MÁRCIA CRISTINA SONODA

Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo

2007

MÁRCIA CRISTINA SONODA

Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

São Paulo
2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1902
FMVZ

Sonoda, Márcia Cristina

Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo / Márcia Cristina Sonoda. -- São Paulo: M. C. Sonoda, 2007.
115 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1. Leishmaniose visceral. 2. Cães. 3. Imunoistoquímica. 4. Elisa.
5. Imunofluorescência indireta. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Leishmaniose canina: avaliação de metodologia diagnóstica e caracterização da prevalência de casos atendidos no período de março de 1997 a março de 2007, no Hospital Veterinário Campus de São Paulo", protocolado sob o nº1204/2007, utilizando colheita de dados, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research "Canine leishmaniasis: survey of methodology diagnostic and prevalence from retrospective cases studies between 1997 March and 2007 March, at the Veterinary Hospital Campus of the São Paulo", protocol number 1204/2007, utilizing cases studies, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SONODA, Márcia Cristina

Título: Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha mãe **Estella** (*in memorian*) e ao meu pai **Natomi** 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 saudosa irmã **lára** (*in memorian*) por toda a dedicação, apoio e todo o amor recebido durante os anos que convivemos juntas!

À minha querida irmã **Andréa**, pelas palavras de incentivo, cumplicidade e de amizade!

Ao meu noivo **Greg**, minha vida, meu companheiro e amigo, o amor da minha vida!

Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Carlos Eduardo Larsson**, por compartilhar comigo a sua amizade e família. Um orientador disposto 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, dedicado e generoso, 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 pelo “mestre” que o senhor é!

Agradecimentos

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.

À Prof^a Dr^a Mary Marcondes Feitosa, pelos esclarecimentos, críticas e sugestões valiosos para o aprimoramento deste trabalho e pelo bom exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Prof^a Dr^a Márcia Dalastra Laurenti pela receptividade, amizade e incondicional ajuda para a realização de meu trabalho.

À Faculdade de Medicina da USP, ao Laboratório de Investigações Médicas, em especial à Thaise, pelo acolhimento, apoio técnico e amizade.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela realização dos exames sorológicos.

Ao Prof^o Nílceo Michalany pela realização dos exames histopatológicos e preparo das lâminas para a técnica de imunoistoquímica.

À Prof^a Dr^a Silvia Regina Ricci Lucas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, pelo incentivo e conselhos deixados em momentos importantes de minha vida.

Às secretárias da Clínica Médica e da pós-graduação, em especial a Adelaide, pela paciência, atenção e apoio.

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

À Mary Otsuka, uma amiga muito especial, a quem tenho muito carinho. Foi uma “professora dermatóloga” e hoje sou grata por tudo que me ensinou. Muito obrigada pela sua amizade, preocupação e ajuda em todos os sentidos.

Às minhas queridas amigas de “plantão”, Luciana e Tati, amigas indescritíveis, sempre presentes, nas horas tristes, de estresse e de alegria. Sou muito grata pela amizade que conquistamos!

Aos amigos de pós-graduação que sempre me acolheram com afeto e companheirismo, me auxiliaram em problemas ligados à pesquisa e à particularidades do cotidiano. São todos especiais: Ana Balda, Ericka, Rita, Ângela, Simoni, Luiz, Carlão.

Aos residentes, veterinários e estagiários do HOVET-USP, pela amizade.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da FMVZ-USP “Toninho” e Geraldo por sempre estarem por perto nas horas mais precisas. Pela amizade, paciência e profissionalismo.

Ao meu noivo Greg, pelo apoio e ajuda cartográfica e elaboração das tabelas e figuras fundamentais para este estudo.

Ao meu cunhado Lucas, pelas preciosas informações referentes ao preparo da tese e pela eterna amizade!

Aos meus sogros, Nilda e Celso, pela compreensão, força e admiração que tenho por eles.

Aos meus eternos amigos, do coração: Alberto, Paulinha, Samantha, Isabelle, Sandra, Kuroda, Andréa Alves, Taís, Vera Lúcia, Betânia e Renata, os quais muito me ajudaram, pela força e pela amizade e carinho.

Ao meu amigo Roberto pela imensa paciência, ajuda profissional e psicológica.

Aos meus sobrinhos, Caio e Eleonora, pela alegria e companheirismo.

Às minhas ternurinhas, “Barbie”, “Gabi” e “Grace”, que sempre me acompanharam incondicionalmente meu estudo.

Aos animais, motivo maior de meu respeito e gratidão.

À Deus

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

Se procurar bem você acaba encontrando

Não a explicação (duvidosa) da vida

Mas a poesia (inexplicável) da vida

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

SONODA, M. C. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.** [Canine visceral leishmaniasis: clinical and epidemiologic aspects of cases attended between 1997 to 2007, at the Animal Hospital of the Faculty of Medicine and Zootechny of the University of São Paulo] 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A leishmaniose é uma enfermidade zoonótica causada por protozoário pleomórfico do gênero *Leishmania*. Face a magnitude de alastramento da doença, em especial no Brasil, foi realizado levantamento retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina diagnosticados (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos do HOVET/USP. A amostragem compôs-se de 36 casos caninos, naturalmente infectados por *Leishmania sp.* O diagnóstico foi estabelecido pela caracterização propiciada pelos dados anamnéticos, de exames físico e dermatológico, complementados por exames hematológicos, bioquímicos e imagéticos, além de sorologia (ELISA e/ou RIFI), histopatologia de pele e/ou pela evidencialização do protozoário em exames parasitológicos de biópsia aspirativa de linfonodos e/ou medula óssea e pela técnica de imunoistoquímica. Os objetivos foram: evidenciar os aspectos clínico-dermatológicos de animais com diagnóstico estabelecido; caracterizar epidemiologicamente os casos, enfocando aspectos de aloctonia ou de autoctonia. Além de avaliar a aplicação da técnica de imunoistoquímica de pele visando o diagnóstico etiológico, comparando e relacionando-a aos exames complementares. Pôde-se concluir que: todos os casos foram alóctones; não houve predisposição por um determinado sexo; a faixa etária (52,8%) foi aquela dos 13 a 48 meses de vida, com maior acometimento de cães de raças definidas (Poodles e Labradores). Quanto aos municípios de origem: Ilha Bela e Ubatuba, um caso de cada, são considerados como silenciosos não receptivos não vulneráveis; Campinas, Campo Limpo Paulista, Holambra, São Roque, Sorocaba e Uberaba (um caso de cada) como silenciosos não receptivos vulneráveis. Os demais 28 cães do Estado de São Paulo originaram-se de municípios com transmissão: canina e humana (Araçatuba – três, Bauru – um), canina (Cotia – cinco, Embu –

quatro) ou sob investigação (São Paulo – 11, Mogi das Cruzes – um). Já Portugal (um) e Minas Gerais (Belo Horizonte – dois) são locais caracterizados como de transmissão canina e humana. Pôde-se evidenciar deslocamentos breves ou longos, a 14 municípios paulistas (Araçatuba, Birigui, Caraguatatuba, Cotia, Eldorado, Embu e Embu Guaçu, Guarujá, Ilha Bela, Itapeverica da Serra, Peruíbe, Presidente Prudente, São Roque e São Paulo Capital) e cinco Estados (Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina). De acordo com a classificação sintomatológica 50% eram oligossintomáticos, 47,2% sintomáticos e 2,8% assintomáticos. As alterações cutâneas se localizavam principalmente em região cefálica, membros e região abdominal, incluíam-se: rarefação pilosa e/ou alopecia (45,7%), escamas (40%), ulcerações (37,1%) e crostas (37,1%), sendo o prurido associado em 63,9% dos casos. Os achados clínicos mais freqüentes foram: linfadenomegalia (74%), pirexia (44,4%), disorexia (40,7%), emagrecimento (29,7%), hepato (29,7%) e esplenomegalia (25,6%). As alterações laboratoriais foram: hiperproteinemia (56,5%), hipoalbuminemia (52,1%), anemia e trombocitopenia (34,8% cada). Correlacionando a técnica de imunoistoquímica com os exames de ELISA e RIFI, observou-se que a RIFI (100%) foi mais representativa dos casos positivos, em seguida ao exame de ELISA (87,5%) e ao de imunoistoquímica (37,5%). A técnica de imunoistoquímica, empregada em cortes histológicos de 12 (33%) permitiu evidenciar a presença do agente em sete (58,3%): dois (33,3%) oligossintomáticos e cinco (83,3%) sintomáticos. Desta forma, permite-se caracterizá-la como metodologia de inegável valia, superando os resultados positivos da histopatologia (30,8%).

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Cães. Imunoistoquímica. Elisa.
Imunofluorescência indireta

ABSTRACT

SONODA, M. C. **Canine visceral leishmaniasis: clinical and epidemiologic aspects of cases attended between 1997 to 2007, at the Animal Hospital of the Faculty of Medicine and Zootechny of the University of São Paulo.** [Leishmaniose visceral canina: aspectos clínico-epidemiológicos de casos atendidos no período de 1997 a 2007, no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo]. 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Leishmaniasis is a worldwide chronic zoonotic disease caused by pleomorphic protozoa of the genus *Leishmania*. The spread of the disease in Brazil lead to this retrospective survey of canine visceral leishmaniasis diagnosed (1997-2007) at the Service of Dermatology and Medical Clinics of the Small Animal Hospital-USP. We evaluated the records of 36 dogs naturally infected with *Leishmania sp.* Diagnosis included disease characterization during anamnesis, physical and dermatologic examination, hematology, biochemistry, imaging, serology (ELISA or RIFI), skin histopathology and/or agent isolation from aspiration biopsy samples of lymph nodes and/or bone marrow, and immunohistochemistry. In addition to epidemiologic characterization, we aimed to determine clinical and dermatologic aspects of canine leishmaniasis, and to compare diagnostic efficacy of skin immunohistochemistry, ELISA and RIFI. All cases were allochthonous without gender predilection, 52.8% were 13 to 48 months old; mostly Poodles (20.8%) and Labradors (20.8%). Regarding origin: Ilha Bela and Ubatuba (one case each) are classified as silent, non-receptive and not vulnerable; Campinas, Campo Limpo Paulista, Holambra, São Roque, Sorocaba and Uberaba (one case each) are classified as vulnerable. The remaining 28 cases from the State of São Paulo were located in cities with reported canine-human transmission (Araçatuba – three, Bauru – one), intra-canine transmission (Cotia – five, Embu – four) or cities under investigation (São Paulo – 11, Mogi das Cruzes – one). Portugal (one) and Minas Gerais (Belo Horizonte – two) reported canine-human transmission. Prior to the leishmaniasis development dogs remained for short or long periods in 14 cities in the State of São Paulo: Araçatuba, Birigui, Caraguatatuba, Cotia, Eldorado, Embu e Embu Guaçu, Guarujá, Ilha Bela, Itapequerica da Serra, Peruíbe, Presidente Prudente, São Roque and São Paulo

Capital) and five other Brazilian States (Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro and Santa Catarina. Most animals were oligosymptomatic (50%), 47.2% symptomatic and 2.8% asymptomatic. The majority of lesions was on the head, limbs and abdominal region, and included: hair loss and/or alopecia (45.7%), scales (40%), ulcers (37.1%), and crusts (37.1%), with 63,9% associated pruritus. The most common clinical findings were: lymph node enlargement (74%), pyrexia (44,4%), disorexia (40.7%), weight loss (29.7%) , liver (29.7%) and spleen (25.6%) enlargement. Most frequent alterations in laboratory exams were: hyperproteinemia (56.5%), hypoalbuminemia (52.1%), anemia, and thrombocytopenia (34.8% both). RIFI was more representative (100%) in positive cases, followed by ELISA (87.5%) and immunohistochemistry (37.5%). Immunohistochemistry was used in histology samples of 12 (33%) cases and allowed us to detect the agent in seven (58.3%) cases: two (33.3%) oligosymptomatic and five (83.3%) symptomatic. Thus, immunohistochemistry is a useful method, and more effective than histopathology (30.8%).

Key words: visceral leishmaniasis, dog, immunohistochemistry, ELISA, indirect immunofluorescence

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização (Nº e %) dos municípios paulistas e mineiros ou do país de nascimento de 36 cães com leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	43
Tabela 2 -	Resultados de sorologia (Nº e %) empregada, para diagnóstico de leishmaniose visceral pelo método e ELISA de 35 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	56
Tabela 3 -	Resultados de sorologia (Nº e %) empregada para diagnóstico de leishmaniose visceral pela RIFI, de 21 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	56
Tabela 4 -	Resultados (Nº e %) da técnica de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral, de 12 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo–2007	57
Tabela 5 -	Resultados (Nº e %) do exame parasitológico, em material provindo de punção aspirativa de linfonodos para diagnóstico de leishmaniose visceral, de 16 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	57
Tabela 6 -	Resultados (Nº e %) do exame parasitológico, em material provindo de punção aspirativa de medula óssea, para diagnóstico de leishmaniose visceral, de seis cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 200	57
Tabela 7 -	Distribuição de frequência (Nº e %) de resultados obtidos pelo teste de ELISA de 35 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (assintomático, oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	58

Tabela 8 -	Distribuição de frequência (N° e %) de resultados obtidos pelo teste de RIFI de 21 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (assintomático, oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	59
Tabela 9 -	Distribuição de frequência (N° e %) de resultados obtidos pelo método de imunoistoquímica de 12 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	59
Tabela 10 -	Distribuição de frequência (N° e %) de resultados obtidos pelo exame parasitológico provindo de aspiração de linfonodos de 16 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo – 2007	60
Tabela 11 -	Distribuição de frequência (N° e %) de resultados obtidos pelo exame parasitológico de material provindo de aspiração de medula óssea de seis casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (oligossintomático e sintomático), de cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	60
Tabela 12 -	Resultados (%) dos exames complementares segundo o quadro sintomológico de cães com leishmaniose visceral (n=36) atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo (2007)	61
Tabela 13 -	Resultados (N° e %) de sorologia (ELISA e RIFI) de 20 animais para diagnóstico de leishmaniose visceral em amostras de soro de cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	62
Tabela 14 -	Resultados (N° e %) de sorologia (ELISA) e de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em 12 amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	63

Tabela 15 - Resultados (Nº e %) de sorologia (RIFI) e imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	64
Tabela 16 - Resultados (Nº e %) de sorologia (ELISA e RIFI) e de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos municípios para a vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo	32
Figura 2 - Distribuição (%), segundo o sexo, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo – 2007	41
Figura 3 - Distribuição (%), segundo a faixa etária, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo – 2007	41
Figura 4 - Distribuição (%), segundo a definição racial, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviço de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007. (CRD = com raça definida; SRD = sem raça definida).....	42
Figura 5 - Distribuição (%) de 24 cães de raça definida acometidos por leishmaniose visceral, atendidos(1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	42
Figura 6 - Mapa de Estados ou Municípios brasileiros, segundo a origem, de 35 cães com diagnóstico de leishmaniose visceral atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo – 2007.....	44
Figura 7 - Mapa de Estados ou Municípios brasileiros, segundo a residência de 36 cães, com leishmaniose visceral quando do primo atendimento, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP. São Paulo – 2007.....	46
Figura 8 - Mapa relativo a Estados (n=5) ou Municípios brasileiros de deslocamento referido de 23 cães com leishmaniose visceral quando do primo atendimento, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	47
Figura 9 - Distribuição (%), segundo a classificação sintomatológica, de 36 cães Acometidos por leishmaniose visceral, atendidos	

(1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	48
Figura 10 - Distribuição (%) das alterações cutâneas ou fanéricas de 35 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	49
Figura 11 - Distribuição (%), segundo a presença de prurido corpóreo, de 35 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo – 2007	50
Figura 12 - Distribuição (%), segundo topografia de assentamento lesional, de 35 cães acometidos por leishmaniose visceral atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	51
Figura 13 - Distribuição (%), segundo alterações sistêmicas, de 27 cães acometidos por leishmaniose visceral atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	52
Figura 14 - Distribuição (%) das enfermidades sistêmicas e/ou tegumentares associadas ao quadro de leishmaniose visceral de seis cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	53
Figura 15 - Distribuição (%) dos achados laboratoriais de 36 cães acometidos por leishmaniose, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	54
Figura 16 - Distribuição (%) dos achados laboratoriais detectados em 23 cães acometidos por leishmaniose, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo – 2007.....	54
Figura 17 - Distribuição (%) dos exames complementares realizados (ELISA, RIFI, imunoistoquímica, parasitológico de linfonodo e de medula óssea) de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007	55
Figura 18 - Resultados (%) de sorologia (ELISA e RIFI) para diagnóstico de leishmaniose visceral em amostras de soro de 20 cães	

atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007.....	62
Figura 19 - Resultados (%) de sorologia (ELISA) e imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em 12 amostras de soro e biópsia de pele 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007.....	63
Figura 20 - Resultados (%) de sorologia (RIFI) e imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007.....	64
Figura 21 - Resultados (%) de sorologia (ELISA e RIFI) e de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo – 2007.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	LEVANTAMENTO DA CASUÍSTICA.....	36
3.2	TÉCNICA DE ELISA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	37
3.3	FRAGMENTOS DE PELE LESADA.....	38
3.4	TÉCNICA DE IMUNOSTOQUÍMICA.....	39
3.5	EXAME PARASITOLÓGICO DE MATERIAL COLHIDO POR PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA DE LINFONODOS E DE MEDULA ÓSSEA.....	39
4	RESULTADOS	40
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXOS.....	91
	APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa de caráter crônico, zoonótico e de distribuição mundial, causada por um protozoário pleomórfico da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. 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 (RIBEIRO, 1997; MICHALSKY et al., 2002), comuns no cão e no homem.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), a leishmaniose visceral é uma das sete endemias mundiais afetando de um a dois milhões de pessoas a cada ano. Estima-se que cerca de 360 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção no mundo. Ocorre em 47 países e tem como agente etiológico três espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani* na Índia e leste da África; *Leishmania (Leishmania) infantum* na China, Ásia Central, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, na Américas do Sul e Central. De acordo com alguns autores, a *L. chagasi* foi recentemente considerada idêntica à *L. infantum* (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; MILES et al., 1999).

As primeiras referências a esta doença foram descritas em 1882 como sendo um quadro de esplenomegalia, que ocorria endemicamente em certas regiões da Índia, relacionado à ancilostomíase ou a um tipo de malária (GILES, 1890; ROGERS, 1908). Em 1903, Leishman observou o agente etiológico em autópsias, considerando os quadros mórbidos como uma forma involutiva de um *Trypanosoma*. No mesmo ano, Donova (1903) observou organismos em preparados de fígado e baço autopsiados, descrevendo-os como uma forma distinta de *Trypanosoma*. Somente em 1903, em estudos na Índia, Laveran e Mesnil (1903), consideraram que

o parasito associado ao calazar indiano poderia ser um piroplasma (*Piroplasma donovani*) e ROSS (1903) o redenominou como *Leishmania donovani*.

O primeiro caso autóctone humano nas Américas, foi detectado por Migone (1913), que observou a presença de “corpúsculos”, semelhantes ao da *Leishmania*, no sangue de um paciente. Tal paciente, proveniente do Paraguai, trabalhava na construção da estrada de Ferro (São Paulo-Corumbá) e, a partir deste deslocamento, iniciou com sintomatologia característica da leishmaniose visceral e foi submetido ao tratamento para malária sem obter melhora, vindo a óbito.

No Brasil, os primeiros possíveis relatos datam de 1911 quando Carlos Chagas suspeitou da ocorrência desta doença na região do rio Amazonas (CHAGAS, 1937). Em 1934, Penna, ao pesquisar a febre amarela em Salvador detectou a presença de parasitos de *Leishmania donovani* em prepapapados histológicos de fígado (PENNA, 1934). Posteriormente, através de estudos sobre a morfologia do parasita em cultura e no hospedeiro verteberado, bem como de sua patogênese, foi sugerido tratar-se de uma nova espécie do gênero *Leishmania*, sendo então denominada de *Leishmania chagasi*, em homenagem a Carlos Chagas (CHAGAS, 1937).

A leishmaniose visceral ocorre em 11 países das Américas do Sul e Central, sendo que no Brasil as principais áreas atingidas são o norte, nordeste e o centro oeste, embora existam focos crescentes na região sudeste e sul (PESSOA, 1982; LAINSON; SHAW, 1987).

No Estado de São Paulo, o primeiro relato de suspeita de autóctonia da doença humana foi registrado na Grande São Paulo, em 1978, por Iversson (1979) sem confirmação da suspeita. O primeiro relato de casos caninos alóctones se deu em 1997, em São Paulo, Capital, no Serviço de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, quando foi relatado duas cadelas infectadas, respectivamente, em Minas Gerais e Maranhão (LARSSON et al., 1998).

Em 1988, no Município de Araçatuba (São Paulo) foi detectada a presença de *Leishmania* sp em exame parasitológico direto de cães com suspeita clínica de LV, sendo posteriormente identificada, como agente, *L. chagasi* (BIAZZONO, 1999). Estes fatos, associados à presença do mosquito transmissor, *Lutzomyia longipalpis*, notificada em 1997, confirmaram a autoctonia da LV canina em área urbana de

Araçatuba. Em 1999, no mesmo município, foi registrado o primeiro caso humano autóctone no Estado (CAMARGO-NEVES, 1999).

Em diversos estados brasileiros, a LV tem acometido o homem e os cães, sendo considerada uma endemia. Esta zoonose era registrada como uma doença rural, no entanto, nos últimos anos, tem aumentado sua prevalência em áreas urbanas de grandes cidades do Brasil como Belo Horizonte-MG, Rio de Janeiro-RJ, São Paulo-SP (COSTA et al., 1991; TAFURI et al., 1996).

Os hospedeiros vertebrados são animais silvestres como gambás, roedores, tamanduás, tatus, canídeos silvestres, primatas e preguiças; animais domésticos como o cão, o equino e o próprio homem. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico (SPLAPPENDEL; FERRER, 1998).

Os parasitos apresentam-se sob duas formas: a amastigota, contendo núcleo e cinetoplasto, que é encontrada no interior de células do sistema monuclear fagocitário e na pele; e a forma promastigota, que possui núcleo, cinetoplasto, um flagelo livre e é encontrada no tubo digestório do inseto vetor. Ambas as formas se multiplicam por divisão binária (SPLAPPENDEL, 1988; ALENCAR, 1991).

Os vetores da leishmania visceral são insetos da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie nas Américas (REY, 2001) e considerada, durante muito tempo, como a única transmissora da doença. Entretanto, Santos et al. (1998) demonstraram a participação de *Lutzomyia cruzi*, como vetor no Mato Grosso do Sul e a *Lutzomyia intermedia* no litoral do município do Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 1994).

A transmissão da *L. chagasi* ocorre através da picada da fêmea de *Lu. longipalpis*, conhecidos popularmente como “mosquito palha”, “birigui” ou “tatuquira”, que ingere, com o sangue sugado, células do sistema monoculear fagocitário, macrófagos e leucócitos parasitados pelas formas amastigotas, presentes no local da picada. No tubo digestório do mosquito, tais formas transformam-se em promastigotas metacíclicas (infectantes), que se multiplicam e são inoculadas, em novo repasto sanguíneo, no novo hospedeiro não infectado (homem ou outro animal). No vertebrado, transformam-se rapidamente em amastigotas, ocorrendo a disseminação linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A infecção dissemina-se então para linfonodos, baço e medula óssea

fechando assim o ciclo de transmissão (GENARO, 2000; BANETH, 2006), o qual pode se completar em torno de 72 horas (RIBEIRO, 1997).

Outras formas de transmissão também podem ocorrer. No homem, a doença pode ser transmitida por via congênita ou por transfusão de sangue infectado (PEARSON et al., 1996). Segundo Andrade et al. (2002) no cão a transmissão vertical não é confirmada.

O cão possui grande importância epidemiológica, pelo fato da prevalência canina ser alta em áreas endêmicas, bem como, por preceder a ocorrência de casos humanos. Afora isso, o mais preocupante é que muitos cães infectados não apresentam sintomatologia da doença, porém podem albergar parasitas na derme (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

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; PINELLI et al., 1999). 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-GALLEG0 et al., 2000). O principal fator que influencia a evolução da enfermidade é a resposta das células T pelo hospedeiro. Em camundongos demonstrou-se que os macrófagos, as células dendríticas e as células de Langerhans, infectadas por parasitas, atuam como células apresentadoras de antígenos ativando linfócitos (CD4+) Th1 e Th2. Caso sejam ativadas preferencialmente as células Th1 ocorrerá a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-2 (IL-2), interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (FNT) os quais aumentarão a eficiência das células fagocíticas e de linfonodos citotóxicos, desencadeando uma resposta imune celular protetora, podendo haver controle do parasitismo com eliminação da infecção. Em contraste, quando a infecção estiver associada com a indução de linfócitos Th2, ocorrerá a produção de citocinas anti-inflamatórias, dentre elas as interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13, as quais desencadearão proliferação de células B com subsequente produção de imunoglobulinas e desenvolvimento da infecção, ou seja, uma resposta imune humoral não protetora (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; FERRER, 2002). Esta resposta humoral poderá causar a exacerbação da infecção,

sendo demonstrada, em muitos casos, uma hipergamaglobulinemia e altos títulos de anticorpos produzidos pelos cães infectados (FERRER, 1998; PINELLI, 1999). Um perigo potencial da regulação de linfócitos T prejudicada e da atividade exuberante de linfócitos B é a formação de imunocomplexos circulantes, causando danos em vários órgãos e representando quadros de vasculites, uveítes, glomerulonefrites e artrites (BANETH, 2006; CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; KONTOS; KOUTINAS, 1993). Os imunocomplexos circulantes podem também ligar os seus complementos às células sanguíneas acarretando uma diminuição de sua meia vida, e evoluindo a quadros de anemia e trombocitopenia imunomediadas (LOPEZ et al., 1996). Pelo fato da *Leishmania* ser parasita intracelular obrigatório as defesas do hospedeiro são extremamente dependentes da atividade dos linfócitos T. Caso os linfócitos T nos órgãos linfóides estejam depletados haverá uma proliferação das células B, em resposta à infecção, e, conseqüentemente, sem o suporte das células T, os macrófagos não serão capazes de eliminar as formas amastigotas, evoluindo para uma disseminação dos parasitas por todo o corpo. Em uma infecção natural, pode haver ativação tanto os subtipos Th1 quanto Th2, sendo que a variedade dos sintomas e a gravidade da doença dependerão do equilíbrio entre esses dois sistemas (FEITOSA et al., 2000; PINELLI et al., 1994).

Em áreas endêmicas, 40% dos cães podem produzir resposta imune celular que pode estar associada à resposta imune humoral, determinando a resistência ou não à infecção (PINELLI et al., 1994; SANTOS et al., 1998). Convém ressaltar que a porcentagem de cães resistentes à enfermidade, em regiões endêmicas, não está totalmente estabelecida (FERRER, 1999)

Alguns cães após infecção podem desenvolver uma resposta imune efetiva mediadas por linfócitos T específicos (PINELLI et al., 1994). Esses animais não demonstram qualquer manifestação clínica ou podem apenas desenvolver nódulos cutâneos no ponto de inoculação. A reação tecidual nesses locais é descrita como “cancro de inoculação” e são comumente localizadas em regiões cefálicas tais como narinas ou pavilhões auriculares (VILAGRAN, 1997). Estas lesões podem apresentar-se com diâmetros variáveis, alopecicas, exulceradas e, por vezes, apruriginosas, podendo desaparecer dentro de um a seis meses (FERRER, 1999).

A sintomatologia da infecção canina apresenta o mesmo espectro de variação que a humana e, de acordo com alguns autores (MANCIANTI et al., 1988; SANTA

ROSA; OLIVEIRA, 1997), os cães soropositivos podem ser classificados clinicamente como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Na forma assintomática os animais não apresentam manifestações clínicas da infecção, porém representam quase 60% da soropositividade em áreas endêmicas. Em geral, possuem baixos títulos de anticorpos e normalmente a infecção pode se encontrar em fase inicial. Na forma oligossintomática, os animais podem apresentar sintomatologia clínica e/ou tegumentar, com até três tipos de manifestações, quer sejam, adenopatia linfóide, pequena perda de peso, pelame opaco, dentre outras e, por fim, os sintomáticos são aqueles que demonstram mais de três manifestações clínicas (com ou sem comprometimento tegumentar) características da doença, tais como, linfadenomegalia, pirexia, caquexia, distúrbios gastroentéricos, ulcerações cutâneas, alopecia e descamação, onicogribose, dentre outras).

A presença de lesões cutâneas é muito freqüente na LV canina, detectando em, aproximadamente, 90% dos casos. Os quadros dermatológicos podem apresentar padrões variados, nem sempre pruriginosos, podendo estar presente na ausência de outras manifestações clínicas da doença (CIARAMELLA et al., 1997; BLAVIER et al., 2001). As alterações tegumentares incluem excessiva descamação de localizada, principalmente em pavilhões auriculares e região pericoular, a difusa, despigmentação, hiperqueratose, rarefação pilosa, úlceras, nódulos intradérmicos, onicogribose, (FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001). A onicogribose, decorrente da presença do parasita na matriz ungueal, é um achado relativamente comum (FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001; SLAPPENDEL, 1988)

Correlacionando aos sintomas, pode-se evidenciar desde emagrecimento, pirexia, até alterações locomotoras (FEITOSA et al., 2000). Estes podem variar em decorrência dos mecanismos imunológicos ativados pelo hospedeiro bem como dos órgãos acometidos. Dentre as alterações sistêmicas a linfadenomegalia generalizada e esplenomegalia, seguidas pela perda de peso são as mais evidenciadas (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; KONTOS; KOUTINAS, 1993) podendo também constatar quadros gastroentéricos, locomotores, renais, hepáticos, oftálmicos e neurológicos (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; KONTOS; KOUTINAS, 1993).

Os achados laboratoriais caracterizam-se principalmente por alterações hematológicas como a anemia, geralmente normocítica normocrômica, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia, trombocitopenia, leucopenia associada à linfopenia ou leucocitose (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; NOLI, 1999).

Apesar da grande diversidade de manifestações clínicas existem animais aparentemente saudáveis e aqueles que exibem sintomatologia característica de estágios finais da doença. Um fato importante é que a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos (LONGSTAFFE et al., 1983).

Devido à variedade de sintomas da doença, o diagnóstico clínico da leishmaniose visceral canina é difícil, sendo que os achados clínicos não são característicos da doença, podendo sugerir diversas outras enfermidades. Dessa forma faz-se necessário a utilização de exames laboratoriais, tais como, sorológicos, parasitológicos, imunoistoquímicos e moleculares para se diagnosticar tal enfermidade (FEITOSA et al., 2000; FEITOSA, 2006). Vale ressaltar que a correlação dos critérios epidemiológicos também contribuem ao diagnóstico (BADARÓ; DUARTE, 1996).

O diagnóstico parasitológico é o método de eleição, fundamentando-se na demonstração das formas amastigotas através da punção aspirativa de linfonodos, medula óssea, baço ou fígado, que são os órgãos mais intensamente parasitados, além dos nódulos cutâneos (KONTOS; KOUTINAS, 1993; FERRER, 1999). Apesar de discordâncias entre alguns autores, o exame parasitológico é considerado, ainda, o “gold standard” para o diagnóstico da doença (DYE et al., 1993; LEONTIDES et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Tal exame tem como vantagem a simplicidade, rapidez e ser pouco traumática (FERRER, 1999), apresentando 100% de especificidade. Segundo Ferrer (1999) este exame possui baixa sensibilidade, em torno de 60%, para amostras de medula óssea, e inferior a 30%, para amostras de linfonodos provavelmente devido a baixa densidade parasitária.

Outro método utilizado para a demonstração do parasita é através do cultivo em meio NNN (Novy, Mc Neal e Nicolle) do material também obtido por punção de baço, fígado, medula óssea e linfonodos. A sensibilidade do cultivo depende de vários fatores, como tipo de meio utilizado e a quantidade de material depositada nos tubos de cultivo (CIARAMELLA et al., 1997).

Dentre as técnicas sorológicas mais atualmente empregadas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* estão o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (SPLAPPENDEL; FERRER, 1998). Em áreas endêmicas, a positividade ao exame sorológico não é suficiente para seu diagnóstico, já que, embora os testes sorológicos apresentem sensibilidade e especificidade adequadas, podem apresentar reações falsos-positivas ou falsos-negativas (MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Animais doentes desenvolvem principalmente uma resposta imune humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania sp.* A soroconversão pode ocorrer em de cerca de 3 meses após a infecção e os títulos podem permanecer elevados por, pelo menos, dois anos. Contudo, os testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado, pois não são 100% sensíveis e falham em detectar cães infectados no período pré-patente e antes da soroconversão, cães que nunca farão a soroconversão e cães soropositivos que se convertem em soronegativos mas ainda apresentam infectados (FERRER et al., 2002, FERRER et al., 1992; 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).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) as técnicas sorológicas recomendadas para o diagnóstico da LV são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação imunoenzimática (ELISA).

A RIFI tem sido a técnica sorológica amplamente utilizada no diagnóstico da LV canina, principalmente em inquéritos soroepidemiológicos (BRASIL, 2006). Possui a desvantagem de que, quando da análise de um grande número de amostras, o tempo dispendido pelo profissional para a leitura das lâminas é muito grande (RACHAMIN et al., 1991). A RIFI têm demonstrado sensibilidade que varia entre 90 e 100% e especificidade entre 80 e 100% (ALVES; BEVILACQUA, 2004; METTLER et al., 2005). Esta reação pode também determinar valores de sensibilidade e de especificidade de 98,4% e 100%, respectivamente (MANCIANTI et al., 1995). Já a especificidade desta prova é prejudicada devido à ocorrência de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanosomatídeos, tais como o agente causador da doença de Chagas. Portanto, seus resultados não devem ser utilizados como indicadores de infecção leishmaniótica específica, particularmente

em áreas onde a doença de Chagas é endêmica (ALVES; BEVILACQUA, 2004; COSTA et al., 1991). Já, com relação à ocorrência de outras enfermidades, tais como erliquiose e babesiose, Vercammen et al. (1997) e Zanette (2006) não observaram resultados positivos (reações cruzadas) quando da realização da RIFI para leishmaniose visceral em cada uma das enfermidades.

O teste de ELISA é também um dos exames amplamente utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É 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 pré-clínicos ou assintomáticos (EL-AMIN et al., 1986). Funciona igualmente bem para o diagnóstico da LV canina (EVANS et al., 1990). Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas totais, lisados ou recombinantes. Dependendo do antígeno empregado, a sensibilidade pode variar entre 95% e 99,5% e a sua especificidade entre 97,1% a 100% (LAURENTI et al., 2005; MANCIANTI et al., 1995; BADARÓ, 1996). Além disso, o tipo de antígeno empregado (espécie ou forma evolutiva do parasita) e possíveis mudanças no protocolo experimental padrão (tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas) podem alterar os resultados referentes a sensibilidade e especificidade deste exame (REINTHINGER et al., 2002). As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, mas também com organismos filogeneticamente distantes (MELO, 2004; RACHAMIN et al., 1991).

Os achados histopatológicos são, por vezes, inespecíficos e caracterizam-se por uma reação inflamatória granulomatosa com presença de células mononucleares, reações estas comuns a várias outras dermatoses. Quando há poucas formas amastigotas de *Leishmania spp* nos tecidos, pode ser difícil estabelecer-se o diagnóstico somente pela histopatologia (FERRER, 1999).

A técnica de imunoistoquímica aumenta a possibilidade do encontro do parasita nos tecidos. Utiliza-se anticorpos específicos para identificar determinado antígeno em estudo. É uma das técnicas que muito auxilia no diagnóstico pois possui alta especificidade e sensibilidade de cerca de 60 a 70%. Além de detectar o material antigênico do protozoário no local da lesão, permite também a

evidenciação das alterações anatomopatológicas que estão ocorrendo e sua correlação com o quadro clínico, ensejando uma avaliação precisa da resposta ao hospedeiro. Segundo Ferrer et al. (1988b) na possibilidade de haver um pequeno número de formas amastigotas no tecido lesado a imunoistoquímica pode muitas vezes auxiliar na detecção destes. Ferrer et al. (1988a) identificaram formas amastigotas do parasita em tecido cutâneo de cães infectados por *Leishmania donovani*, pelo método da imunoperoxidase. Em outro estudo, Ferrer et al. (1990), através do exame histopatológico de nódulo interdigital, não ulcerado, em um cão da raça Boxer, observaram vacúolos contendo corpos basofílicos no interior do citoplasma de macrófagos, e o diagnóstico de leishmaniose foi confirmado pelo método da imunoperoxidase. A técnica de imunoistoquímica aumenta a probabilidade do encontro do parasito, promovendo a corroboração do diagnóstico da doença quando o número destes é baixo nos tecidos avaliados (FERRER et al., 1988b; BOURDOISEAU et al., 1997).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) o diagnóstico sorológico deve ser realizado em todos os cães que residem na área delimitada nos municípios com transmissão confirmada de LV, nos municípios silenciosos receptivos vulneráveis e naqueles municípios em investigação epidemiológica. A RIFI é utilizada nas investigações de foco e para a confirmação das amostras reagentes pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), em inquéritos amostrais ou censitários, sendo que a amostra é considerada reagente (ou positiva) quando forem obtidos títulos iguais ou maiores a 1:40. O ELISA é considerado reagente (ou positivo) quando apresentar densidade óptica maior que o valor do ponto de corte (*cut off*) mais o valor percentual referente ao intervalo preconizado pelo “kit” utilizado.

Para o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2006), o exame de ELISA é utilizado como técnica para triagem das amostras, visando identificar as amostras negativas, em inquéritos sorológicos caninos amostrais e/ou censitários. Os exames não reagentes (negativos) necessitam de confirmação pela RIFI. Dessa forma, é considerado resultado negativo toda a amostra não reagente obtida pelo ELISA; inconclusivo, aquela amostra que se apresentar reagente no teste ELISA e não reagente na RIFI e, resultado final positivo quando a amostra for reagente nos dois testes.

Conforme é preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (PVCLVA) (SÃO PAULO, 2006), os municípios com transmissão de LV em São Paulo são classificados epidemiologicamente em dois grandes grupos: silenciosos, ou seja, sem confirmação de casos humanos e/ou caninos e, com transmissão, isto é, com confirmação de casos humanos e/ou caninos autóctones (Figura 1).

Fonte: (SÃO PAULO, 2006)

Figura 1 - Classificação dos municípios para a vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo

Os municípios silenciosos são classificados, tendo como consideração dois fatores de risco: a receptividade, relacionada com a presença ou não do vetor e a sua vulnerabilidade, relacionada com a possibilidade de circulação de fontes de infecção. O grau de vulnerabilidade de um determinado município dependerá de sua proximidade e/ou importância do fluxo de transporte e/ou migratório com outros municípios com transmissão de LV canina ou humana (SÃO PAULO, 2006)

Dessa forma, os municípios silenciosos são agrupados, preenchendo os seguintes critérios como se segue:

- **municípios silenciosos não receptivos:** sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; sem presença conhecida do vetor; não selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a vulnerabilidade;
- **municípios silenciosos não receptivos vulneráveis:** sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; sem presença conhecida do vetor; selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a sua vulnerabilidade;
- **municípios silenciosos receptivos não vulneráveis:** sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; com presença conhecida do vetor; não selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a sua vulnerabilidade;
- **municípios silenciosos receptivos vulneráveis:** sem confirmação de casos autóctones humanos e caninos; com presença conhecida do vetor; selecionado pelos valores de distância estimados para caracterizar a sua vulnerabilidade;

Os municípios em “investigação” são agrupados também dentre os municípios silenciosos, porém independente da sua receptividade ou vulnerabilidade e com as seguintes notificações: caso humano ou canino clinicamente suspeito, aguardando conclusão de outros itens da investigação epidemiológica ou cão positivo para *Leishmania* sp no exame parasitológico direto ou reagente na sorologia para anticorpos anti-*Leishmania* e aguardando conclusão de outros itens da investigação epidemiológica

Ainda, os municípios que são considerados “com transmissão” de LV são aqueles que englobam os seguintes critérios: caso canino autóctone confirmado por meio de identificação de *L (L.) chagasi* e/ou confirmação de pelo menos 2 ou 3 casos caninos autóctones positivos para *Leishmania* sp na área em investigação e detecção do vetor.

A partir da confirmação de transmissão, os municípios são classificados em: municípios somente com transmissão canina e municípios com transmissão humana.

De acordo com o Boletim Epidemiológico Paulista (CAMARGO-NEVES, 2007), os municípios de São Paulo, foram reclassificados, no mês de março de 2007, segundo a situação epidemiológica para a LV. Dos 645 municípios paulistas, em 55 (8,5%) registrou-se a transmissão da LV. Verificou-se ainda a expansão da doença para outras regiões do Estado, destacando-se a transmissão leishmaniótica a espécimens caninos da LV canina nas regiões de São João da Boa Vista e na

área Metropolitana de São Paulo, sendo que nesta última não foi registrada, até o momento, a presença do vetor. Em maio de 2006 a transmissão, humana e canina, havia sido registrada em 49 municípios.

Face a magnitude de ocorrência da leishmaniose canina no contexto da medicina veterinária e humana, a qual se compila recentes pesquisas que demonstram o alastramento da doença em grandes centros urbanos, julga-se, portanto, oportuna o presente estudo, que tem por objetivo reunir os pontos cardeais relativos à leishmaniose, permitindo não só uma melhor compreensão mas, também, uma visão mais abrangente desta enfermidade. Visa-se, ainda, através de levantamento retrospectivo dos casos de leishmaniose canina, atendidos junto aos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica do Departamento de Clínica Médica e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, no período de 1997 a 2007, caracterizar tal doença no tocante às suas incidências, predisposições, sintomatologias e diagnósticos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são os de:

- caracterizar os aspectos clínicos de animais com diagnóstico estabelecido de leishmaniose visceral atendidos nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos do Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade de São Paulo (USP), no período compreendido entre os anos de 1997 e 2007;
- caracterizar epidemiologicamente os casos de leishmaniose visceral canina atendidos no HOVET/USP enfocando aspectos de alo ou autóctonia;
- avaliar a aplicação da técnica de imunoistoquímica em amostras fixadas de lesões cutâneas biopsiadas de cães com leishmaniose visceral, visando o diagnóstico confirmatório da zoonose, comparando e relacionado-a a outros exames complementares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LEVANTAMENTO DA CASUÍSTICA

Realizou-se estudo retrospectivo decenal da protozoose, entre os meses de março de 1997 e 2007. O levantamento da casuística estribou-se na análise de fichas de registro diário de atendimento clínico-dermatológico de casos novos, atendidos nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos do HOVET da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP, visando o resgate do número de registro de prontuários dos animais acometidos por leishmaniose. Posteriormente, realizou-se levantamento dos dados neles dispostos para obtenção de informações relativas à espécie; definição racial; idade; sexo; peso e dados anamnésticos; dos exames físico geral e dermatológico, visando a caracterização das alterações dermatológicas e/ou sistêmicas de mormente os locais: origem, de criação e de possíveis deslocamentos.

O diagnóstico de leishmaniose houvera sido estabelecido por meio da reação sorológica imunoenzimática (ELISA) e/ou pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), exames estes preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2006). O exame sorológico, no caso, o ELISA, foi realizado em laboratórios de pesquisa (Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina (FM) da USP).

Já a imunofluorescência indireta, foi efetuada no Departamento de Parasitologia do ICB da UFMG.

Daqueles 36 animais em que foram executados exames histopatológicos, realizou-se, a partir do material emblocado em parafina, a técnica de imunoistoquímica no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP.

Além dos exames sorológicos, histopatológicos e imunoistoquímico, em alguns dos cães envolvidos ao estudo houveram sido realizadas o exame parasitológico de material colhido por punção aspirativa de linfonodos e/ou medula óssea.

Coligiram-se, também, de todos os prontuários, os resultados de exames laboratoriais, tais como: hemograma (eritrograma e leucograma), contagem de plaquetas, exame de urina e da avaliação bioquímica (determinação da proteína sérica total, albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT) e das dosagens de uréia e creatinina). Todos os exames laboratoriais coligidos foram executados no Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica do HOVET da FMVZ-USP.

Em função do quadro sintomático (quali e quantitativamente evidenciado) referido ou detectado, os cães foram classificados, conforme Mancianti et al. (1988), em três grupos: assintomáticos (n=1), animais com ausência de sintomatologia clínica e dermatológica; oligossintomáticos (n=18), animais que apresentavam até três manifestações clínicas associadas ou não com alterações tegumentares, porém não específica, a exemplo: apatia, linfadenomegalia e/ou pelame seco, alopecia, escamas, etc e sintomáticos (n=17), animais que apresentavam todas ou mais de três manifestações clínicas características da doença, englobando tanto alterações sistêmicas como tegumentares, tais como: onicogrifose, erosões, úlceras, apatia, prostração, hepato e esplenomegalia, emagrecimento progressivo, dentre outras.

3.2 TÉCNICA DE ELISA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Os testes sorológicos utilizados para caracterizar a positividade dos cães incluídos neste estudo, foram o ELISA e a RIFI. Todos estes conduzidos em laboratórios especializados de instituições de pesquisa. No caso do ELISA, este exame foi realizado em dois distintos laboratórios (Departamento de Parasitologia do ICB da UFMG e Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FM da USP). Já, a RIFI foi realizada unicamente no Departamento de Parasitologia do ICB da UFMG.

O teste de ELISA foi efetuado como descrito por Guimarães et al. (1981), com algumas modificações. Este teste consiste na reação de soros caninos frente a antígenos totais, solúveis ou purificados de promastigotas de *Leishmania sp* obtidos

a partir de cultura *in vitro*, os quais são previamente adsorvidos em poços de placas (Anexo A). Foram considerados positivos ou reagentes aqueles que apresentaram valores maiores que o *cut off* encontrado, através da leitura no espectrofotômetro, considerando-se como sororreagentes aqueles em que evidenciaram valores de densidade óptica iguais ou superiores a três desvios-padrões no ponto de corte do resultado do controle negativo (BRASIL, 2003).

No dois laboratórios em que se realizou o teste de ELISA (Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG e Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FM-USP) o antígeno utilizado foi o lisado de promastigota de *L. (L.) chagasi*.

A RIFI, a qual se baseia na capacidade dos anticorpos se ligarem a corantes sem, entretanto, perderem sua capacidade de reconhecimento do seu antígeno específico, foi realizada unicamente no Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG, sendo preconizada de acordo com Camargo (1974). Houveram sido utilizados, para tal exame, antígenos promastigotas de *L. (L.) chagasi* (Anexo B). Neste exame o ponto de corte preconizado foi de igual a 1:40.

3.3 FRAGMENTOS DE PELE BIOPSIADA

As amostras de tecido cutâneo, com lesões tegumentares características, haviam sido biopsiadas com o auxílio de “punch” com tamanhos variados (dois, quatro e seis milímetros). Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10%. As amostras foram encaminhadas ao laboratório privado de dermatopatologia¹ e, então, submetidas aos procedimentos de rotina histopatológica. Uma vez estabelecido o diagnóstico, presuntivo ou conclusivo, da protozoose, foram, os fragmentos emblocados e processados visando a consecução da técnica de imunoistoquímica.

¹ Laboratório Paulista de Dermatologia – Av. Brigadeiro Luís Antônio, 4315, São Paulo/Capital

3.4 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A partir de amostras de biópsia cutânea preteritamente processadas em aparelho histotécnico e emblocadas em parafina histológica, foram realizados cortes de três micrômetros de espessura que a seguir, foram montados em lâminas de vidro silanizadas. A técnica de imunoistoquímica foi desenvolvida, segundo descrição de Moreira (2003), com algumas modificações, no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da FM-USP (Anexo C).

3.5 EXAME PARASITOLÓGICO DE MATERIAL COLHIDO POR PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA DE LINFONODOS E DE MEDULA ÓSSEA

Amostras de linfonodos (pré-escapular e/ou poplíteo) e de medula óssea foram obtidas, segundo a técnica de punção aspirativa por agulha fina (COWELL; TYLER, 1989). O procedimento de punção aspirativa de linfonodos foi realizado em parte da amostragem (n = 16; 44,4%) , qual seja aquela que apresentava linfadenopatia, com exceção de quatro cães (“Sofia”, “Jully”, “Bolota” e “Tuti”) em que não foi realizado tal exame, mesmo apresentando linfadenopatia (Anexo D). Em alguns dos casos (n= 6; 16,7%), foi executada a punção de medula óssea. Os esfregaços, do material assim colhido, foram estendidos em lâminas, corados pelo corante hematológico (Diff Quick®²) e examinados em microscópio óptico, com objetiva de 100, em imersão. Foi pesquisado e investigado a eventual presença de formas amastigotas livres ou no interior de macrófagos. As leituras foram todas realizadas pelo Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica do HOVET da FMVZ-USP.

² Diff Quick – Baxter Healthcare Corporation, Mc Graw Park, IL, USA

4 RESULTADOS

A amostragem, foi composta por 36 caninos domésticos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, atendidos em interregno de 120 meses, com diagnóstico confirmado através dos exames sorológicos ELISA e/ou RIFI, histopatologia, exame parasitológico e/ou imunoistoquímico.

Dos 36 animais incluídos, 20 (55,5%) eram fêmeas e os 16 (44,5%) remanescentes eram machos (Figura 2).

No que tange à faixa etária, quando do diagnóstico, esta situava-se entre sete a 113 meses, com média de 51,3 meses. Quanto à idade três (8,3%) tinham até 12 meses, 19 (52,8%) animais de 13 e 48 meses, 10 (27,8%) animais de 49 e 96 meses e quatro (11,1%) cães tinham mais de 96 meses (Figura 3).

No tocante à predisposição racial, constatou-se que 12 (33,3%) não apresentavam precisa definição racial. Dentre os 24 (66,7%) cães de raça definida, incluíam-se: cinco animais da raça Poodle (20,8%), cinco Labradores (20,8%), três Boxers (12,5%), dois Chow-Chows (8,3%), dois Dachshunds (8,3%), um Basset Hound (4,2%), um Doberman (4,2%), um Fila Brasileiro (4,2%), um Husky Siberiano (4,2%), um Pit Bull (4,2%), um Staffordshire Bull Terrier (4,2%) e, por fim, um (4,2%) Weimaraner (Figuras 4 e 5).

Figura 2 – Distribuição (%), segundo o sexo, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo - 2007

Figura 3 - Distribuição (%), segundo a faixa etária, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo - 2007

Figura 4 - Distribuição (%), segundo a definição racial, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviço de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007. (CRD = com raça definida; SRD = sem raça definida)

Figura 5 - Distribuição (%) de 24 cães de raça definida acometidos por leishmaniose visceral, atendidos(1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

No atinente ao local (Tabela 1 e Figura 6) de aquisição do cão (provável local de nascimento ou de origem) incluíam-se (municípios brasileiros ou países estrangeiros): Araçatuba (três animais), Bauru (um animal), Belo Horizonte (dois), Campinas (um), Campo Limpo Paulista (um), Cotia (cinco), Embu (quatro), Holambra (um), Ilha Bela (um), Mogi das Cruzes (um), Portugal (um), São Paulo/Capital (11), São Roque (um), Sorocaba (um), Ubatuba (um), Uberaba (um) (Anexo F).

Tabela 1- Caracterização (Nº e %) dos municípios paulistas e mineiros ou do país de nascimento de 36 cães com leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Local	Nº		%
Portugal	1		2,8
São Paulo	32		91,4
Capital	11		34,4
Araçatuba	3		9,4
Bauru	1		3,1
Campinas	1		3,1
Campo Limpo Paulista	1		3,1
Cotia	5		15,6
Embu	4		12,5
Holambra	1		3,1
Ilha Bela	1		3,1
Mogi das Cruzes	1		3,1
São Roque	1		3,1
Sorocaba	1		3,1
Ubatuba	1		3,1
Minas Gerais	3		8,6
Belo Horizonte	2		66,7
Uberaba	1		33,3
Total	36	35	100,0

Fonte: - http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa_menu.html
- BRASIL (2006)

LEGENDA

Capitais, municípios e demais localidades:

- Com transmissão canina e humana
- Com transmissão canina
- Silencioso não receptivo vulnerável
- Silencioso não receptivo não vulnerável
- Em investigação

— Divisas estaduais

— Estradas

Figura 6 - Mapa de Estados ou Municípios brasileiros, segundo a origem, de 35 cães com diagnóstico de leishmaniose visceral atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo - 2007

Quanto aos locais de residência ou de criação (Figura 7) dos cães leishmanióticos quando trazidos para consulta, estes não eram, necessariamente os mesmos de origem (Anexo F). Dentre estes incluíram-se: São Paulo/Capital (19 animais), Embu (quatro), Barueri (um), Belo Horizonte (um), Birigui (um), Carapicuíba (um), Cotia (três), Ilha Bela (um), Mogi das Cruzes (um), Osasco (um), Paraty (um), Registro (um), São Roque (um).

Parte da amostragem (n=24) de animais considerados, haviam sido deslocados à outros municípios ou estados da federação, por breves (menos de sete dias) ou longos períodos (semanas ou meses), preteritamente às manifestações dos sintomas da doença. Os municípios ou estados referidos foram: Araçatuba, Belo Horizonte (Minas Gerais), Birigui, Caraguatatuba, Embu e Embu-Guaçu, Eldorado, Florianópolis (Santa Catarina), Cotia, Guarujá, Ilha Bela, Itapeverica da Serra, Maranhão, Paraná, Paraty (Rio de Janeiro), Peruíbe, Presidente Prudente, São Lourenço (Minas Gerais), São Roque, Umuarama (Paraná), São Paulo/Capital. Dos 36 animais da amostragem 12 (33,3%) não apresentavam histórico de deslocamentos ou viagens (Figura 8 e Anexo F)

Fonte: - http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa_menu.html
- BRASIL (2006)

LEGENDA

Capitais, municípios e demais localidades:

- Com transmissão canina e humana
- Com transmissão canina
- Silencioso não receptivo vulnerável
- Silencioso não receptivo não vulnerável
- Em investigação
- Divisas estaduais
- Estradas

Figura 7 - Mapa de Estados ou Municípios brasileiros, segundo a residência de 36 cães, com leishmaniose visceral quando do primo atendimento, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP. São Paulo - 2007

Fonte: - http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa_menu.html
- BRASIL (2006)

LEGENDA

Capitais, municípios e demais localidades:

- Com transmissão canina e humana
- Com transmissão canina
- Silencioso não receptivo vulnerável
- Silencioso não receptivo não vulnerável
- Em investigação

— Divisas estaduais

— Estradas

* Obs.: Houve deslocamento, de um dos animais em estudo, para o Maranhão.

Fig 8 - Mapa relativo a Estados (n=5) ou Municípios brasileiros de deslocamento referido de 23 cães com leishmaniose visceral quando do primo atendimento, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Segundo a classificação do quadro sintomatológico (sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos) observou-se que 17 (47,2%) cães eram sintomáticos, 18 (50%) oligossintomáticos e, somente, um (2,8%) assintomático (Figura 9).

Do ponto de vista do quadro mórbido observou-se que 27 (75,0%) dos cães apresentavam tanto alterações sistêmicas como tegumentares, oito (22,2%) estavam acometidos tão somente por lesões cutâneas e, apenas, um (2,8%) não apresentava quaisquer alterações dermatopática ou sistêmica (Anexo E).

Figura 9 – Distribuição (%), segundo a classificação sintomatológica, de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Dentre as lesões tegumentares ou fanéricas (Apêndice A) evidenciadas (Anexo E e Figura 10), dos 35 cães sintomáticos e/ou oligossintomáticos, a franca rarefação pilosa e/ou alopecia foram aquelas mais frequentemente observadas (45,7% dos casos). Evidenciou-se, ainda, descamação fúrfuro-micácea, por vezes de aspecto argêntico, (40,0%), seguidos pela presença de ulcerações (37,1%), crostas melicéricas e/ou hemorrágicas (34,3%) e eritema (28,6%). As demais lesões caracterizaram-se como hiperqueratose e/ou lignificação (22,8%), hipopigmentação

tegumentar ou fanérica (14,3%), onicogrifose (11,4%), edema (11,4%), hiperpigmentação (8,6%), pápulas (5,7%), nódulos (5,7%) e, por fim, fissura (2,8%).

Figura 10 – Distribuição (%) das alterações cutâneas ou fanéricas de 35 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Ainda, do ponto de vista sintomatológico, dos 36 cães avaliados, apenas 13 (36%) apresentavam prurido segundo os proprietários (Anexo E e Figura 11).

Figura 11 - Distribuição (%), segundo a presença de prurido corpóreo, de 35 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo - 2007

Considerando-se a distribuição topográfica de assentamento lesional, pôde-se verificar, em ordem decrescente de ocorrência, que as regiões cefálica, de articulações úmero-rádio-ulnares, toda extensão dos membros pélvicos e torácicos (incluindo patas e coxins) e região abdominal ventral foram aquelas mais acometidas, sendo que, na região cefálica, também em ordem decrescente, os locais mais comprometidos foram o espelho nasal (34,3%), os pavilhões auriculares (31,4%) e as regiões periocular (22,8%) e perilabial (17,1%) (Anexo E e Figura 12).

Figura 12 - Distribuição (%), segundo topografia de assestamento lesional, de 35 cães acometidos por leishmaniose visceral atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e Clínica de Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

O acometimento sistêmico foi visto em 27 (75%) cães do total da amostragem. Dentre este foi observado linfadenomegalia (74,0%), pirexia (44,4%), disorexia (40,7%), emagrecimento e hepatomegalia (ambos 29,7% dos animais), esplenomegalia e prostração (em 25,6% dos casos, cada um), claudicação (22,2%), gastroenterite e corrimento ocular (18,5% em ambos os casos), dispnéia (11,1%), aumento de volume das articulações de membros torácicos e pélvicos, corrimento nasal, ceratite e/ou uveíte e tosse seca (7,4%) cada e, por fim, um relato de convulsão, esternutação, estertoração pulmonar, astenia de membros pélvicos, lombalgia, mucosas hipocoradas, poliúria e polidipsia (3,7%) cada (Anexo E e Figura 13).

Figura 13 – Distribuição (%), segundo alterações sistêmicas, de 27 cães acometidos por leishmaniose visceral atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo - 2007

Dos 36 animais da amostragem (Figura 14), seis (16,6%) apresentavam outras enfermidades quicá decorrentes ou associadas à leishmaniose visceral, sendo que destes, três (50,0%) animais (“Suzy”, “Bolota” e “Scooby”) apresentaram sarna demodécica, dois (33,3%) urolitíase (“Mike” e “Espirro”), com alterações condizentes aos exames de ultrassonografia, e de urina e, finalmente, um cão (“Shiva”) com erliquiose (16,7%), o qual foi diagnosticado pela identificação microscópica direta, em leucócitos de esfregaços sanguíneos, a presença de mórulas de *Ehrlichia sp.* Estes diagnósticos foram estabelecidos no decorrer do seguimento clínico-dermatológico, a contar do primo atendimento. Dois cães (“Yanca” e “Espirro”) apresentavam, respectivamente, antecedentes mórbidos

quadro de broncopneumonia e pielonefrite respectivamente, diagnosticado cerca de seis e 13 meses antes do primeiro atendimento no Serviço de Dermatologia. Nenhum animal apresentava antecedentes recentes, ou seja, há menos de três meses, a contar do primeiro atendimento, de utilização de medicação sistêmica e/ou tópica.

Figura 14 – Distribuição (%) das enfermidades sistêmicas e/ou tegumentares associadas ao quadro de leishmaniose visceral de seis cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Correlacionando-se a enfermidade aos achados laboratoriais (Figuras 15 e 16), constatou-se que 13 animais (36,1%) não apresentaram alterações hematológicas e/ou bioquímicas séricas e/ou urinárias. Em 23 (63,9%) deles verificaram-se alterações, tais como: hiperproteïnemia (56,5%), hipoalbuminemia (52,1%), anemia (34,8%), trombocitopenia (34,8%), hiperfosfatase alcalina (17,4%), proteinúria (8,7%), cristalúria (8,7%) e, por fim, em 4,3% dos casos foi observado aumento de atividade sérica da alanina aminotransferase, leucocitose e linfopenia absolutas (Anexo E).

Figura 15 - Distribuição (%), dos achados laboratoriais de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP – São Paulo - 2007

Figura 16 – Distribuição (%) dos achados laboratoriais detectados em 23 cães acometidos por leishmaniose, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo - 2007

Dispõem-se na Figura 17 os exames complementares realizados considerados como “golden standard” para fins de diagnóstico da protozoose.

Figura 17 - Distribuição (%) dos exames complementares realizados (ELISA, RIFI, imunoistoquímica, parasitológico de linfonodo e de medula óssea) de 36 cães acometidos por leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Entre estes 36 animais leishmanióticos, 35 (97,2%) haviam sido submetidos ao exame pelo método ELISA. Evidenciaram-se 34 (97,1%) como positivos e um (2,9%) negativo (Tabela 2). Quanto aos resultados pela RIFI, 18 (85,7%) foram positivos, três (14,3%) resultaram em “não reagente” e nos demais 15 cães não efetuou-se tal exame (Tabela 3).

Tabela 2 - Resultados de sorologia (Nº e %) empregada, para diagnóstico de leishmaniose visceral pelo método e ELISA de 35 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007

ELISA	Nº	%
Positivo	34	97,1
Negativo	1	2,9
Total	35	100,0

Tabela 3 – Resultados de sorologia (Nº e %) empregada para diagnóstico de leishmaniose visceral pela RIFI, de 21 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo – 2007

RIFI	Nº	%
Positivo	18	85,7
Negativo	3	14,3
Total	21	100,0

Dos 36 cães em estudos 13 (36,1%) haviam sido submetidos à biópsia tegumentar para exame histopatológico. Destes, 12 (92,3%) fragmentos emblocados foram encaminhados para execução da técnica de imunoistoquímica.

No que se refere aos resultados dos exames histopatológicos, observou-se que em quatro (30,8%) animais (“Sofia”, “Kety”, “Judy” e “Theodoro”) evidenciou-se, na pele, realmente o agente parasitário, sob formas amastigotas; em três (23,0%) cães (“Mike”, “Boris” e “Bacco”) foi considerado como quadro histológico “sugestivo” de leishmaniose e nos demais seis (46,1%) constatou-se desde quadro de “dermatite ulcerativa sem caráter específico” (“Toddy”, “Melvin” e “Buck”) até quadros bastante distintos, como lúpus eritematoso discóide (“Lucky”), piogranuloma estéril idiopático (“Breik”) e hemangioma ulcerado (“Lara”).

Os resultados da técnica de imunoistoquímica representaram positividade, ou seja, imunomarcção, em sete (58,3%) das amostras, sendo que em cinco (41,7%) houve negatividade do exame (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados (Nº e %) da técnica de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral, de 12 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo - 2007

Imunoistoquímica	Nº	%
Positivo	7	58,3
Negativo	5	41,7
Total	12	100,0

Dos 36 cães enfermos, em 16 (44,4%) colheu-se material por biópsia aspirativa de linfonodos, para exame parasitológico. Dentre estes houve positividade em seis (37,5%) e negatividade em 10 (62,5%) cães (Tabela 5). Em relação à punção aspirativa de medula óssea, dos seis (16,7%) animais em que foi colhido o material observou-se positividade em quatro (66,7%) (Tabela 6).

Tabela 5 – Resultados (Nº e %) do exame parasitológico, em material provindo de punção aspirativa de linfonodos para diagnóstico de leishmaniose visceral, de 16 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo - 2007

Parasitológico de linfonodo	Nº	%
Positivo	6	37,5
Negativo	10	62,5
Total	16	100,0

Tabela 6 - Resultados (Nº e %) do exame parasitológico, em material provindo de punção aspirativa de medula óssea, para diagnóstico de leishmaniose visceral, de seis cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo - 2007

Parasitológico de medula óssea	Nº	%
Positivo	4	66,7
Negativo	2	33,3
Total	6	100,0

Os resultados dos exames subsidiários executados bem como a correlação destes dados com o agrupamento relativo ao quadro sintomatológico (assintomático, oligo e sintomático) estão dispostos nas tabelas 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

Tabela 7 - Distribuição de freqüência (Nº e %) de resultados obtidos pelo teste de ELISA de 35 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (assintomático, oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007

ELISA		Assintomático	Oligossintomático	Sintomático	Total
Positivo	Nº	1	17	16	34
	%	100,0	94,4	100,0	97,1
Negativo	Nº	...	1	...	1
	%		5,6		2,9
Total	Nº	1	18	16	35
	%	100,0	100,0	100,0	100,0

... – dado inexistente

Daqueles animais em que houvera sido realizado a sorologia pelo método de ELISA (Tabela 7), verificou-se que dentre os assintomáticos somente um cão era soropositivo. Entre os oligossintomáticos evidenciou-se positividade em 17 (94,4%) animais e no grupo dos sintomáticos a totalidade dos 16 animais mostrou-se soropositivo.

Tabela 8 - Distribuição de frequência (Nº e %) de resultados obtidos pelo teste de RIFI de 21 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (assintomático, oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP- São Paulo - 2007

RIFI		Assintomático	Oligossintomático	Sintomático	Total
Positivo	Nº	1	6	11	18
	%	100,0	66,7	100,0	85,7
Negativo	Nº	...	3	...	3
	%		33,3		14,3
Total	Nº	1	9	11	21
	%	100,0	100,0	100,0	100,0

... – dado inexistente

Pela RIFI, o grupo sintomático apresentou percentual maior de soropositivos comparado àqueles do grupo oligossintomático. Houve soronegatividade (33,3%) à RIFI somente dentre os animais oligossintomáticos (Tabela 8).

Tabela 9 - Distribuição de frequência (Nº e %) de resultados obtidos pelo método de imunoistoquímica de 12 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo - 2007

Imunoistoquímica		Oligossintomático	Sintomático	Total
Positivo	Nº	2	5	7
	%	33,3	83,3	58,3
Negativo	Nº	4	1	5
	%	66,7	16,7	41,7
Total	Nº	6	6	12
	%	100,0	100,0	100,0

... – dado inexistente

Dos doze materiais emblocados submetidos à técnica de imunoistoquímica, pode-se observar pela análise da Tabela 9 que os grupos sintomático e oligossintomático apresentaram um percentil maior de positividade, sendo mais acentuado no grupo dos sintomáticos.

Tabela 10 - Distribuição de frequência (Nº e %) de resultados obtidos pelo exame parasitológico provindo de aspiração de linfonodos de 16 casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (oligossintomático e sintomático), de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo - 2007

Parasitológico de linfonodo		Oligossintomático	Sintomático	Total
Positivo	Nº	2	4	6
	%	28,6	44,4	37,5
Negativo	Nº	5	5	10
	%	71,4	55,6	62,5
Total	Nº	7	9	16
	%	100,0	100,0	100,0

... – dado inexistente

Os resultados do exame parasitológico executado a partir de material colhido, por punção aspirativa de linfonodos, permitiram evidenciar um maior percentil de negatividade em ambos os grupos (oligo e sintomáticos) e principalmente (71,4%) dentre os oligossintomáticos (Tabela 10).

Tabela 11 - Distribuição de frequência (Nº e %) de resultados obtidos pelo exame parasitológico de material provindo de aspiração de medula óssea de seis casos de leishmaniose visceral, segundo o agrupamento clínico (oligossintomático e sintomático), de cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007

Parasitológico de medula óssea		Oligossintomático	Sintomático	Total
Positivo	Nº	1	3	4
	%	33,3	100,0	66,7
Negativo	Nº	2	...	2
	%	66,7		33,3
Total	Nº	3	3	6
	%	100,0	100,0	100,0

... – dado inexistente

A despeito da baixa magnitude numérica de exames parasitológicos de medula óssea realizados, provindo de colheita de cães oligo e sintomáticos, pode-se, pela análise da Tabela 11 observar que houve a evidenciação de formas amastigotas de *Leishmania sp* de todos os cães do grupo dos sintomáticos submetidos à colheita.

Tabela 12 - Resultados (%) dos exames complementares segundo o quadro sintomológico de cães com leishmaniose visceral (n=36) atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo (2007)

Método Grupo	ELISA (N=35)		RIFI (N=21)		IQ (N=12)		Parasitológico			
							LN (N=16)		MO (N=6)	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Assintomático	100,0	...	100,0	...	...	...	...	...	...	...
Oligossintomático	94,4	5,6	66,7	33,3	33,3	66,7	28,6	71,4	33,3	66,7
Sintomático	100,0	...	100,0	...	83,3	16,7	44,4	55,6	100,0	...

IQ – imunoistoquímica; LN – linfonodos; MO – medula óssea; N – número; Pos = positivo; Neg – negativo; (...) – dado inexistente

A comparação dos resultados entre os testes sorológicos:, ELISA versus RIFI; entre testes sorológicos e a técnica de imunoistoquímica (ELISA versus imunoistoquímica, RIFI versus imunoistoquímica e ELISA versus RIFI versus imunoistoquímica) estão representadas pelas tabelas 13, 14, 15, 16 e figuras 18, 19, 20 e 21.

Tabela 13 - Resultados (Nº e %) de sorologia (ELISA e RIFI) de 20 animais para diagnóstico de leishmaniose visceral em amostras de soro de cães atendidos (1997- 2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007

	ELISA	RIFI
Positivo	19 (95,0%)	17 (85,0%)
Negativo	1 (5,0%)	3 (15,0%)
Total de animais	20 (100,0%)	20 (100,0%)

Figura 18 –Resultados (%) de sorologia (ELISA e RIFI) para diagnóstico de leishmaniose visceral em amostras de soro de 20 cães atendidos (1997- 2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007

Tabela 14 - Resultados (Nº e %) de sorologia (ELISA) e de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em 12 amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007

	ELISA	Imunoistoquímica
Positivo	11 (91,7%)	7 (58,3%)
Negativo	1 (8,3%)	5 (41,7%)
Total de animais	12 (100,0%)	12 (100,0%)

Figura 19 – Resultados (%) de sorologia (ELISA) e imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em 12 amostras de soro e biópsia de pele 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007

Tabela 15 – Resultados (Nº e %) de sorologia (RIFI) e imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP - São Paulo – 2007

	RIFI	Imunoistoquímica
Positivo	8 (100,0%)	3 (37,5%)
Negativo	...	5 (62,5%)
Total de animais	8 (100,0%)	8 (100,0%)

Figura 20 - Resultados (%) de sorologia (RIFI) e imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ-USP - São Paulo – 2007

Tabela 16 – Resultados (Nº e %) de sorologia (ELISA e RIFI) e de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP – São Paulo – 2007

	Elisa	RIFI	Imunoistoquímica
Positivo	7 (87,5%)	8 (100,0%)	3 (37,5%)
Negativo	1 (12,5%)	...	5 (62,5%)
Total de animais	8 (100,0%)	8 (100,0%)	8 (100,0%)

... = dado inexistente

Figura 21 - Resultados (%) de sorologia (ELISA e RIFI) e de imunoistoquímica para diagnóstico de leishmaniose visceral em oito amostras de soro e biópsias de pele de 36 cães atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ- USP – São Paulo – 2007

5 DISCUSSÃO

O presente estudo embasou-se em levantamento retrospectivo de casos de leishmaniose visceral canina diagnosticados em dez anos de atendimento nos Serviços de Dermatologia e Clínica Médica de cães e gatos do HOVET/USP. A amostragem compôs-se de 36 casos caninos, naturalmente infectados e/ou enfermos, por *Leishmania sp.*

O diagnóstico houvera sido estabelecido pela caracterização propiciada pelos dados anamnésticos, de exames físico e dermatológico, complementados por hematimetria, bioquímica sérica, exames imagéticos, afora sorologia (ELISA e/ou RIFI), histopatologia de pele biopsiada e/ou pela evidenciação do protozoário em exames parasitológicos de material provindo de biópsia aspirativa de linfonodos e/ou medula óssea, estribados, também, em imunoistoquímica de fragmento de pele emblocados em parafina.

No que tange a um maior acometimento de machos ou fêmeas não foi constatada aparente predisposição sexual, o que confirma os relatos pretéritos dispostos na bibliografia (FERRER, 1992; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Com relação à predisposição etária, a faixa de idade que concentrou a maioria dos casos (52,8%) foi aquela dos 13 a 48 meses de vida, qual seja, de adultos jovens. Contrariamente aos dados compilados da bibliografia especializada (FERRER, 1992; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000) houve evidente predisposição por uma determinada faixa etária.

A despeito da afirmativa de outros autores (FERRER, 1992; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000) de inexistir nítida predisposição racial quanto ao acometimento da protozoose, por haver, na dependência da região (país, estado, município) consideráveis variações relativas à população de cães de raça definida ou indefinida, raças de *per se*, algumas hereditariamente resistentes, evidenciou-se, no presente levantamento, uma maior ocorrência dentre aqueles cães de raças definidas, mormente “Poodles” e “Labradores”. Inegavelmente pelos dados de registros de casos atendidos no Serviço de Dermatologia ambas as raças incluem-se

dentre aquelas mais atendidas¹.

Corroborando dados compulsados da bibliografia especializada (CIARAMELLA et al. 1997) pôde-se verificar que cerca de dois terços (66%) da casuística compreendia animais de grande porte, quais sejam aqueles criados no exterior das propriedades em função de sua aptidão como animais de guarda ou trabalho.

A análise da situação epidemiológica permitiu classificar os locais (municípios, estados ou regiões) em que os animais se encontravam (de origem, de residência ou de deslocamentos) em “vulneráveis”, com transmissão canina e/ou humana e em “investigação”.

Caracterizando os animais, de acordo com o local aonde foram adquiridos ou de onde provieram, constatou-se que seis (16,67%) deles provinham de localidades descritas como “de transmissão canina e humana”, ou seja, três cães (“Bob”, “Teka” e “Scooby”) provinham de Araçatuba (São Paulo), dois (“Julia” e “Theodoro”) de Belo Horizonte (Minas Gerais) e um (“Brenda2”) de Bauru (São Paulo); nove outros cães, sendo cinco (“Buck”, “Giga”, “Branca”, “Yanca” e “Spock”) (13,9%) do município de Cotia e quatro (11,1%) de Embu (“Jacó”, “Tucha”, “Espirro” e “Tuti”) eram provenientes de municípios paulistas cuja caracterização epidemiológica é “de foco com transmissão canina”. Os demais 21 cães procediam de municípios paulistas considerados como silenciosos não receptíveis vulneráveis ou não vulneráveis ou em investigação (Anexo F). Vale ressaltar, ainda, que um dos cães (“Breik”) era proveniente de outro país, no caso, Portugal, país este em que a leishmaniose canina é considerada endêmica (WHO, 1990).

Quando da primeira consulta, tais animais residiam em locais que não necessariamente eram os mesmos de origem, sendo que um cão (“Theodoro”) residia em Belo Horizonte (Minas Gerais) e outro (“Teka”) m Birigui (São Paulo), respectivamente, municípios estes descritos como “de transmissão canina e humana”. Sete cães eram provenientes de municípios “de transmissão canina”, no caso Embu (“Scooby”, “Jacó”, “Espirro” e “Tuti”) e Cotia (“Bacco”, “Branca” e “Spock”) e os demais animais residiam em sua maior parte em São Paulo/Capital e outros municípios descritos como região “em investigação” e “silenciosa”.

¹ IKEDA, M.O. (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET-USP, 1995-2007) – Informação pessoal

Também, os animais (66,6%) ora considerados, deslocaram-se a outros estados, cidades e/ou municípios, antes do estabelecimento do diagnóstico da doença. Os deslocamentos variaram quanto ao número e os locais de destino. Os municípios paulistas (Araçatuba, Birigui, Caraguatatuba, Cotia, Embu e Embu-Guaçu, Eldorado, Guarujá, Ilha Bela, Itapeçerica da Serra, Peruíbe, Presidente Prudente e São Roque), paranaense (Umuarama), carioca (Paraty), mineira (São Lourenço e Uberaba), as capitais brasileiras (Belo Horizonte, Florianópolis e São Paulo) e o estado do Maranhão foram alguns dos locais de destino, sendo que, alguns desses são considerados como de “transmissão canina e/ou humana” de Calazar (Araçatuba, Birigui, Belo Horizonte, Cotia, Embu, Maranhão, Presidente Prudente).

Diante dos dados coligidos permite-se pressupor que a leishmaniose pode ter sido adquirida, principalmente, dos locais (municípios ou estados) onde há focos descritos da doença, bem como da presença do vetor.

Pela disposição cartogramática exposta nos resultados deste trabalho caracterizam-se os deslocamentos a municípios ou estados que circundam ou fazem fronteira com o Estado de São Paulo, excetuando apenas um cão (“Kety”) que se deslocou do estado do Maranhão. Esta dispersão pode propiciar elementos que justificam a disseminação da zoonose em locais considerados como alóctones, ao menos em passado recente.

Vale lembrar que em municípios ou cidades, tais como, Ilha Bela, Ubatuba, Caraguatatuba, Paraty, Umuarama, são locais de casos notificados especialmente de leishmaniose tegumentar, sendo que alguns caninos da amostragem, foram adquiridos em um desses municípios (“Bacco”, de Ubatuba e “Judy” de Ilha Bela). Quando relacionado ao local de criação observou-se que somente dois cães (“Judy” e “Toddy”) residiam em Ilha Bela e Paraty, municípios em que a leishmaniose tegumentar é vastamente reconhecida. Quanto ao local onde os animais foram deslocados a maioria se deslocou tanto de áreas com foco de transmissão canina de leishmaniose visceral, como também de regiões onde a leishmaniose tegumentar era presente, não obtendo no presente estudo uma particular caracterização do local de infecção, uma vez que todos os cães deslocados haviam transitado por alguma dessas áreas.

Em função da detalhada anamnese executada em que, por muitas vezes, com a singela indagação da origem ou de eventuais deslocamentos do animal, pôde-se aventar uma possível infecção ou pressupor a vigência da enfermidade, com sintomas vagos e pouco característicos. As demais alterações tegumentares, viscerais, bioquímicas, imagéticas evidenciadas permitiram o agrupamento dos cães acometidos na tradicional (MANCIANTI et al., 1988), embora discutível na óptica de alguns investigadores/pesquisadores (FEITOSA, 2007 – informação verbal)² como assintomáticos (2,8%), oligossintomáticos (50,0%) e sintomáticos (47,2%).

Com relação ao cortejo mórbido, constatou-se que 75,0% dos animais em estudo apresentavam tanto alterações dermatológicas como sistêmicas, destes, mais da metade (62,9%) eram sintomáticos e os demais (37,0%) oligossintomáticos. Dentre os cães acometidos somente por lesões cutâneas (22,2%) todos apresentavam-se como oligossintomáticos. Somente um cão (“Bob”) era totalmente assintomático, não apresentando alterações quer sistêmicas como dermatopáticas (Anexo E). Segundo Splappendel e Ferrer (1998) as alterações cutâneas são bem freqüentes em cães com leishmaniose e, podem ser tanto localizadas como disseminadas, ocorrendo, na dependência do estado imunitário ou de vigência de outras enfermidades.

As alterações do sistema tegumentar constituíram-se em ampla variedade de manifestações tais como: rarefação pilosa e/ou alopecia, escamas (fúrfuro-micáceas, argênticas), crostas, úlceras, eritema, hiperqueratose e/ou lignificação, onicogrifose, edema, pápulas ou nódulos, hipo ou hiperpigmentação e fissuras. As manifestações evidenciadas, corroboraram aquelas descritas de há muito na bibliografia (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; SPLAPPENDEL; FERRER, 1998; FERRER, 1999; NOLI, 1999.; FEITOSA et al., 2000).

É comum, tal como apresentado por 16 cães (45,7%), a observação de áreas de rarefação pilosa e/ou alopecia, associadas ou não à ocorrência de erosões ou ulcerações (SLAPPENDEL, 1988; FEITOSA et al., 2000). Este acometimento pode ser explicado pela ação direta da *Leishmania* sobre o folículo piloso ou por um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, decorrente de graves alterações

² Informação fornecida por FEITOSA, M.M – FO/UNESP (2007)

hepáticas, ou ainda por deposição de imunocomplexos na membrana basal do tecido tegumentar. Em locais correspondentes aos calos de apoio é habitual a evidencição de áreas de hiperqueratose e lignificação evoluindo para fissuras ou ulcerações. Estas alterações podem estar relacionadas a uma ação direta do parasita ou à vasculite necrotizante decorrente da deposição de imunocomplexos (CIARAMELLA et al., 1997).

No atinente à topografia das lesões, notou-se que a região cefálica (espelho nasal, regiões periocular e labial e de pavilhões auriculares) foi a mais acometida seguida por aquela dos membros (pélvicos e torácicos) e da abdominal (ventral). A predileção pelo assestamento lesional cefálico reflete os hábitos fastidiosos dos flebotomíneos que habitualmente fazem seu repasto sanguíneo neste segmento corpóreo, atraídos que são pelo gás carbônico expelido pela expiração.

Quando se consideram as alterações tegumentares há que se diferenciar as lesões localizadas daquelas generalizadas. As primeiras caracterizam a “leishmaniose cutânea localizada” correspondendo ao ponto de inoculação do agente pela picada do díptero. Tais lesões nódulo-eritematosas ou erodo-ulcerativas, assimétricas (cancro de inoculação ou leishmanioma) não foram evidenciadas em boa parte da casuística considerada, afora nos cães “Sofia” e “Boris”.

Uma vez vencida a fase inicial ou de estrita localização topográfica produz-se a disseminação visceral generalizada. Tal quadro acomete entre 40 e 70% dos cães enfermos (CIARAMELLA et al., 1997; VILAGRAN, 1997; BLAVIER et al., 2001) caracterizando-se por ser apruriginoso, tal como manifestado por 64% da casuística considerada. As lesões tegumentares ou fanéricas presentes em 97% destes casos coincidem, tanto em termos de magnitude de percentual como de tipos e topografia lesional, com o referido na bibliografia compulsada (CIARAMELLA et al., 1997; VILAGRAN, 1997; BLAVIER et al., 2001; GROSS et al., 2005; BANETH, 2006).

Uma pequena percentagem (16,6%) dos animais (“Suzy”, “Bolota”, “Scooby”, “Mike”, “Espirro”, “Shiva”) apresentava outras enfermidades associadas ao quadro de leishmaniose visceral, quais sejam: demodicidose (“Suzy”, “Bolota” e “Scooby”) (50,0%), urolitíase vesical (33,3% dos casos, quais sejam: “Mike” e “Espirro”) e erliquiose (“Shiva”) em 16,6% dos casos. Com exceção ao quadro vesical, isto

confirma a possibilidade de ocorrência de outras infecções e infestações eventualmente associadas ao quadro de leishmaniose (CIARAMELLA et al., 1997).

Tanto a sarna demodécica como a erliquiose podem preceder ou suceder a leishmaniose. Ambas podem, também, agravar ou serem agravadas pela imunossupressão que habitualmente provém da presença de linfócitos T (supressores ou auxiliares) e da ação de algumas das linfocinas, na vigência do quadro protozoótico.

Dentre os 27 (75%) cães que apresentavam acometimento sistêmico, a alteração mais evidenciada foi a linfadenomegalia seguida, em ordem decrescente, por pirexia, disorexia, emagrecimento, hepato e esplenomegalia, prostração e claudicação. Outras manifestações clínicas, detectadas em menor número foram: gastroenterite, corrimento óculo-nasal, aumento de volume de articulações, ceratite e/ou uveíte, tosse seca, convulsão, esternutação, estertores pulmonar, astenia de membros, lombalgia, mucosas hipocoradas e poliúria/polidipsia.

A linfadenomegalia, evidenciada em cerca de 74% destes casos, é uma das manifestações mais freqüentes tanto em animais oligossintomáticos como nos sintomáticos. Envolve o sistema linfóide com comprometimento dos linfonodos (KONTOS et al., 1993) e, muitas vezes, também, do baço acarretando o clássico quadro de esplenomegalia. Achado de magnitude semelhante foi relatado por FEITOSA et al., 2000, que enfocaram o habitual comprometimento deste órgão, ao estudar os aspectos clínicos de leishmaniose canina, no município de Araçatuba (São Paulo).

A esplenomegalia não foi um achado clínico comum neste estudo (19,4%). Muitas vezes esta apresentação pode ser pré-clínica necessitando de exames de imagem, tais como os radiográfico e ultrassonográfico, para sua detecção. Contudo, a evidência de esplenomegalia relativamente alta já foi reportada por Slappendel (1988) e Ciaramella et al. (1997).

A pirexia, evidenciada em 44,4% destes cães ("Sofia", "Toddy", "Mike", "Breik", "Scooby", "Julia", "Shiva", "Brenda2", "Bolota", "Espirro", "Tuti" e "Trovão") é achado clínico de comum, com valores de temperatura variando entre 40,5°C e 41°C (FEITOSA et al., 2000). A perda de peso, evidenciada em 29,7% dos cães ("Brenda1", "Shiva", "Brenda2", "Tucha", "Giga", "Theodoro", "Espirro" e "Trovão")

está frequentemente associada ao envolvimento visceral, podendo ocorrer mesmo em cães normoréticos (FEITOSA et al., 2000). Nestes cães, houve envolvimento do sistema hepático e/ou intestinal em oito animais.

Há controvérsias sobre a ocorrência de lesão hepática em cães com leishmaniose visceral; alguns autores relatam que o envolvimento hepático ocorre apenas em uma pequena porcentagem de cães (FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997), outros reportam-na como sendo bem mais comum (KONTOS; KOUTINAS, 1993). Sabe-se que os parasitas se multiplicam nos macrófagos hepáticos. Há evolução para hepatite ativa crônica, que se manifesta, clinicamente, por êmese, poliúria, polidipsia, anorexia e emagrecimento, podendo-se, muitas vezes evidenciar flagrante hepatomegalia, tal como o observado em 29,7% desta casuística (“Sofia”, “Mike”, “Brenda1”, “Shiva”, “Lupi”, “Brenda2”, “Bolota” e “Trovão”) (FERRER, 1992; KONTOS; KOUTINAS, 1993; NOLI, 1999).

Os quadros de diarreia crônica são devidos à presença de ulcerações nas mucosas gástrica e/ou intestinal, resultando em fezes aquosas acompanhadas de hematoquezia ou melena, associados ou não a êmese (CIARAMELLA et al., 2003). Na amostragem em estudo, foi observado quadro gastro-entérico em 18,5% dos cães (“Sofia”, “Brenda1”, “Shiva”, “Tucha”, “Brenda2”).

Dentre os sintomas neurológicos em casos de cães com leishmaniose visceral destacam-se os episódios convulsivos, tal como evidenciado no cão “Kety”, alterações em pares de nervos cranianos, alterações em região vestibular e cerebelar, estas manifestações neuropáticas podem ser decorrentes à deposição de imunocomplexos ou de vigência de infecções oportunistas sediadas no sistema nervoso central (FEITOSA et al., 2005; LIMA, 2003).

Foram, ainda, detectadas importantes alterações, pelos resultados dos exames laboratoriais, em cerca de 63,8% dos cães considerados. Destas, a hiperproteinemia (56,5%) observada nos cães “Kety”, “Toddy”, “Breik”, “Scooby”, “Julia”, “Brenda1”, “Lupi”, “Jacó”, “Melvin”, “Buck”, “Branca”, “Spock” e “Trovão” e a hipoalbuminemia (52,1%) nos cães “Toddy”, “Scooby”, “Julia”, “Brenda1”, “Lupi”, “Jacó”, “Brenda2”, “Melvin”, “Buck”, “Branca”, “Spock” e “Trovão” foi o achado mais freqüente. Tal alteração do perfil protéico é referida em trabalhos de autores estrangeiros (BANETH, 2006) em percentis que oscilam entre 60 e 68%, no que tange à hiperproteinemia. Na leishmaniose visceral canina apesar dos níveis de

proteínas totais estarem aumentados, ocorre uma disproteinemia. Na eletroforese de proteínas séricas observa-se uma inversão e diminuição da relação albumina/globulina, em função do aumento da fração gama, o que caracteriza uma hipergamaglobulinemia, com diminuição da albumina em número representativo de casos (KEENAN et al., 1984; GENARO, 1993; CIARAMELLA; CORONA, 2003).

Destaque-se que níveis globulinêmicos elevados, em cães, de regiões endêmicas ou que tenham sido deslocados para tais locais, sem um claro fator causal, deve incitar a investigação soro e parasitológica (BANETH, 2006).

Outros achados laboratoriais referiam-se aos exames hematológicos alterados. A anemia, caracterizada como normocítica normocrômica, estava presente em 34,8% dos casos atendidos (“Sofia”, “Shiva”, “Jacó”, “Melvin”, “Giga”, “Espirro”, “Spock” e “Trovão”), juntamente com a trombocitopenia (“Toddy”, “Mike”, “Boris”, “Judy”, “Shiva”, “Bob”, “Melvin” e “Trovão”), em igual percentagem. Segundo alguns autores (KONTOS; KOUTINAS, 1993; CIARAMELLA; CORONA, 2003; IKEDA et al., 2003, BANETH, 2006) observa-se que 57 a 94,2% dos animais com leishmaniose visceral podem apresentar quadro de anemia normocítica e normocrômica. A patogênese da anemia na leishmaniose visceral não é totalmente conhecida e acredita-se que mais de um fator esteja envolvido, como: seqüestro esplênico de hemácias, diminuição da produção medular, falência renal crônica, hemorragias entéricas e renais, hemólise e os mecanismos de imunomediação (KONTOS; KOUTINAS, 1993; DE LUNA et al., 2000; CIARAMELLA; CORONA, 2003, IKEDA et al., 2003, VILAGRAN, 1997).

Com relação às alterações plaquetárias, evidenciadas em 34,8% dos casos (“Toddy”, “Mike”, “Boris”, “Judy”, “Shiva”, “Bob”, “Melvin” e “Trovão”), alguns autores relatam que a contagem de trombócitos pode estar normal (MORENO et al., 1998), enquanto que outros reportam a ocorrência de trombocitopenia (SLAPPENDEL; FERRER, 1998; CIARAMELLA; CORONA, 2003). Segundo Baneth (2006) a trombocitopenia não é um achado consistente na evolução da leishmaniose visceral canina. Suas possíveis causas são supressão de sua produção em medula óssea, seqüestro esplênico, presença de imunocomplexos circulantes e auto anticorpos (KONTOS; KOUTINAS, 1993; SLAPPENDEL; FERRER, 1998).

A leucocitose e linfopenia foram observadas em somente 4,3% dos cães (“Theodoro” e “Branca”). Os quadros de leucocitose por neutrofilia, quando

presentes, estão normalmente associados a quadro de infecção bacteriana secundária. Alguns autores descrevem a presença de leucocitose associada com neutrofilia (ANOSA; IDOWU, 1993), enquanto outros relatam a ocorrência de leucopenia (ABRANCHES et al., 1991) em cães acometidos pela leishmaniose. As alterações quantitativas linfocitárias são pouco freqüentes, havendo muitas discordâncias nos dados bibliográficos quanto a ocorrência de linfocitose ou de linfopenia. Segundo Bourdoiseau et al. (1997) os animais soropositivos em bom estado clínico apresentam linfocitose, enquanto aqueles com quadro clínico grave manifestam linfopenia. Já, Ikeda et al. (2003), observaram tanto linfocitose quanto linfopenia em 191 cães, naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, investigados no município de Araçatuba (São Paulo).

A principal alteração encontrada, no exame de urina de dois cães (“Toddy” e “Mike”) acometidos, foi a proteinúria (8,7%). Tal perda protéica é citada por alguns autores (KONTOS; KOUTINAS, 1993; SLAPPENDEL; FERRER, 1998). Autor espanhol, como Vilagran (2006), afirmou que na leishmaniose visceral canina do Velho Mundo, achados laboratoriais como proteinúria (com ou sem hematúria), associados às disproteinemias séricas, às anemias e a níveis elevados de uréia constituem-se em dados de valor orientativo para a diagnose da enfermidade.

As determinações da concentração sérica de uréia e creatinina não propiciam elementos para o diagnóstico quando da ocorrência de lesões renais iniciais, desta forma o exame de urina é um dos primeiros exames de função renal que dever ser solicitado (LOPEZ et al., 1996).

Dos quatro (17,4%) cães (“Kety”, “Brenda1”, “Brenda2”, “Theodoro”) com leishmaniose visceral acometidos, que apresentaram hiperfosfatase alcalina, somente dois (“Brenda1” e “Brenda2”) apresentavam hepatomegalia. Em relação ao aumento da enzima ALT também, o animal acometido (“Theodoro”), não apresentava tal visceromegalia na avaliação física. Isto condiz com os relatos brasileiros de Genaro (1993) e Feitosa et al. (2000) que asseguraram que nem todos os animais que apresentam alterações de enzimas hepáticas apresentam hepatomegalia.

A leishmaniose é uma zoonose de notificação compulsória, sendo que o diagnóstico etiológico deve ser executado de modo mais preciso possível, inclusive para evitar à adoção de medidas extremadas em animais hígidos erroneamente

reputados como “infectados”. Para isso é importante que se conheça profundamente o método diagnóstico utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica (FERRER, 1999). A metodologia utilizada nos Serviços de Dermatologia e Clínica Médica de cães e gatos do HOVET/USP foi, a princípio, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação imunoenzimática (ELISA). Os resultados sorológicos quanto àqueles do exame laboratorial, são amplamente utilizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. A técnica de imunoistoquímica foi realizada em blocos parafinados provenientes dos animais em que se colheu material para exames histopatológicos de pele biopsiada (“Sofia”, “Kety”, “Toddy”, “Mike”, “Breik”, “Boris”, “Judy”, “Bacco”, “Lara”, “Melvin”, “Buck” e “Theodoro”). Os exames parasitológicos de linfonodo e/ou medula óssea foram realizados em 16 animais com leishmaniose visceral visando precisar o diagnóstico da protozoose.

O exame de ELISA havia sido realizado em 35 (97,2%) dos cães da amostragem, evidenciando-se soropositividade em 97% destes cães, com exceção de um, que apresentou resultado negativo.

A positividade do teste ELISA foi de 100% no grupo de sintomático, em um cão (“Bob”) assintomático e de 94,4% nos cães oligossintomáticos, indicando uma resposta imune humoral com produção de imunoglobulinas anti-*Leishmania* pouco mais freqüente no grupo sintomático em relação aos oligossintomáticos. Estes animais provavelmente manifestavam resposta Th2 mais efetiva que, além de favorecer a produção de anticorpos, permitiria o desenvolvimento da doença ativa com evidência da sintomatologia.

A RIFI tem sido a técnica sorológica mais utilizada no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, particularmente em inquéritos epidemiológicos, (BRASIL, 2006), apresentando sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade de ordem de 80 a 100% (ALVES et al., 2004).

No soro dos 21 animais em estudo em que se realizou a RIFI, houve maior percentagem de positividade em animais sintomáticos (100%) relativamente aos oligossintomáticos (66,7%). Apesar da variabilidade de positividade entre os animais oligossintomáticos e sintomáticos, a IFI é reação que apresenta boa sensibilidade, porém com especificidade diminuída. Além disso se constitui em técnica laboriosa e que requer bom treinamento do observador para a interpretação dos resultados, pois o limite entre o que se considera reações “positivas” ou “negativas” é muito sutil e,

por vezes, até subjetivo.

Nas leituras da RIFI, os títulos séricos dos 18 cães reagentes foram iguais ou maiores a 160, ou seja, evidentemente positivos. Pela bibliografia compulsada alguns autores consideram que o melhor nível de corte para o teste RIFI, é de 1:80 (MANCIANTI, 1988; PINELLI, 1994; CABRERA, 1999). Já Neogoy et al. (1992), observaram que a diluição 1:160 é aquela que apresenta 100% de especificidade, o que significa que todos os verdadeiros negativos podem ser identificados a partir de tais títulos, impedindo dessa forma, que animais não infectados sejam eliminados. O Ministério da Saúde brasileiro, no entanto, caracteriza como sororeagentes aqueles animais com títulos iguais ou superiores a 40.

Correlacionando-se os resultados considerados, comparando-se o ELISA e a RIFI entre si, observou-se que ambos os métodos apresentaram evidente positividade no grupo dos 36 cães em que se realizou os dois exames. No grupo de cães oligossintomáticos porém a RIFI apresentou percentagem (33,3%) significativamente maior de resultados negativos quando comparados ao ELISA (5,6%). Segundo os resultados de estudos que compararam o teste ELISA e a RIFI, por meio da determinação do coeficiente *Kappa*, observa-se uma concordância considerada boa entre a RIFI e o teste ELISA (ZANETTE, 2006). Segundo alguns outros autores, o ELISA tem mostrado maior sensibilidade e especificidade quando comparado à RIFI (EVANS et al., 1990; MANCIANTI et al., 1995).

De acordo com Almeida et al. (2005), os exames sorológicos (ELISA e RIFI), mormente quando associados, são essenciais para confirmar a suspeição de leishmaniose visceral canina.

Os achados histopatológicos de material cutâneo podem ser inespecíficos e caracterizam-se por uma reação inflamatória granulomatosa com presença de células mononucleares, alterações estas, comuns a várias outras dermatopatias. O exame histopatológico pode, muitas vezes, ser inconclusivo principalmente quando houver uma baixa densidade a nível cutâneo das formas amastigotas de *Leishmania sp* (FERRER, 1999), necessitando, muitas vezes, recorrer-se à técnica de imunoistoquímica para corroborar o diagnóstico (FERRER et al., 1988; BOURDOISEAU et al., 1997). Nos 13 cães em que foi realizado o exame histopatológico de tecido cutâneo lesado evidenciou-se o agente parasitário da *Leishmania sp* em 30,8% (“Sofia”, “Kety”, “Judy” e “Theodoro”). Nestes, o quadro

histológico fora descrito como apresentando “denso infiltrado linfo-plasmocitário”, estando infiltrado por macrófagos, cujos citoplasmas eram vacuolizados e, continham em seu interior, grande número de parasitas. De acordo com a bibliografia (BANETH, 2006) é comum observar, em exames histológicos de pele, infiltrados plasmocíticos difusos, associados à perifoliculite granulomatosa. Também, tem sido relatado que quadros histológicos tais como piogranuloma estéril ou a adenite sebácea granulomatosa podem estar sendo mimetizadas pela leishmaniose (GROSS, 2005). No presente estudo três cães (“Lucky”, “Breik” e “Lara”) apresentaram quadros histológicos distintos, condizentes, respectivamente a lúpus eritematoso discóide, piogranuloma estéril e hemangioma ulcerado. Em 23% dos cães da amostragem (“Mike”, “Boris” e “Bacco”) foi descrito quadro histológico “sugestivo” de leishmaniose, observando, histologicamente, uma “dermatite granulomatosa ulcerativa”, estando associado a presença de macrófagos vacuolizados com estruturas em seu interior podendo corresponder, ou sugerir, serem formas amastigotas do parasito. Nos demais três cães (“Toddy”, “Melvin” e “Buck”) constatou-se quadro histológico de “dermatite ulcerativa sem caráter específico”. De acordo com Ferrer (1988) lesões ulceradas em cães com leishmaniose podem estar associadas a um número limitado de amastigotas em seu tecido de revestimento, tornando o exame histopatológico pouco sensível.

No tocante aos resultados do emprego de imunoistoquímica a partir de fragmentos emblocados, de pele lesada e biopsiada, de 12 cães (“Sofia”, “Kety”, “Toddy”, “Mike”, “Breik”, “Boris”, “Judy”, “Bacco”, “Lara”, “Melvin”, “Buck” e “Theodoro”), pôde-se identificar o protozoário em sete (58,3%) deles (“Sofia”, “Kety”, “Mike”, “Judy”, “Melvin”, “Buck” e “Theodoro”). Ao se considerar a positividade frente ao agrupamento, segundo as manifestações sintomáticas, constatou-se que, respectivamente, cinco (83,3%) e dois (33,3%), de sintomáticos e oligossintomáticos houve imunomarcagem (Apêndice B). Estes percentis podem induzir à interpretações de que nos cães ditos sintomáticos há presença de maior número de formas do parasita. Tais resultados, mesmo considerando o número restrito de animais, apontam para a importância do uso desta técnica na rotina diagnóstica laboratorial. Segundo Ferrer (1999) e Gradoni (2002), o método ideal para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina seria aquele que apresente altos percentis de especificidade e de sensibilidade e que seja de baixo custo e de rápido resultado.

Apesar da imunoistoquímica dispendar mais tempo e de não apresentar baixo custo para sua realização, tal técnica propicia valores elevados de sensibilidade e de especificidade, principalmente em cães com flagrante quadro clínico, sistêmico e dermatológico (BOURDOISEAU et al., 1997; FERRER et al., 1998;).

Em contrapartida, segundo Tafuri et al. (2001) e Abranches et al. (1998), em cães leishmanióticos sintomáticos, com intenso parasitismo em muitos órgãos internos, pode-se não evidenciar o parasitismo tecidual, enquanto que em cães assintomáticos pode haver parasitismo tegumentar evidente. Os mecanismos pelos quais os parasitos se disseminam no tegumento dos cães acometidos pela leishmaniose ainda são obscuros e, podem, provavelmente, estar relacionados a fatores imunopáticos individuais dos hospedeiros e ao transcurso da doença (TRAVI et al., 2001). No presente levantamento não houve diferença percentual tão evidente entre cães positivos (58,3%) e negativos (41,7%).

Correlacionando a técnica de imunoistoquímica com os exames de ELISA e RIFI, nos oito (“Kety”, “Toddy”, “Mike”, “Breik”, “Boris”, “Bacco”, “Lara” e “Buck”) animais em que houveram sido realizado os três exames, observou-se que a RIFI foi mais representativa dos casos positivos (100%), em seguida o exame de ELISA (87,5%) e, por fim a imunoistoquímica (37,5%). De acordo com tais resultados, pode-se sugerir que a RIFI seria o exame mais significativo dentre os três, embora possa açambarcar alguns casos de falsa positividade. Uma amostragem maior de animais com realização de tais exames seria imprescindível para se concluir sobre a fidedignidade dos resultados.

O exame parasitológico de linfonodos e/ou de medula óssea, é um dos métodos tradicionais e, supostamente, mais simples dentre os empregados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Neste exame busca-se o parasito na sua forma amastigosta. A especificidade deste método é de cerca de 100%, mas a sensibilidade seja estimada como sendo de no máximo, de 80% em cães sintomáticos e, em menores percentis nos cães assintomáticos (SLAPPENDEL; FERRER, 1998). A sensibilidade deste método varia de acordo com os autores, como sendo de menos de 30% ou entre 30 a 85% para o exame parasitológico, quando realizado a partir de material colhido dos linfonodos (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 2001). Quando da execução do exame parasitológico da combinação de linfonodos superficiais e de medula óssea a sensibilidade alcança

patamares de 71 a 90% (KOUTINAS et al., 2001).

Pelos dados coligidos neste levantamento retrospectivo de casuística o exame parasitológico para a evidenciação do protozoário em esfregaços realizados a partir de material colhido por biópsia aspirativa de linfonodos superficiais (pré escapulares e/ou poplíteos) de 16 animais propiciou a evidenciação do agente em seis (37,5%) deles (“Kety”, “Boris”, “Jacó”, “Brenda2”, “Giga” e “Theodoro”). Quando se compara os resultados entre os oligo e sintomáticos pode-se verificar a presença do agente em, respectivamente, 28,6 e 45,4% cães (“Boris” e “Jacó” dentre os oligossintomáticos e “Kety”, “Brenda2”, “Giga” e “Theodoro” dentre os sintomáticos). É imprescindível destacar que a positividade se altera com a habilidade daquele que biopsia os linfonodos, com a magnitude do enfartamento linfonodal, com o treinamento daquele que examina e, ainda, com a eventual interposição de tratamento pretérito, com derivadores metabólicos (alopurinol), fungistáticos (azólicos), parasiticidas (antimoniais), dentre outros. Nenhum dos animais, em que se observou a ausência de parasitas, houvera sido ou estava sob terapia quando da colheita. Não se pode, no entanto, nesta casuística descartar a hipótese de que, nos grupos sintomático e oligossintomático, a resposta imunológica desencadeada tenha propiciado uma maior destruição de formas amastigotas, dificultando sua visibilização no exame parasitológico (PINELLI et al., 1999).

O exame parasitológico de medula óssea, realizado em seis cães (“Boris”, “Brenda2”, “Giga”, “July”, “Penélope” e “Trovão”), permitiu evidenciar percentagem plena de positividade (100%) nos animais do grupo sintomático (“Brenda2”, “Giga” e “Trovão”). A sensibilidade deste método, para a medula óssea, pode ser de 60% ou variar entre 50 e 83% (FERRER, 1999; KOUTINAS et al., 2001). Segundo a bibliografia acredita-se que a quantidade de formas amastigotas, de *Leishmania*, seja maior na medula óssea e no baço, relativamente aos linfonodos. Por esse motivo considera-se, também, que o exame parasitológico, por punção aspirativa, esplênico e de medula óssea seja superior quando comparada àquela de linfonodos (FERRER, 1992). De acordo com Manolis et al. (2005), a sensibilidade tanto do exame parasitológico, por biópsia aspirativa, de linfonodos como de medula óssea está diretamente relacionada com a intensidade da sintomatologia. Nos grupos estudados, mesmo que realizado em tão somente seis animais observou-se maior percentagem no grupo de animais sintomáticos.

6 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos pelo levantamento retrospectivo ora concretizado, permite-se concluir que:

- em um decênio (1997-2007) atenderam-se, no Hospital Veterinário da FMVZ “campus” de São Paulo, 36 cães com diagnóstico firmado de leishmaniose visceral alóctone. Destes 55,5% (20) eram fêmeas, 66,7% (24) eram de raça definida, principalmente das raças Poodle (5 – 20,8%), Labrador (5 – 20,8%) e Boxer (3 – 12,5%). Na ampla faixa etária de sete a 113 meses, em média de 51,3 meses, aquela de maior concentração de animais infectados era a dos 13 a 48 meses, que açambarcou 19 (52,8%) dos animais;
- quanto ao local de nascimento um (2,8%) cão proveio de Portugal, três (8,6%) tinham como origem o Estado de Minas Gerais e a grande maioria (32 - 90%) provinha do Estado de São Paulo, de 13 distintos municípios;
- quanto aos municípios de origem: Campinas (um cão), Campo Limpo Paulista (um), Holambra (um), Ilha Bela (um), São Roque (um), Sorocaba (um), Ubatuba (um) e Uberaba (um) são considerados até então, como silenciosos, não receptivos não vulneráveis (Ilha Bela e Ubatuba) ou vulneráveis (Campinas, Campo Limpo Paulista, Holambra, São Roque, Sorocaba e Uberaba). Os demais 28 cães do Estado de São Paulo originaram-se de municípios com transmissão: canina e humana (Araçatuba – três, Bauru – um), canina (Cotia – cinco, Embu – quatro) ou sob investigação (São Paulo – 11, Mogi das Cruzes – um). Já Portugal (um) e Minas Gerais (Belo Horizonte – dois) são locais sabidamente caracterizados como de transmissão canina e humana;
- pôde-se evidenciar deslocamentos breves ou longos, preteritamente ao estabelecido do diagnóstico de LV canina a 14 municípios paulistas (Araçatuba, Birigui, Caraguatatuba, Cotia, Eldorado, Embu e Embu Guaçu, Guarujá, Ilha Bela, Itapequerica da Serra, Peruíbe, Presidente Prudente, São Roque e São Paulo Capital)

e cinco outros Estados (Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina);

- os cães oligossintomáticos (18 – 50%) ou sintomáticos (17 – 47,2%) apresentavam, quanto ao cotejo mórbido, alterações dermatológicas e sistêmicas (75%) ou somente cutâneas (22%);

- dentre as manifestações tegumentares ou fanéricas a rarefação pilosa e/ou alopecia (45,7%), descamação (40%) e presença de úlceras (37,1%) foram as mais evidenciadas, tendo sido o prurido detectado em 63,9% dos cães. Topograficamente a região cefálica seguida por aquela dos membros e da região abdominal ventral foram as mais acometidas;

- dentre as alterações sistêmicas a linfadenomegalia (74%), pirexia (44,4%), disorexia (40,7%), emagrecimento (29,7%), hepato (29,7%) e esplenomegalia (25,6%), prostração (25,6%) e claudicação (22,2%) foram os achados mais comuns;

- os principais achados laboratoriais detectados, dentre os 23 que os apresentavam, incluíam em ordem decrescente: hiperproteinemia (56,5%), hipoalbuminemia (52,1%), anemia e trombocitopenia (34,8% ambos), hiperfosfataseemia alcalina (17,4%), proteinúria e cristalúria (ambos com 8,7%), hipertransferaseemia, leucocitose e linfopenia absoluta (todas em 4,3%);

- a técnica de imunoistoquímica, empregada em cortes histológicos de 12 (33%) cães com LV permitiu evidenciar a presença do agente em sete (58,3%). Dentre estes setes incluíam-se dois (33,3%) oligossintomáticos e cinco (83,3%) sintomáticos. Desta forma, permite-se caracterizá-la como metodologia de inegável valia, superando os resultados positivos da histopatologia (30,8%).

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Médica Portuguesa**, v. 11, p. 871, 1998.
- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 5, p. 537-550, 1991.
- ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (*Calazar*). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 706-717.
- ALMEIDA, M. A. O.; JERUSA, E. E. V.; SOUZA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.127, p. 227-232, 2005.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexos sobre a qualidade do diagnóstico da leishmania 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, H. M.; VICENTE de, P. C. P.; TOLEDO de, M. J. M.; FRANÇA SILVA, J. C.; TAFURI, W. L.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Leishmania (*Leishmania*) *chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 71-81, 2002.
- ANOSA, V. O.; IDOWU, A. L. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. **Zentralblatt Veterinärmedizin B**. v. 30, n. 8, p. 600-608, Sep. 1983.
- BADARÓ, R. J. S. **Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rk39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral**, 1996 Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1996.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (*Calazar*). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: ed Atheneu, p. 1234-1259, 1996.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. Georgia: Saunders Elsevier, 2006. p. 685-698.
- BIAZZONO, L. Leishmaniose visceral canina em São Paulo: uma realidade. **Boletim Informativo Anclivepa**, ano III, n. 18, p. 17-19, 1999.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J. P.; SAINT-ANDRÉ, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 345-351, May 1997.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniasis. **The Veterinary Journal**, v. 162, p. 108-120, 2001.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, L. T.; TEIXIERA, M. J.; LIMA, J. W. O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes 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. 315, n. 5, p. 419-424, 1998.

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.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania chagasi)* (Cunha & Chagas 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba**. Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras. 1999. 84 p. Tese (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, n. 4, p.143-171, 1974

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 39, p. 1-12, mar 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G. Ações controle da leishmaniose visceral americana implementados na região oeste do estado de São Paulo. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 32, p. 63, 1999.

CHAGAS, C. Leishmaniose Visceral Americana. Nova entidade mórbida do homem da América do Sul. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, p. 325-332, 1937

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358-368, may 2003.

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

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

COWELL, R. L.; TYLER, R. D. Cytology of cutaneous lesions. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 19, n. 4, p. 769-794, 1989.

DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 2, p. 213-216, feb-apr, 2000.

Donovan, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medicine Journal**, p. 79, 1903.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detection of infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 3, p. 647-656, 1993.

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 Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 271-274, 1986.

EVANS, T. g.; VASCONCELOS, I. A. B.; LIMA, J. B.; TEIXEIRA, M. J.; MacAULIFFE, I. T.; LOPES, U. G. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnosis methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 118-123, 1990.

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

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; BONELLO, F. L.; CIARLINI, P. C.; GONÇALVES, M. E.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Veterinárias Notícias**. Uberlândia, v. 11, n. 2, p. 61-69, 2005.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: 1º Forum sobre leishmaniose visceral canina, Jaboticabal. **Anais...** 2006. p. 10-11.

FERRER, L. Canine Leishmaniosis: evaluation of the Immunocompromised Patient. In: WSAVA CONGRESS CHOOSES, 8, 2002, GRANADA. Proceedings...Disponível em: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=PR02653>. Acesso em: 5 janeiro de 2007.

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. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999, p.6-10

FERRER, L. M.; FONDEVILA, D.; MARCO, A.; PUMAROLA, M. Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. **Veterinary Record**, v. 126, p. 90, 1990.

FERRER, L. M.; RABANAL, R.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotas in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, v. 44, p. 194-196, 1988b.

FERRER, L. M.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988a.

GENARO, O. **Leishmaniose canina experimental**. 1993. 202 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10. ed.local: Editora Atheneu, 2000., p. 56-72.

GILES, G. M. A report of na investigation into the causes of the diseases know in Asma as kala-zar and beri-beri. **Shillong**, p. 156, 1890.

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

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM . 2; 2002, Servilla, Spain. Salamanca: Intervet International bv, 2002. P. 7-14. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Infectious nodular and diffuse granulomatous and pyogranulomatous diseases of the dermis. In: GROSS, T. L. (Ed.). **Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis**. Rio de Janeiro: Blackwell Science, 2006. p. 272-319.

GRUPO DE ESTUDOS EM LEISHMANIOSE. BEPA. Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana. **BEPA: Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 2, n. 45. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa_menu.htm>. Acesso em: 14 out.2007.

GUIMARÃES, M. C. S.; CELESTE, B. J.; CASTILHO, E. A. de; MINEO, J. R.; DINIZ, J. M. P. Immunoenzimatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, *kala-zar*, and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 942-947, 1981.

IKEDA, F. A.; CIARLINI, P. C.; FEITOSA, M. M.; GONÇALVES, M. E.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, v. 8, n. 47, p. 42-48, 2003.

IVERSSON L. B.; CAMARGO, M. E.; ROCHA E. O.; CHIEFFI, P. P.; BARROS, J. A. C. Investigaço epidemiolgica de um caso de leishmaniose visceral autctone da Grande So Paulo, Brasil. **Revista de Sade Pblica**, n. 13, p. 159-167, 1979.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 2, n. 1, p. 80-86, 1984b.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old world canine leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, n. 7, p. 949-959, 1993.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical Trial with allopurinol in canine leishmnaiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 247-261, jul. 2001.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Ecology and epidemiology: new world. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press Inc., 1987, v. 1, p. 291.

LARSSON, C. E.; OTSUKA, M.; MICHALANY, N. S.; RIBEIRO, V. M. Canine visceral leishmaniasis (*kala-azar*) reported cases in the city of So Paulo (Brazil). In: CONGRESSO DE LA ASSOCIATION MUNDIAL DE MEDICINA VETERINRIA DE PEQUENOS ANIMALES, 23; CONGRESSO MUNDIAL DE MEDICINA VETERINARIA DE PEQUENOS ANIMALES, 22., Buenos Aires. **Anais...** 1998. p. 801.

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

LAVERAN, C. L. A.; MESNIL, F. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lou. Et mean). Parasite d'une fivre d'Inde. **C. R. Hebd. Acad. Sci.**, n. 137, p. 957-961, 1903

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

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

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA, M. M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 485-489, Apr. 2003.

LONGSTAFFE, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; BEDFORD, P. G. C.; HERRTAGE, M. E.; DARKE, P. G. G. Leishmaniasis imported dogs in the United Kingdom: a potencial human health hazard. **Small Animal Practice**, v. 24, p. 23-30, 1983

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P. J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B.*, v. 43, n. 8, p. 469-474, Oct.1996.

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

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 566-567, 1988.

MANOLIS, M.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; BILLINIS, C.; DIAKOU, A.; KONTOS, V. I. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 3-4, p. 199-205, jun 2005.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 34-37, 1994.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: Congresso de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, and immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological

diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

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 (Díptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MIGOGNE, L. E. Um caso de Calazar em Assuncion (Paraguai). *Bull. Soc. Path. Exot. Et. Ses. Fil.*, p. 118-120, 1973. In: LEASON, R.; SHAW, J. J. **The Leishmaniasis**, p. 115

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

MOREIRA, M. A. B. **Leishmaniose visceral canina em Araçatuba (SP):** diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular e alterações histopatológicas de órgãos linfóides e fígado. 2003, 103 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MORENO, P.; LUCENA, R.; GINEL, P.J. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 142, n. 4, p. 81-83, Jan. 1998.

MOZOS, E.; PÉREZ, J. DAY, M. J.; LUCENA, R.; GINEL, P. J. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. **Journal Compendium Pathology**, v. 120, p. 257-268, 1999.

NEOGOY, A. B.; VOULDOUKIS, I.; SILVA, A. O.; TSELENTIS, Y.; LASCOMBE, J. C. SEGALIN, T. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis Iná endemic área of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. **American Journal of the Tropical Medicine Hygiene**, v. 47, n. 6, p. 772-777, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 22, p. 1-13, 1996.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasilian Medicine**, v. 48, p. 949-953, 1934.

PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 1982.

PINELLI E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEAL REAL, G.; RUIEMBER, G. J.; Celular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI E.; RUTTEN, V. P. M. G.; RUIEMBERG, E. J. Celular immune responses in canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIOSIS, 1999, [Barcelona, Spain]. 1999. p. 60-64.

RACHAMIN, N.; JAFFES, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R.L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Annals of Tropical and Parasitology*, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic distick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

ROGERS, L. A peculiar intralobular cirrhosis of the liver produced by the protozoal parasite of kala-zar. **Ann. Tropical Medicine Parasitology**, v. 2, p. 147-152, 1908.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**. v. 2, p. 1401, 1903.

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

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RUBEIRO, A. A.; PAIVA, H. M.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. **Leishmaniose Visceral Americana**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2006, 158 p.

SCOTT, D. W.; WILLIAM, H. M.; GRIFFIN, G. E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. In: **Small Animal Dermatology**, 6 ed., Philadelphia: Saunders Company, 2001, p. 517-542

SING, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 55-60, 2003

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C. ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibiza hound presents a predominantly cellular

immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 37-45, 2000.

SPLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v.10, p. 1-16, 1988.

SPLAPPENDEL, R. L.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 450-458.

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

TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. A.; MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p.81-89, 1996.

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

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colômbia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 119-124, 2001.

VERCAMMEN, F.; BERKVEN, D.; LERAY, D.; JACQUET, D.; VERVOORT, T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **Veterinary Record**, v. 141, n. 13, p. 328-330, 1997.

VILAGRAN, J. C. Leishmaniasis canina. In: MUR, E. S. **Manual clínico de dermatología en el perro y gato**. 1. ed. Barcelona: Pulso Ediciones, 1997. p. 229-237.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoabsorbent assay. In: Rose, N.; FRIEDMAN, H. (Ed). **Manual of clinical immunology**. Washington, D.C.: American Soc. Microbiology, 1980, p 359-371.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta, imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. Araçatuba, 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Unesp Araçatuba, Araçatuba, 2006.

WHO. World Health Organization. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmania. Geneva: WHO, 1990.

ANEXOS

ANEXO A - Padronização método ELISA

As microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com um volume de 100 µL de antígeno solúvel (FM e UFMG) de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, nas concentrações de 10 e 20 µg/mL de proteína, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9.5, e incubadas “overnight” a 4°C. Após três lavagens com 200 µL de solução tampão fosfato e tween (PBS-tween), as placas foram bloqueadas, para ligações inespecíficas, com solução de leite em pó desnatado a 10% em PBS-tween (200µL por poço) e, em seguidas, incubadas por 2 horas a 37°C. Após nova lavagem com PBS-tween por três vezes as amostras de soros foram adicionadas à placa, em duplicata, no volume de 100 µL por poço, nas diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 em PBS-tween e incubadas a 37°C durante um hora em câmara úmida. Em seguida, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-tween, sendo seguidamente adicionados 100µL de anticorpo anti-IgG de cão, marcado com fosfatase alcalina previamente titulado. Após incubação por 45 minutos a 37°C as placas foram novamente lavadas, três vezes, com PBS-tween. Em seguida foi adicionado o revelador, contendo o substrato e o cromógeno (1,0 mg/mL de PNPP em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH9,5), no volume de 100uL por poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida com 50uL de NaOH 3M por poço, sendo a leitura¹ de absorbância feita em filtro de 405nm.

¹ Labsystems Multiskan

ANEXO B – Padronização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As amostras foram, em lâminas, sensibilizadas sendo adicionado 15 ml da suspensão de parasitas, promastigotas de *Leishmania chagasi*, em PBS em cada círculo. Em seguida, após a secagem em estufa, as lâminas foram embaladas em papel extra-fino e papel alumínio e, então, armazenadas em freezer à -20°C . No momento do uso, as lâminas foram descongeladas em estufa durante cinco minutos. Em cada círculo foram adicionados 20 ml das amostras de soro a serem testados, diluídas na concentração de 1:40 em PBS. As lâminas foram então incubadas durante 30 minutos em câmara úmida à 37°C e, em seguida, lavadas por imersão em PBS por três vezes. O anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína¹ foi diluído na concentração de 1:100 em azul de Evans e, 20 ml desta solução foram adicionados em cada círculo das lâminas, as quais foram novamente incubadas durante 30 minutos à 37°C . Após nova lavagem em tampão PBS, foi adicionada glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato (pH 9,5) e as lâminas foram recobertas por lamínula para leitura em microscópio de fluorescência.

Soros sabidamente positivos e negativos foram utilizados em cada lâmina como controles positivo e negativo da reação. As reações fluorescentes em soros com diluições iguais a 1:40 foram as consideradas como positivas. As amostras de soros positivas nesta diluição foram novamente testadas para a determinação do título. Em cada círculo da lâmina foram adicionados 20 ml de diluições sucessivas dos soros testes positivos a partir de 1:80, duplicando-se a diluição até 1:1280.

¹ Sigma – Aldrich Brasil LTDA

ANEXO C – Padronização da técnica de imunohistoquímica

Efetua-se a desparafinização a frio, que consistiu na aplicação de banho de xilol por 15 minutos. A hidratação foi executada em banhos, por cinco minutos, em álcool etílico em concentrações decrescentes 100%, 95%, 80%, 70% e 50%, e a seguir, em água corrente por 10 minutos, sucedida por imersão em água destilada.

A recuperação antigênica, dos cortes, foi efetuada em solução de ácido cítrico (10mM/ pH 6,0) em banho-maria à 95°C. Após atingir esta temperatura aguardava-se o resfriamento até que a temperatura atingisse 55°C. Em seguida, as lâminas eram colocadas em cubas de vidro e iniciava-se o bloqueio da peroxidase endógena, que consistia em seis banhos de cinco minutos cada, em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 volumes. Após lavagem em água corrente por dois minutos, as lâminas eram imersas em água destilada.

Com a finalidade de bloquear ligações imunes inespecíficas, o excesso de água destilada contida ao redor dos cortes era absorvido em papel filtro e, por sobre os cortes adicionava-se solução de soro suíno normal a 1,5%, diluído em PBS, seguindo, então, o material para incubação em câmara úmida por uma hora à 37°C.

A seguir, as lâminas eram imersas em solução de leite em pó, desnatado, diluído a 6%, à temperatura ambiente por 60 minutos, para bloqueio de ligações iônicas. O excesso de líquido ao redor dos cortes foi absorvido em papel filtro.

Na sequência, era realizada a incubação com o anticorpo primário anti-*Leishmania sp*, produzido em camundongo na diluição de 1/1800, em solução tampão fosfato (PBS), contendo 1% de soro albumina bovina, acondicionando-se em câmara úmida, a 37°C, por uma hora e, a seguir, a 4°C “overnight”.

Após incubação “overnight”, os cortes eram lavados, por 10 minutos, com solução tampão PBS e Tween 20 a 0,05%, e submetidos à nova incubação com o anticorpo secundário, biotinilado a 37°C, por 60 minutos, e, novamente, submetidos a lavagem com tampão PBS por três vezes.

A seguir, realizava-se a incubação com streptavidina-peroxidase (Kit LSAB - Dako®¹) a 37°C por mais 45 minutos.

O cromógeno Diaminobenzidina-DAB (SIGMA) foi utilizado para revelação, sendo este acrescido de um ml de peróxido de hidrogênio 20 volumes, com incubação por cinco minutos, a temperatura ambiente, sendo esta reação interrompida com água destilada.

Por fim, realizava-se a contra-coloração com Hematoxilina de Harris, deixando-se as lâminas imersas por um minuto, lavando-as em água corrente por 10 minutos com uma passagem final em água destilada. As lâminas foram desidratadas em soluções crescentes de álcoois, xilol e montadas em resina com lamínulas.

¹Dako® - Corporation, Carpinteria - USA

ANEXO D - Caracterização de 36 caninos domésticos (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) com diagnóstico estabelecido de leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ/USP, segundo a resenha, mês de atendimento, resultados sorológicos, imunoistoquímicos e citológicos. São Paulo - 2007

No.	Nome (Pront °)	Mês de atendimento	Sexo	Idade (meses)	Definição racial CRD SRD	ELISA	RIFI	Imuno- istoquímica	Citologia linfonodo	Citologia Medula óssea	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
01	Sofia (073796)	março/97	F	19	Husky Siberiano	pos	...	+	...	...	S
02	Kety (080966)	outubro/97	F	96	Poodle	pos	1:320	+	pos	...	S
03	Toddy (061292)	março/98	M	21	Labrador	pos	1:160	neg	...	...	S
04	Mike (093705)	janeiro/99	M	96	Labrador	pos	1:2560	+	...	...	S
05	Teka (098917)	julho/99	F	37	Dachshund	pos	NR	...	...	...	Oligo
06	Breik (111568)	agosto/00	M	18	Labrador	neg	1:640	neg	neg	...	Oligo
07	Scooby (118557)	abril/01	M	7	Boxer	pos	...	...	...	...	S
08	Julia (127681)	fevereiro/02	F	9	Poodle	...	1:640	...	...	...	S
09	Boris (134395)	setembro/02	M	20	X	pos	1:160	neg	pos	pos	Oligo
10	Brenda I (134184)	setembro/02	F	12	Poodle	pos	1:160	...	neg	...	S
11	Judy (136804)	novembro/02	F	84	Doberman	pos	...	+	...	...	Oligo

(continua)

No.	Nome (Pront. no.)	Mês de atendimento	Sexo	Idade (meses)	Definição racial CRD SRD	ELISA	RIFI	Imuno istoquímica	Citologia linfonodo	Citologia Medula óssea	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
12	Shiva (138773)	janeiro/03	F	39	STB terrier	pos	1:640	...	neg	...	S
13	Bob (147154)	outubro/03	M	84	Poodle	pos	1:160	...	...	...	A
14	Bacco (147764)	novembro/03	M	111		X pos	1:160	neg	neg	...	Oligo
15	Lupi (152276)	maio/04	M	23		X pos	1:160	...	neg	...	S
16	Lara (145478)	agosto/04	F	17	Weimaraner	pos	1:160	neg	...	...	Oligo
17	Tucha (157782)	janeiro/05	F	20		X pos	1:160	...	...	...	S
18	Jacó (159287)	fevereiro/05	M	95		X pos	1:160	...	pos	...	Oligo
19	Brenda2 (160581)	março/05	F	41	PitBull	pos	...	...	pos	pos	S
20	Melvin (129656)	abril/05	M	80	Labrador	pos	...	+	neg	...	Oligo
21	Buck (165719)	agosto/05	M	96		X pos	1:160	+	neg	...	S
22	Yanca (165242)	agosto/05	F	16	Boxer	pos	1:160	...	neg	...	Oligo
23	Giga (166181)	setembro/05	F	48		X pos	1:160	...	pos	pos	S
24	Branca (166422)	novembro/05	F	50		X pos	...	...	neg	...	Oligo
25	Theodoro (172388)	junho/06	M	21	Basset Hound	pos	...	+	pos	...	S

(continua)

No.	Nome (Pront. No.)	Mês de atendimento	Sexo	Idade (meses)	Definição racial CRD SRD	ELISA	RIFI	Imuno istoquímica	Citologia linfonodo	Citologia Medula óssea	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
26	Jully (176089)	agosto/06	F	86	Dachshund	pos	...	...	...	...	Oligo
27	Dhuly (177098)	outubro/06	F	110	Poodle	pos	NR	...	...	...	Oligo
28	Bolota (178604)	novembro/06	F	33	X	pos	...	...	...	...	S
29	Espirro (167535)	dezembro/06	M	36	FB	pos	1:640	...	neg	...	S
30	Suzy (106608)	janeiro/07	F	103	Boxer	pos	...	...	...	...	Oligo
31	Tuti (179530)	janeiro/07	F	36	X	pos	...	...	...	...	Oligo
32	July (168807)	fevereiro/07	F	16	X	pos	NR	...	...	neg	Oligo
33	Spock (180610)	março/07	M	30	X	pos	...	...	...	...	Oligo
34	Penélope (180492)	março/07	F	113	ChowChow	pos	...	...	...	neg	Oligo
35	Trovão (181016)	março/07	M	88	Labrador	pos	...	...	...	pos	S
36	Lucky (182290)	março/07	M	37	ChowChow	pos	...	...	...	...	Oligo

(conclusão)

M = macho; F = fêmea; pos = positivo; neg = negativo; CRD = com raça definida; SRD = sem raça definida; Prontº = prontuário número; ELISA = reação imunoenzimática; RIFI = reação de imunofluorescência indireta; NR = não reagente; ... = dado inexistente; (+) = imunomarcacão positiva; STB terrier = Staffordshire Bull Terrier; FB = Fila Brasileiro

ANEXO E - Caracterização de 36 caninos domésticos (assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos) com diagnóstico estabelecido de leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ/USP, segundo a identificação das alterações dermatológicas, sistêmicas e achados laboratoriais. São Paulo - 2007

No.	Nome (Pront.No.)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Alterações laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
01	Sofia (073796)	- úlceras em pavilhões auriculares - hipopigmentação nasal	X		- linfadenomegalia - pirexia - prostração - diarreia - disorexia - ceratite - hepato/esplenomegalia - claudicação	- anemia normocítica normocrômica	S
02	Kety (080966)	- úlcera em focinho, cauda, membros, região periocular e em bordas de pavilhões auriculares		X	- claudicação - convulsão - linfadenomegalia	- hiperproteinemia - hiperfosfataseemia alcalina	S
03	Toddy (061292)	- alopecia e hiperqueratose em articulação úmero-rádio- ulnar - hipopigmentação nasal - crostas em região periocular		X	- prostração - disorexia - corrimento ocular - pirexia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia - proteinúria - trombocitopenia	S
04	Mike (093705)	- hiperqueratose nasal e de articulação úmero-rádio- ulnar - descamação		X	- claudicação - disorexia - dispnéia - pirexia -hepato/esplenomegalia	- trombocitopenia - proteinúria - cristalúria	S

(continua)

No.	Nome (Pront.No.)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Alterações laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
05	Teka (098917)	- pápulas e alopecia em região lombar dorsal e flancos	X		...	...	Oligo
06	Breik (111568)	- descamação - úlceras em coxins e em membros pélvicos		X	- linfadenomegalia - pirexia	- hiperproteinemia	Oligo
07	Scooby (118557)	- hiperqueratose de coxins, de focinho e de bolsa escrotal - descamação - rarefação pilosa em pavilhões auriculares	X		- disorexia - estertores pulmonares - aumento de volume das articulações - pirexia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia - <i>Demodex canis</i>	S
08	Julia (127681)	- descamação - alopecia, eritema e crostas em região periocular	X		- pirexia - claudicação - prostração - disorexia - esplenomegalia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia	S
09	Boris (134395)	- úlcera em focinho		X	- linfadenomegalia - corrimento ocular	- trombocitopenia	Oligo

(continua)

No.	Nome (Pront.No.)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Achados laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
10	Brenda I (134184)	- descamação - eritema e crostas em patas - alopecia periocular		X	- diarreia - astenia dos membros pélvicos - tosse seca / pirexia - corrimento nasal - linfadenomegalia - emagrecimento - hepatomegalia	- hiperfosfataseia alcalina - hiperproteinemia - hipoalbuminemia	S
11	Judy (136804)	- edema, ulceração e hipopigmentação nasal		X	...	- trombocitopenia	Oligo
12	Shiva (138773)	- descamação - alopecia e hiperqueratose de coxins - onicogribose - hipopigmentação nasal - úlcera perilabial - alopecia periocular - edema, eritema e crostas em art. úmero rádio ulnar		X	- emagrecimento - dispnéia - espirros - disorexia - diarreia - corrimento óculo- nasal - pirexia - mucosas hipocoradas - hepatomegalia - linfadenomegalia	- anemia normocítica normocrômica - trombocitopenia - mórulas de <i>Ehrlichia sp</i> no ex. microscópico de esfregaço sanguíneo	S
13	Bob (147154)	- sem alterações		X	...	- trombocitopenia	A

(continua)

No.	Nome (Pront.No.)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Achados laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
14	Bacco (147764)	- eritema e hipopigmentação em espelho nasal; - úlcera em bolsa escrotal;		X	- linfadenomegalia	...	Oligo
15	Lupi (152276)	- descamação - crostas em pavilhões auriculares - eritema em art. úmero rádio ulnar		X	- linfadenomegalia -hepato/esplenomegalia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia	S
16	Lara (145478)	- eritema, pápulas e alopecia em região abdominal ventral - hiperqueratose perilabial	X		...	...	Oligo
17	Tucha (157782)	- crostas e úlceras em região perilabial e nasal		X	- emagrecimento - diarreia - disorexia	...	S
18	Jacó (159287)	- onicogribose - alopecia e crostas melicéricas em membros - edema periocular e perilabial		X	- linfadenomegalia - prostração	- anemia normocítica normocrômica - hiperproteinemia - hipoalbuminemia	Oligo

(continua)

No.	Nome (Pront.No.)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Achados laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
19	Brenda2 (160581)	- onicogrifose - descamação e alopecia em art. úmero-rádio-ulnar e em região perineal		X	-hepato/esplenomegalia - prostração - disorexia - diarreia, êmese - poliúria/polidipsia - emagrecimento - linfadenomegalia - pirexia - uveíte	- hipoalbuminemia - hiperfosfataseia alcalina	S
20	Melvin (129656)	- hiperqueratose, hiperpigmentação e crostas em art. úmero-rádio - ulnar - úlceras em flancos - hiperpigmentação em região abdominal ventral	X		- linfadenomegalia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia - anemia normocítica normocrômica - trombocitopenia	Oligo
21	Buck (165719)	- alopecia e crostas em pavilhões auriculares - úlcera perilabial		X	- claudicação - dispnéia - linfadenomegalia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia	S
22	Yanca (165242)	- descamação - alopecia em pavilhões auriculares		X	- linfadenomegalia	...	Oligo

(continua)

No.	Nome (Pront.No.)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Achados laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
23	Giga (166181)	- alopecia região cervical - fissura em pavilhões auriculares - úlcera em art. úmero rádio ulnar	X		- emagrecimento - disorexia - linfadenomegalia	- anemia normocítica normocrômica	S
24	Branca (166422)	- eritema abdominal ventral - descamação - crostas em pavilhões auriculares - eritema em art. úmero radio ulnar	X		- linfadenomegalia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia - linfopenia	Oligo
25	Theodoro (172388)	- nódulos em região lombar dorsal		X	- emagrecimento - lombalgia - corrimento ocular - linfadenomegalia	- leucocitose com desvio a esquerda -hipertransferasemia - hiperfostasemia alcalina	S
26	Jully (176089)	- alopecia, lignificação, hiperpigmentação e crostas em região perilabial, pavilhões auriculares e patas - descamação	X		- linfadenomegalia - corrimento ocular	...	Oligo

(continua)

No.	Nome (Pront.Nº)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Achados laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
27	Dhuly (177098)	- eritema em região cervical ventral e de pavilhões auriculares - nódulos em região periocular, em membros pélvicos e em base de cauda - pápulas e crostas pelo corpo	X		- tosse seca	...	Oligo
28	Bolota (178604)	- hiperpigmentação abdominal ventral - pápulas e rarefação pilosa generalizada		X	- disorexia - prostração - linfadenomegalia -hepato/esplenomegalia - pirexia	- <i>Demodex canis</i>	S
29	Espirro (167535)	- onicogribose - edema e queratose de art. úmero rádio ulnar		X	- claudicação - disorexia - emagrecimento - prostração - pirexia - linfadenomegalia - aumento articular	- anemia normocítica normocrômica - cristalúria	S
30	Suzy (106608)	- úlcera e crosta em região torácica ventral - crostas em região cervical	X		...	- <i>Demodex canis</i>	Oligo

(continua)

No.	Nome (Pront.Nº)	Alterações dermatológicas	Com prurido	Sem prurido	Alterações Sistêmicas	Achados laboratoriais	Assintomático(A) Oligossintomático(oligo) Sintomático (S)
31	Tuti (179530)	- eritema difuso acentuado em bordas de pavilhões auriculares		X	- linfadenomegalia - pirexia	...	Oligo
32	July (168807)	- eritema e crostas em região perineal, interdígitos e membros torácicos	X		...	...	Oligo
33	Spock (180610)	- descamação - rarefação pilosa de ponte nasal e região lombar dorsal		X	...	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia - anemia normocítica normocrômica	Oligo
34	Penélope (180492)	- alopecia - descamação mais acentuada em região abdominal ventral	X		...	...	Oligo
35	Trovão (181016)	- descamação - rarefação pilosa periocular		X	- emagrecimento - pirexia -hepato/esplenomegalia	- hiperproteinemia - hipoalbuminemia - anemia normocítica normocrômica - trombocitopenia	S
36	Lucky (182290)	- úlceras em espelho nasal e coxins		X	...	...	Oligo

(conclusão)

ANEXO F - Caracterização de caninos domésticos com diagnóstico de leishmaniose visceral, atendidos (1997-2007) nos Serviços de Dermatologia e de Clínica Médica de cães e gatos da FMVZ/USP, segundo a identificação dos locais de origem, de criação e de deslocamentos - São Paulo - 2007

No.	Nome Prontº	Locais de origem	Locais de criação	Locais de deslocamento
01	Sofia (073796)	Uberaba (SnRV)	São Paulo – Capital (Inv)	- Belo Horizonte (Tch)
02	Kety (080966)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	Maranhão (Tch)
03	Toddy (061292)	São Paulo – Capital (Inv)	Parati (Inv)	- São Paulo – Capital (Inv) - Belo Horizonte (Tch)
04	Mike (093705)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	- Araçatuba (Tch) - Ilha Bela (SnRnV)
05	Teka (098917)	Araçatuba (Tch)	Birigui (Tch)	São Paulo – Capital (Inv)
06	Breik (111568)	Portugal (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)	São Roque (SnRV)
07	Scooby (118557)	Araçatuba (Tch)	Embu (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)
08	Julia (127681)	Belo Horizonte (Tch)	São Paulo – Capital (Inv)	...
09	Boris (134395)	São Roque (SnRV)	São Roque (SnRV)	São Paulo – Capital (Inv)
10	Brendal (134184)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	- Embu-Guaçu (SnRV) - Guarujá (SnRnV)
11	Judy (136804)	Ilha Bela (SnRnV)	Ilha Bela (snRnV)	...
12	Shiva (138773)	Holambra (SnRV)	São Paulo – Capital (Inv)	Florianópolis (Inv)
13	Bob (147154)	Araçatuba (Tch)	São Paulo – Capital (Inv)	...

(continua)

No.	Nome Prontº	Locais de origem	Locais de criação	Locais de deslocamento
14	Bacco (147764)	Ubatuba (SnRnV)	Cotia (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)
15	Lupi (152276)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	Santa Catarina (Inv)
16	Lara (145478)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	- Embu (Tc) - Peruíbe (SnRnV)
17	Tucha (157782)	Embu (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)	...
18	Jacó (159287)	Embu (Tc)	Embu (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)
19	Brenda2 (160581)	Bauru (Tch)	São Paulo – Capital (Inv)	...
20	Melvin (129656)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	- Araçatuba (Tch) - Parati (Inv) - Presidente Prudente (Tch)
21	Buck (165719)	Cotia (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)	...
22	Yanca (165242)	Cotia (Tc)	Barueri (SnRV)	...
23	Giga (166181)	Cotia (Tc)	São Paulo – Capital (Inv)	- Embu (Tc) - Itapeverica da Serra (SnRV)
24	Branca (166422)	Cotia (Tc)	Cotia (Tc)	...
25	Theodoro (172388)	Belo Horizonte (Tch)	Belo Horizonte (Tch)	São Paulo – Capital (Inv)
26	Jully (176089)	Campo Limpo Paulista (SnRV)	São Paulo – Capital (Inv)	- Birigui (Tch) - Florianópolis (Inv)

(continua)

No.	Nome Prontº	Locais de origem	Locais de criação	Locais de deslocamento
27	Dhuly (177098)	Sorocaba (SnRV)	São Paulo – Capital (Inv)	- Guarujá (SnRnV) - São Lourenço (SnRV)
28	Bolota (178604)	Mogi das Cruzes (Inv)	Mogi das Cruzes (Inv)	...
29	Espirro (167535)	Embu (Tc)	Embu (Tc)	...
30	Suzy (106608)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	Belo Horizonte (Tch)
31	Tuti (179530)	Embu (Tc)	Embu (Tc)	...
32	July (168807)	São Paulo – Capital (Inv)	Registro (SnRnV)	- Eldorado (SP) (SnRnV) - Umuarama (PR) (Inv)
33	Spock (180610)	Cotia (Tc)	Cotia (Tc)	...
34	Penélope (180492)	Campinas (SnRV)	Osasco (SnRnV)	Caraguatatuba (SnRnV)
35	Trovão (181016)	São Paulo – Capital (Inv)	Carapicuíba (SnRV)	Cotia (Tc)
36	Lucky (182290)	São Paulo – Capital (Inv)	São Paulo – Capital (Inv)	- Embu (Tc) - São Lourenço (MG) (SnRV) - Paraná (Inv)

(conclusão)

Tc = município com transmissão canina

Tch = município com transmissão canina e humana

SnRnV = município silencioso não receptivo não vulnerável

SnRV = município silencioso não receptivo vulnerável

Inv = município em investigação

... = dado inexistente

APÊNDICES

APÊNDICE A

Figura 1 – Canino, Husky Siberiano fêmea, 19 meses, “Sofia”. Leishmaniose visceral – Vasculite leishmaniótica – Lesão alopécica erosiva, eritêmato-crostosa em extremidade de pavilhão auricular. Acervo CE Larsson (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET, 1997)

Figura 2 – Canino, Staffordshire Bull Terrier, fêmea, 39 meses, “Shiva”.
Leishmaniose visceral – Hipopigmentação macular, crosta hemorrágica
na narícula (D). Acervo CE Larsson (Serviço de Dermatologia
VCM/HOVET, 2003)

Figura 3 - Canino, Staffordshire Bull Terrier, fêmea, 39 meses, "Shiva".
Leishmaniose visceral – Onicogrifose (membros torácicos). Acervo CE
Larsson (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET, 2003)

Figura 4 - Canino, Staffordshire Bull Terrier, fêmea, 39 meses, "Shiva".
Leishmaniose visceral – Hiperqueratose marginada em coxins plantares,
onicogrifose. Acervo CE Larsson (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET,
2003)

Figura 5 - Canino, Staffordshire Bull Terrier, fêmea, 39 meses, "Shiva". Leishmaniose visceral – Escamas micáceas, asbesto "simile", encimando eritema auricular (face interna) bilateral. Acervo CE Larsson (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET, 2003)

Figura 6 – Canino, Boxer, fêmea, 16 meses, “Yanca”. Leishmaniose visceral – Pavilhão auricular (E) detalhe de recobrimento (face externa) por escamas de aspecto argênteo. Acervo CE Larsson (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET, 2005)

Figura 7 – Canino, Boxer, fêmea, 16 meses, “Yanca”. Leishmaniose visceral – Pavilhão auricular (D) recoberto por escamas branquicentas. Acervo CE Larsson (Serviço de Dermatologia VCM/HOVET, 2005)

APÊNDICE B

Figura 1. Canino, Husky Siberiano, fêmea, 19 meses, “Sofia”. Leishmaniose visceral – Técnica de imunoistoquímica - fotomicrografia de biópsia biópsia cutânea demonstrando parasitos em infiltrado mononuclear (controle negativo). AO 40x. Acervo MD Laurenti (Laboratório de Investigações Médicas, 2007)

Figura 2. Canino, Husky Siberiano, fêmea, 19 meses, “Sofia”. Leishmaniose visceral –Técnica de imunoistoquímica – fotomicrografia de biópsia biópsia cutânea demonstrando formas amastigotas em infiltrado mononuclear (controle positivo). AO 40x. Acervo MD Laurenti (Laboratório de Investigações Médicas, (2007)