas amostras de sangue e suabes conjuntivais em um curto período; ressaltando-se a facilidade e rapidez de coleta desta última. Como o estudo foi conduzido juntamente com o inquérito feito pelo município, pôde-se ter uma ideia de como seria uma coleta na prática, utilizando o suabe conjuntival em larga escala. A forma de armazenamento do suabe também foi simples, uma vez que as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da extração de DNA.

A escolha do suabe conjuntival foi devido ao fato de áreas de mucosas serem possíveis locais de albergue do parasito, pois a LVC é uma doença sistêmica e a infecção pode se estabelecer em uma ampla variedade de órgãos e tecidos do hospedeiro (CIARAMELLA et al., 1997; RALLIS et al., 2005; ADAMAMA-MORAITOU et al., 2007). Outro aspecto considerado é que o parasito se dissemine para as mucosas do cão por via sanguínea ou linfática (REITHINGER et al., 2002b). Além disso, é razoável admitir que o parasito possa alcançar a conjuntiva e o focinho diretamente pela picada de flebotomíneos que têm preferência em se alimentar em regiões do cão desprovidas de pelos (DI MUCCIO et al., 2008). Este fenômeno deve ocorrer com grande frequência especialmente em regiões endêmicas onde a densidade vetorial pode ser alta.

Outros trabalhos com suabe conjuntival já foram realizados, sob diferentes contextos comparativos, alguns autores levaram em conta o status clínico de cães naturalmente infectados e compararam com diferentes amostras clínicas para o diagnóstico molecular da LVC em região endêmica brasileira (FERREIRA et al., 2008; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010; GRAMICCIA et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012).

Os métodos de PCR utilizados para detecção de *Leishmania* permitem determinar a presença do DNA do parasito em várias amostras biológicas, identificar as infecções por *Leishmania* em casos ativos da doença, monitorar pacientes humanos após quimioterapia e também detectar infecções em hospedeiros vertebrados ou flebótomos em estudos epidemiológicos (SINGH, 1997).

Neste trabalho, antes da análise das amostras de cães os métodos foram testados com diluições seriadas de DNA isolado de culturas de promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Os suabes conjuntivais com a diluição mais baixa, referente a um protozoário por amostra, foi submetido à três temperaturas de armazenamento; temperatura ambiente, temperatura de geladeira (4°C), e temperatura de congelamento (-21°C). Como as amostras tiveram bons resultados em temperatura de geladeira na extração de DNA, foi estabelecido armazenar à esta temperatura, até o momento da extração. O DNA foi extraído por fenol-clorofórmio. O método de PCR utilizado apresentou como alvo para amplificação a região conservada dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de *Leishmania* (kDNA) (DEGRAVE et al., 1994). Outros pesquisadores também verificaram que o kDNA como alvo para amplificação rendeu bons resultados. No estudo realizado por Lachaud et al. (2002) foram comparados seis métodos de PCR utilizando amostras de sangue periférico de cães para detectar LVC. Três dos métodos utilizaram iniciadores endereçados para o DNA genômico e os outros três para o kDNA. Os métodos que demonstraram melhor desempenho utilizaram kDNA como alvo. Assim como nesse trabalho.

No presente trabalho comprovamos um aumento na frequência de positivos para o suabe conjuntival ao se combinar a coleta dos dois olhos, direito e esquerdo. Este procedimento torna-se bastante recomendável para estudos de triagem diagnóstica em inquéritos caninos, pois, ao se associar as amostras, a probabilidade e a sensibilidade de detecção da infecção tornam-se maiores. Este fato foi corroborado em outros estudos com suabe conjuntival, o que reforça a importância

da combinação das oculares para o diagnóstico (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008).

Assim como no estudo de Ferreira et al. (2012) observamos que na PCR-SC, os animais que reagiram positivamente, na sua maioria, apresentaram sinais clínicos. De acordo com tal pesquisa, um total de 77,5% (31/40) cães positivos para PCR de suabe conjuntival foi em animais sem manifestação clínica, mas positivos parasitologicamente; já nos cães com sinais clínicos, a positividade foi de 95,0% (38/40), entretanto neste estudo foi utilizada a hibridização associada ao PCR. No presente trabalho, dos 29 animais que foram positivos na RIFI, 15 (51,7%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com LVC. Comprovamos também uma alta frequência (70,6%) de cães que foram positivos em ambos os testes de PCR-SC e RIFI e apresentaram sinais clínicos. Foi observado também que dos 28 animais positivos na PCR-SG, 71,4% (20/28) eram sem manifestações clínicas. Tais dados reforçam a importância de associações entre diferentes provas diagnósticas em conjunto, uma vez que cada teste tem sua particularidade de detecção, e pode demonstrar melhores resultados em determinada fase do curso da doença.

A importância desse trabalho é mostrar a facilidade de coleta do suabe conjuntival, sua praticidade em ser utilizada em inquéritos, com uma boa sensibilidade e alta especificidade. Outro aspecto, muito importante neste contexto, é a utilização de metodologias em amostragens não invasivas, pois pode representar uma alternativa mais simples e não traumática para os animais. Isto, certamente, diminuiria a resistência dos proprietários dos cães em permitir os exames, além de ser uma forma fácil de coleta, podendo ser realizada fora de clínicas veterinárias.

Amostras não invasivas, por serem de fácil manuseio, facilitam a reprodutibilidade na técnica de coleta, melhorando a qualidade do diagnóstico, principalmente em triagens em massa podendo ser uma ferramenta valiosa em saúde pública. Fácil de ser armazenados e manipulados, os suabes estéreis podem ser utilizados em inquéritos e estudos epidemiológicos a campo (REALE et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; MANNA et al., 2004; ANDRADE et al., 2006).

Gramiccia et al. (2010) não obtiveram bons resultados ao tentar detectar precocemente a infecção por *Leishmania* através do suabe conjuntival em cães expostos a baixa concentração do vetor, entretanto, conforme aumentou o tempo de exposição do hospedeiro ao flebótomo, detectaram o DNA do parasita mais

rapidamente do que a soroconversão, mostrando que a PCR de suabe conjuntival seria um bom marcador para indicar o contato com o protozoário. De fato, pode-se argumentar que estes animais foram recentemente expostos a picadas de flebotomíneos infectados, pois em um estudo anterior em cães infectados experimentalmente, foram encontrados animais positivos na PCR de suabe 45 dias após a infecção, antes da soroconversão (STRAUSS-AYALI et al., 2004). No presente estudo foram encontrados 5,1% (11/213) dos cães positivos apenas na PCR de suabe, o qual poderia indicar o contato do hospedeiro com o parasita, porém em um período onde a soroconversão não está presente.

A utilização da PCR para diagnóstico da LVC a partir de coleta não invasiva com amostras de suabe conjuntival envolvendo cães domiciliados em inquérito epidemiológico adotadas neste trabalho ainda não havia sido avaliada. Este método molecular apresenta vantagens, pois envolve uma única etapa, dispensa uso de materiais radioativos e instalações especiais utilizados na hibridização, bem como de amplificações sequenciais (nested), o que diminui as chances de contaminação. De forma geral, o tipo de PCR a ser escolhido depende da informação que se quer obter com o diagnóstico, e da infraestrutura laboratorial disponível (PILATTI et al., 2009; ROCHA et al., 2010).

De acordo com trabalhos anteriores, nenhuma prova quando utilizada isoladamente é capaz de detectar adequadamente todos os animais positivos, contudo a PCR tem demonstrado ser uma técnica prática, rápida e confiável, uma vez que detecta o DNA do parasito causador da LVC (GRADONI, 2002; ASSIS et al., 2010). Resultados mais práticos quanto ao controle da LV deverão ser obtidos com o aprimoramento do conhecimento epidemiológico das características focais da LV, especialmente no tocante ao papel dos cães, humanos e animais silvestres, atuando como reservatórios insuspeitos, na continuidade do ciclo de transmissão de *L. chagasi* nas áreas onde as atuais medidas de controle são corretamente executadas.

Com base em tudo o que foi discutido, fica claro que o diagnóstico molecular associado a amostras clínicas de coleta não invasiva tem grande potencial de aplicabilidade na triagem de cães. Além disso, o desempenho verificado destas amostras no diagnóstico da LVC também abrem perspectivas para o uso em humanos. O presente trabalho pode ser considerado como um subsídio para a realização de estudos de campo em maior escala, com a finalidade de verificar a

validade destas amostras obtidas por meio de suabe para o diagnóstico da LV em um contexto epidemiológico.

Em suma, os espécimes clínicos avaliados neste estudo podem ser um recurso auxiliar importante para o diagnóstico da LVC e vir a ser parte do repertório de opções a serem escolhidas para esta finalidade.

8 CONCLUSÃO

- ✓ Neste estudo a PCR de suabe conjuntival demonstrou maior sensibilidade e especificidade em relação a PCR de sangue.
- ✓ A PCR de suabe teve uma concordância moderada com a RIFI.
- ✓ O uso do suabe como ferramenta de diagnóstico por PCR para os inquéritos caninos rotineiros deveria ser seriamente considerado.
- ✓ O diagnóstico molecular via SC foi capaz de identificar animais soronegativos infectados.
- ✓ Facilidade em realizar esta coleta, bem menos invasiva e dolorosa do que a coleta de sangue, com uma grande aceitação por parte dos proprietários.
- ✓ A utilização do diagnóstico molecular como ferramenta complementar aos testes sorológicos é recomendada.
- ✓ A sensibilidade da PCR pode variar de acordo com o tecido examinado.
- ✓ As técnicas moleculares são bons aliados na identificação da LVC. Entretanto, é necessária otimização destas técnicas, para que possam ser empregadas em larga escala.

REFERÊNCIAS

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

ADHYA, S.; HASSAN, M. Q.; MUKHERJEE, S.; MANNA, P. P.; BASU, A.; BANDYOPADHYAY, S. S. S. Visceral leishmaniasis in India: promises and pitfalls of a PCR-based blood test Original Research Article, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p.179-183, 2002.

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

ALVES, W. A. Leishmaniasis: current situation in Brazil. **Bepa**, v. 6, p. 25-29, 2009.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexos 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.

ANDRADE, C. R.; SILVA, O. A.; ANDRADE, P. P.; KOLK, A. H.; HARITH, A. E. A direct agglutination test discriminative toward Chagas' disease for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil: preliminary results. **Annales de l'Institut Pasteur Immunologie**, v. 138, p. 457-459, 1987.

ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; SANTOSA, S. L.; VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 231-238, 2006.

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

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHOE, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity off different morphological

forms of two *Leishmania* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, p. 480-485, 1983.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Georgia: Saunders Elsevier, 2006. p. 685-698.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 315-324, 2002.

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

BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M. L.; NUNES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. P. Leishmania major-Like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1361–1366, 2002.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 273-277, 1996.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXAO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanization of visceral leishmaniosis in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 18, 2001.

BOARINO, A.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; FERROGLIO, E.; VITALE, F.; ZANATTA, R.; GIUFFRIDA, M. G.; ROSATI, S. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, p. 647-653, 2005.

BOSSOLASCO, S.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A. A metanalysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5080-5084, 2003.

BOUSSAA, S.; GUERNAOUI, S.; PESSON, B.; BOUMEZZOUGH, A. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. **Acta Tropica**, v. 95, p. 86-91, 2005.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA M. J.; LIMA, J. W. O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães soros reagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 419-424, 1998.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral** – Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. 2004. Disponível em: <<http://www.dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo>> Acesso em: 20 de nov. 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral** - situação epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Estado de Saúde do Rio Grande do Sul. **Nota técnica sobre a situação da leishmaniose visceral na fronteira do estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; ORTIZ, J. P. D.; MAIA, F. C. L.; SILVA Jr., V. A.; LAUS, J. L. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 925-929, 2004.

BURRACO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis Associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 29-30, 1997.

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

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

CABRERA, G. P.; DA SILVA, V. O.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 296-301, 1999.

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

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; CAPELA, M.J.R.; CORTES, S.; ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 269-275, 2000.

CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 50, p. 221-222, 1936.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTTEN, M. J.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 189-229, 1938.

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

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S.; KLEIN, R. P.; MENDONÇA, I. L.; GOTO, H. CD4+ cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455- 1458, 2000.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 223-228, 2001.

COURTENAY, O.; GILLINGWATER, K.; GOMES, P. A. F.; GARCEZ, L. M.; DAVIES, C. R. Deltamethrin-impregnated bednets reduce human landing rates of sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* in Amazon households. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 21, p. 168-176, 2007.

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

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 307-313, 2002.

CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; RUBIO, J. M.; MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; LAGUNA, F.; JIMÉNEZ-MEJÍAS, M.; SIRERA, G.; VIDELA, S.; ALVAR, J. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. S181-189, 2002. Supplement, 1.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99-101, 2006.

DA COSTA, C. A.; GENARO, O.; DE LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; DA COSTA, R. T.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; MAYRINK, W. Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, p. 21-25, 1991.

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

DA SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M.; SCHALLIG, H. D.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Vet Res Commun**, v. 30, p. 637-643, 2006.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. 1956. 162 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956a.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1956b.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 198-212, 1962.

DE DONCKER, S.; HUTSE, V.; ABDELLATI, S.; RIJAL, S.; SINGH-KARKI B. M.; DECUYPERE, S.; JACQUET, D.; LE RAY, D.; BOELAERT, M.; KOIRALA, S.; DUJARDIN, J. C. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 25-31, 2005.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-469, 1994.

DE OLIVEIRA, S. S.; DE ARAUJO, T. M. Evaluation of control measures for visceral leishmaniasis (kala azar) in an endemic area in Bahia, Brazil (1995-2000). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 1681-1690, 2003.

DE PAULA, A. A.; DA SILVA, A. V. M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 832-836, 2003.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics**, v. 45, p. 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 4, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

Di MUCCIO, T.; FIORENTINO, E.; FOGLIA, M. V.; CAPIELLO, S.; OLIVA, G. The potential role of conjunctival swab analysis for the early detection of *Leishmania* dog contacts: a preliminary study. **Parassitologia**, v. 50, p. 1-2, 2008.

DI MUCCIO, T.; VERONESI, F.; ANTAGNONI, M. T.; ONOFRI, A.; FIORETTI, D. P.; GRAMICCIA, M. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 2651-2659, 2012.

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

DIETZE, R. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. In: CONSULTA DE LOS EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2006, Rio de Janeiro. Informe final de la reunion de expertos OPAS/OMS sobre Leishmaniasis en las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, 2006. p.63-65.

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

EL AMIN, E. R.; WRIGHT, E. P.; ABDEL RAHMAN, A. M.; KOLKA, A.; LAARMAN, J. J.; PONDMAN, K. W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 271-4, 1986.

ELKHOURY, A. N. S. M. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: CONSULTA DE LOS EXPERTOS OPAS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 2005, Rio de Janeiro. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis en las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la salud, 2005. p. 24-26.

EL SAFI, S. H.; EVANS, D. A. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 334-337, 1989.

EVANS, D. **Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1989. p. 45.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A. B.; LIMA, J. B.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; LOPES, U. G.; PEARSON, R. D.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 118-23, 1990.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Fórum sobre leishmaniose visceral canina, 2006. p. 10-11.

FERRARI, H.F; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M.C.R. Miocardite Associada a *Leishmania* sp em cão - Relato de caso. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 10., 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Fórum de Leishmaniose Visceral canina, 2006. p. 48.

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S, SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. G.; Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 235-241, 2007.

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR– hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 257-263, 2008.

FERREIRA, S. A. **Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da Leishmaniose visceral canina por PCR**. 2012. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

FERREIRA, S. A.; LEITE, R. S.; ITUASSU, L. T.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, D. M.; FUJIWARA, R. T.; ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an

endemic urban area in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1596, 2012.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Current veterinary therapy: small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.

FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Hoechst Roussel Vet, 1999. p. 6-10.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla, Spain. **Proceedings...** Salamanca: Intervet International, 2002. p. 21-24.

FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGRO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 105-111, 2001.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 2, p. 195-200, 1960.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; RÊGO JR., F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 378-390, 1997.

GARCIA, A. L.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, K. W.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; AREVALO, J.; BAÑULS, A. L.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, p. 109-116, 2005.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D.; SERRANO, F. J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 18, p. 617-623, 1996.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

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

GOMES, Y. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002. **Proceedings... 2002**. p. 7-14.

GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T.; FIORENTINO, E.; SCALONE, A.; BONGIORNO, G.; CAPIELLO, S.; PAPANCONI, R.; MANZILLO, V. F.; MAROLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Longitudinal study on the detection of canine Leishmania infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 223-228, 2010.

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

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

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBANEZ, M. A.; CASTILLO, J. A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 13-20, 2002.

GUILLÉN LLERA, J. L.; LÓPEZ GARCÍA, M. L.; MARTÍN REINOSO, E.; DE VIVAR GONZÁLEZ, R. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 185-190, 2002.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 403-409, 2011.

HEADINGTON, C. E.; BARBARA, C. H.; LAMBSON, B. E.; HART, D. T.; BARKER, D. C. Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 195-197, 2002. Supplement, 1.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOFMAN, V.; BROUSSET, P.; MOUGNEAU, E.; MARTY, P.; LAMANT, L.; ANTOINE, J. C.; GLAICHENHAUS, N. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (10–11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. **American Society for Clinical Pathology**, v. 120, p. 567-574, 2003.

HOLLAND, C.; SILVA, J. R. P.; SZALATNAY, J. V.; SANTOS, R. L.; ISAACSON, L.; RABELO, R. SILVA, F.; BROWN, C. Leishmaniose em Cães. 2002. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/vpp/nsep/Brazil2002/leishmania/Port/Leish03.htm>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, p. 213-218, 1978.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 14 set. 2012.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELEN, J.; MIRON, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunology**, v. 24, p.113-118, 2002.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative

application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 99-113, 2003.

JOHN, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A. Rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 192, p. 408-408, 1991.

JUSI, M. M. G.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; TENÓRIO, M. S.; SOUSA, L. O.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 219-222, 2011.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.-P.; CADIÈRGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 15-21, 1997.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 907-910, 2007.

KUBOKI, N. N.; INOUE, T.; SAKURAI, T.; DI CELLO, F.; GRABI, D. J.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5517-5524, 2003.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 613-7, 2001.

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

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR., J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5444-5444, 1991.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: A Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecology and epidemiology: new world. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press Inc., 1987. v. 1, p. 291.

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

LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B.; SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; PAES, A. C. American visceral leishmaniasis: a case report. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, p. 361-372, 2005.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **British Medicine Journal**, v. 1, p. 1252-1254, 1903.

LEITE, R. S.; FERREIRA, S. A.; ITAUSSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab sample. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 201-206, 2010.

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™) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, v. 107, 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, p. 19-27, 2002.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; ILKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA, M. M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with

visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 36, p. 485-489, 2003.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 42, p. 43-53, 2004.

LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; DUARTE, S. C.; FERNANDES, P. R.; AMARAL, A. V. C.; SOUZA, M. A. Relato de um caso clínico de leishmaniose visceral em um cão na cidade de Goiânia. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 69-72, 2005.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÌ, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 10–17, 2012.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P. J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, p. 469-474, 1996.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: ANAIS DO FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 10., 2006, Jaboticabal. **Proceedings...** Jaboticabal: Fórum de Leishmaniose Visceral canina, 2006. p. 15-22.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

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

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 142-144, 2009.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 251-262, 2004.

MARY, C.; FARAUT, F.; LASCOMBE, L.; DUMON, H.; Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5249-5255, 2004.

MEDRONHO, R. A.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. **Epidemiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 417-420.

METTLER, M.; GRIMN, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent anti-body test, and to rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5515-5519, 2005.

MICHALICK, M. S. M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 56-72.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera : Psychodidae Phlebotominae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sandflies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67-76, 2007.

MILES, M. A.; VEXENAT, J.A.; CAMPOS, J. H. F.; CASTRO, J. A. D. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Hoechst Roussel Vet, 1999. p. 46-53.

MOLINA, R. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania Infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491 - 493, 1994.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; COELHO, G. L. L. M.; ROCHA, M. F.; DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Visceral leishmaniasis: a study phlebotomine sand flies and canine infection in

Montes Claros, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 147-152, 2005.

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

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

MORENO, M. A.; MORENO, T.; MORENO, M. F.J.; ACOSTA, I.; HERNANDEZ, S. Humoral and cell mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 209-220, 1995.

NASEREDDIN, A.; EREQAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 178-183, 2006.

NEJJAR, R.; LEMRANI, M.; MALKI, A.; IBRAHIMY, S.; AMAROUCH, H.; BENSLIMANE, A. Canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* MON-1 in northern Morocco. **Parasite**, v. 5, p. 325-330, 1988.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du Kala azar. **Academy of Science**, v. 146, p. 789, 1908.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 213-232, 2005.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V. F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA, G. G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243-248, 1993.

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

OSHAGHI, M. A.; RASOLIAN, M.; SHIRZADI, M. R.; MOHTARAMI, F.; DOOSTI, S. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 445-450, 2010.

OZBEL, Y.; OSKAM, L.; OZENSOY, S.; TURGAY, N.; ALKAN, M. Z.; JAFFE, C. L.; OZCEL, M. A. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. **Acta Tropica**, v. 74, p. 1-6, 2000.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 510-517, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PAPADOPOULOU, C.; KOSTOULA, A.; DIMITRIOU, D.; PANAGIOU, A.; BOBOJIANNI, C.; ANTONIADES, G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. **The Journal of Infectious**, v. 50, p. 53-60, 2005.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R.; DIGGS, C. L.; HOCKMEYER, W. T. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 425-426, 1983.

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

PEREIRA, V. F.; STARKE-BUZETTI, W. A.; SILVA, D. T.; BENASSI, J. C.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Uso de suabe conjuntival em inquéritos epidemiológicos para leishmaniose visceral canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 17., 2012. **Anais...** 2012. v. 1.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 872.

PETERS, W.; EVANS, D.A.; LANHAM, S.M. Importance of parasite identification in cases of leishmaniosis. **Journal of the Royal Society of Tropical Medicine**, v. 27, p. 67-72, 1983.

PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F.; DUMON, H.; FONTES, M.; DUNAN, S.; MARY, C.; TOGA, B.; QUILICI, M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 746-749, 1994.

PILATTI, M. M.; FERREIRA, A. F.; MELO M. N.; ANDRADE A. S. R. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 255-257, 2009.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BENADINA, W.; DELREAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectious Immunology**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR., 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, p. 544-548, 2007.

QUARESMA, P. F.; MURTAB, S. M. F.; FERREIRA, E. C.; ROCHA-LIMA, A. C. V. M.; XAVIER, A. A. P.; GONTIJO, C. M. F.; Molecular diagnostic of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, v. 111, p. 289-284, 2009.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em

associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

QUEIROZ, P. V.; MONTEIRO, G. R.; MACEDO, V. P.; ROCHA, M. A.; BATISTA, L.M.; QUEIROZ, J. W.; JERONIMO, S. M.; XIMENES, M. F. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 267-273, 2009.

RALLIS, T.; DAY, M. J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A. F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, p. 145-152, 2005.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2931-2935, 1999.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102-116, 2006.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 289-290, 2002.

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; COUNIHAN, H.; ESPINOZA, J. C.; GONZÁLEZ, J. S.; DAVIES, C. R. *Leishmania (Viannia) spp.* dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 76-78, 2002a.

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

REITHINGER, R.; LAMBSON, B. E.; BARKER, D. C.; DAVIES, C. R. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 748-751, 2000.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 55-62, 2004.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of Leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 21-25, 2007.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 349.

ROCHA, M. N.; MARGONARI, C.; PRESOT, I. M.; SOARES, R. P. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 401-409, 2010.

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

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; FERNÁNDEZ-BELLÓN, H.; RAMIS, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J.; LAIA SOLANO-GALLEGO, L. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 190-198, 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; FRANCINO, O.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALBEROLA, J. Leishmania Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a "Gold Standard". **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 251-256, 2010.

RONDON, F. C.; BEVILAQUA, C. M.; FRANKE, C. R.; BARROS, R. S.; OLIVEIRA, F. R.; ALCANTARA, A. C.; DINIZ, A. T. Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceara state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 24-31, 2008.

ROSÁRIO, E. Y. GENARO, O.; SILVA, F. J. C.; 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, p. 197-203, 2005.

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

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, p. 262-264, 1999.

SÁNCHEZ, C. A.; SANCHEZ, J. M.; BERNAL, I. D. V.; MARIN, M. C. S.; LOUASSINI, M.; MALDONADO, J. A.; MARQUEZ, F. M. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 303-310, 1996.

SÁNCHEZ-GARCÍA, L.; BERZUNZA-CRUZ, M.; BECKER-FAUSER, I.; REBOLLAR-TÉLLEZ, E. A. Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) *mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine**, v. 104, p. 406-411, 2010.

SANTA-ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 193-198, 2000.

SÃO PAULO (Estado). Centro de vigilância epidemiológica (CVE). Leishmaniose Visceral Americana Humana. **Casos autóctones e óbitos de LVA, no Estado de São Paulo, 1999 a 2009**. 2009. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 22 nov. 2012.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V. I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 82-86, 2005.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONEF, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUEH, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 275-285, 2002.

SCHLEIN, Y. Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, p. 255-257, 1993.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, H. Observações sobre o calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre o *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, p. 541-548, 1969.

SHERLOCK, I. A.; MIRANDA, J. C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JR., G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 511, 1984.

SHROUT, P. Measurement reliability and agreement in psychiatry. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 7, p. 301-317, 1998.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O. Short Report: Detection of Leishmania DNA by Polymerase Chain Reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 896-898, 2001.

SILVA, E. S.; PIRMEZ, C.; GONTIJO, C. M. F.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Veterinary Record**, v. 147, p. 421-2, 2000.

SILVA, E. S.; VAN DER MEIDE, W. F.; GONTIJO, C. M. F.; OLIVEIRA, F. S.; SCHOONE, G. J.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PACHECO, R. S. *Didelphis marsupialis* and *Rattus rattus*: a potential reservoir host for zoonotic Leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. In: WORLD CONGRESS ON LEISHMANIOSIS, 3., 2005, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy. **Abstract Book...** Palermo-Terrasini, Sicily, Italy: World Congress on Leishmaniasis, 2005. p. 208.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.

SMYTH, A. J.; GHOSHA, A.; HASSAN, M. Q.; BASUA, D.; DE BRUIJNA, M. H. L.; ADHYAA, S.; MALLIKA, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, v. 105, p. 183-192, 1992.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis,

clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 139, p. 560-3, 2001.

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

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GOMEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1779-33, 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, p. 951-958, 2002.

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

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

TARALLO, V. D.; DANTAS-TORRES, F.; LIA, R. P. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. **Acta Tropica**, v. 116, p. 227-234, 2010.

TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, p. 657-667, 2003.
TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. Leishmania spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 118-123, 2009.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177-185, 1996.

VIEIRA, J. B.; COELHO, G. E. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 85-92, 1998.

VIÑUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 23-27, 2001.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 113-30, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Research on leishmaniasis. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 27 nov. 2012.

XAVIER, S. C.; ANDRADE, H. M.; JAMIL, S.; MONTE, H.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 1-7, 2006.