

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Emeline de Oliveira Riboldi**

**Perfil da Leishmaniose Visceral  
Canina na Região Metropolitana de  
Porto Alegre**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre  
2015**

**Emeline de Oliveira Riboldi**

# **Perfil da Leishmaniose Visceral Canina na Região Metropolitana de Porto Alegre**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Eliane Dallegrave  
Co-orientador: Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão.

**Porto Alegre  
2015**

#### Catálogo na Publicação

Riboldi, Emeline

Perfil da Leishmaniose Visceral Canina na Região Metropolitana de Porto Alegre / Emeline Riboldi. -- 2015. 140 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.

Orientador(a): Eliane Dallegrave ; coorientador(a): Pedro Roosevelt Torres Romão.

1. Leishmania. 2. leishmaniose visceral canina. 3. prevalência. 4. teste imunocromatográfico. 5. ELISA. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **Agradecimentos**

Agradeço aos veterinários, funcionários, administradores dos canis e, sobretudo, aos cães. Sem vocês seria possível seguir com o Projeto. Posso dizer que foi uma experiência inesquecível e engrandecedora!

Agradeço à colega Regina Bones Barcellos – todos os resultados foram possíveis graças a tua colaboração e dedicação. Obrigada por acreditar!

Agradeço à Dra. Lúcia Rosseti pela tranquilidade e também ao Biomanguinhos pelo fornecimento dos testes diagnósticos. Sem isso, nenhum resultado seria possível.

Agradeço à Dra. Rosemari Teresinha de Oliveira pela disponibilidade e, sobretudo, pelo empenho.

Por último e não menos importante: agradeço aos meus orientadores – Dra. Eliane Dallegrave e Dr. Pedro Roosvelt Torres Romão – e também à Dra. Jenifer Saffi. Muito obrigada pela compreensão e paciência!

“O que nos coloca em problemas não é aquilo que não sabemos. É o que sabemos com certeza, e simplesmente está errado” (Mark Twain).

## Sumário

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução.....</b>  | <b>14</b> |
| 1.1      | Revisão de literatura .....                                   | 16        |
| 1.1.1    | Agente etiológico.....  | 16        |
| 1.1.2    | Vetor.....  | 17        |
| 1.1.3    | Ciclo de vida.....  | 20        |
| 1.1.4    | Patogenia.....  | 21        |
| 1.1.5    | Transmissão.....  | 24        |
| 1.1.6    | Reservatórios.....  | 26        |
| 1.1.7    | Imunidade.....  | 30        |
|          | 1.1.7.1 Resposta imune inata.....                             | 31        |
|          | 1.1.7.2 Resposta imune adaptativa.....                        | 31        |
| 1.1.8    | Sinais Clínicos.....  | 34        |
| 1.1.9    | Diagnóstico.....  | 38        |
| 1.1.10   | Legislação Brasileira.....                                    | 44        |
| 1.1.11   | Urbanização.....  | 47        |
| 1.1.12   | Epidemiologia.....  | 50        |
| 1.1.13   | Profilaxia.....   | 52        |
| 1.2      | Justificativa.....  | 59        |
| 1.3      | Materiais e métodos.....                                      | 59        |
| 1.3.1    | Aspectos éticos.....  | 59        |
| 1.3.2    | Área de abrangência.....                                      | 60        |
| 1.3.3    | População de estudo.....                                      | 61        |
| 1.3.4    | Coletas de dados e amostras sanguíneas para sorologia.....    | 62        |
| 1.3.5    | Diagnóstico diferencial.....                                  | 63        |
| 1.3.6    | Teste Imunocromatográfico "Dual-Path Platform" (TR DPP®)..... | 63        |
| 1.3.7    | Teste Imunoenzimático (ELISA EIE®).....                       | 65        |
| 1.3.8    | Citologia.....  | 67        |
| 1.3.9    | Cultura "in vitro".....                                       | 67        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 1.3.10   | Teste Imunoenzimático (SNAP 4Dx Plus®).....                              | 68         |
| 1.3.11   | Análise estatística.....   | 69         |
| 1.4      | Resultados.....  | 70         |
| 1.4.1    | Caracterização da população.....   | 70         |
| 1.4.2    | Teste Imunocromatográfico (TR DPP®).....                                 | 71         |
| 1.4.3    | Teste imunoenzimático (ELISA EIE®).....                                  | 71         |
| 1.4.4    | Citologia.....   | 72         |
| 1.4.5    | Cultura "in vitro".....  | 72         |
| 1.4.6    | Teste imunoenzimático para diagnóstico diferencial (SNAP 4Dx Plus®)..... | 72         |
| 1.4.7    | Avaliação dos métodos diagnósticos.....                                  | 73         |
| 1.5      | Discussão.....   | 74         |
| 1.6      | Conclusão.....   | 81         |
| 1.7      | Referências.....   | 82         |
| <b>2</b> | <b>Objetivos.....</b>  | <b>95</b>  |
| 2.1      | Objetivo geral.....  | 95         |
| 2.2      | Objetivos específicos.....   | 95         |
| <b>3</b> | <b>Artigo científico redigido em inglês.....</b>                         | <b>96</b>  |
| <b>4</b> | <b>Tabelas.....</b>  | <b>127</b> |
| <b>5</b> | <b>Considerações finais.....</b>   | <b>135</b> |
|          | <b>APÊNDICE A.....</b>   | <b>136</b> |
|          | <b>APÊNDICE B.....</b>   | <b>138</b> |
|          | <b>APÊNDICE C.....</b>   | <b>139</b> |

## Lista de ilustrações

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 –  | Formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> .....                            | 16 |
| Figura 2 –  | Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....   | 17 |
| Figura 3 –  | Exemplar de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....  | 18 |
| Figura 4 –  | Diagrama do ciclo de transmissão da Leishmaniose Visceral Canina.....                   | 23 |
| Figura 5 –  | Situação da Leishmaniose Visceral Canina no estado do Rio Grande do Sul (Jan/2010)..... | 51 |
| Figura 6 –  | Municípios integrantes da região metropolitana de Porto Alegre.....                     | 60 |
| Figura 7 –  | Visão interna do teste TR DPP®.....   | 63 |
| Figura 8 –  | Exemplo de resultado positivo no TR DPP®.....   | 64 |
| Figura 9 –  | Exemplo de resultado negativo no TR DPP®.....   | 64 |
| Figura 10 – | Resultado do teste ELISA EIE®.....  | 66 |
| Figura 11 – | Leitura do SNAP 4Dx Plus®.....  | 68 |
| Figura 12 – | Resultado positivo para <i>Anaplasma</i> spp. – SNAP 4Dx Plus®                          | 72 |

**Lista de tabelas**

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1 – Municípios integrantes da região metropolitana de Porto Alegre e informações de acordo com o último censo.....  | 127 |
| Tabela 2 – Caracterização dos cães por município estudado.....   | 128 |
| Tabela 3 – Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina por município e região avaliada de cães da região metropolitana de Porto Alegre no teste imunocromatográfico.....   | 129 |
| Tabela 4 – Distribuição das amostras nos testes imunocromatográfico e imunoenzimático (testadas e retestadas) de cães da região metropolitana de Porto Alegre.....   | 130 |
| Tabela 5 – Soroprevalência da Leishmaniose Visceral Canina na região e por município de acordo com o teste imunoenzimático avaliados em diferentes matrizes de cães da região metropolitana de Porto Alegre..... | 131 |
| Tabela 6 – Distribuição de amostras reagentes no teste diferencial SNAP 4Dx Plus® em relação aos testes sorológicos de amostras de cães da região metropolitana de Porto Alegre.....                             | 132 |
| Tabela 7 – Comparação entre os resultados dos testes sorológicos de amostras de cães da região metropolitana de Porto Alegre.....  | 133 |
| Tabela 8 – Comparação entre os resultados dos testes sorológicos nas matrizes soro e plasma de amostras de cães da região metropolitana de Porto Alegre.....   | 134 |

**Lista de abreviaturas e siglas**

|             |  |
|-------------|--|
| ALT:        | alanina aminotransferase   |
| ANVISA:     | Agência Nacional de Vigilância Sanitária   |
| BAAF:       | biópsia por aspiração com agulha fina  |
| C:          | controle   |
| CD4:        | co-receptor para ativação de célula T restrita a MHC de classe II, marcador de diferenciação tímica presente em células T auxiliares (linfócito T CD4) |
| CDCT/FEPPS: | Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde   |
| CEVS/RS     | Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul  |
| CEUA:       | Comitê de Ética no Uso de Animais  |
| Cfa         | clima temperado úmido com verão quente   |
| cm:         | centímetro   |
| CO          | <i>cut off</i>   |
| DALY:       | <i>Disability Adjusted Life Years</i>  |
| DAPE:       | dermatite alérgica por picada de ectoparasita  |
| DAT:        | teste de aglutinação em gota   |
| DDT:        | diclorodifeniltricloroetano  |
| DPP:        | <i>Dual-Path Platform</i>  |
| DO:         | densidade ótica  |
| EDTA:       | ácido etilenodiamino tetra-acético   |
| ELISA:      | ensaio imunoabsorvente ligado à enzima   |
| FA:         | fosfatase alcalina   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| HCH:                           | hexaclorociclohexano  |
| HIV:                           | vírus da imunodeficiência humana  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | peróxido de hidrogênio  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | ácido sulfúrico   |
| IA:                            | índice de avidéz  |
| IBGE:                          | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                                 |
| ICNZ                           | Código Internacional de Nomenclatura Zoológica                                  |
| IFN- $\gamma$ :                | interferon gama   |
| IgG:                           | imunoglobulina G  |
| IgM                            | imunoglobulina M  |
| IL:                            | interleucina  |
| km                             | quilômetro  |
| <i>L. chagasi:</i>             | <i>Leishmania chagasi</i>   |
| <i>L. donovani</i>             | <i>Leishmania donovani</i>  |
| <i>L. infantum</i>             | <i>Leishmania infantum</i>  |
| LEE-USP-SP:                    | Laboratório de Epidemiologia e Estatística da Universidade Federal de São Paulo |
| LPG                            | lipofosfoglicano  |
| LTA:                           | leishmaniose tegumentar americana   |
| LV:                            | leishmaniose visceral   |
| LVC:                           | leishmaniose visceral canina  |
| LVH:                           | leishmaniose visceral humana  |
| M199:                          | meio de cultura 199   |
| MAPA:                          | Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento                              |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| mg.i.a/m <sup>2</sup> :      | miligrama por índice de área/ metro quadrado               |
| MHC II:                      | complexo principal de histocompatibilidade classe II       |
| ml:                          | mililitro  |
| mm:                          | milímetro  |
| mm/ano                       | milímetros ao ano  |
| m/s:                         | metro/segundo  |
| MS:                          | Ministério da Saúde  |
| nm:                          | nanômetro  |
| NO                           | óxido nítrico  |
| nPCR                         | <i>nested</i> PCR  |
| N-RAMPI:                     | <i>solute carrier Family 11 member a1</i> – Slc11c1        |
| OMS:                         | Organização Mundial Saúde                                  |
| OPAS                         | Organização Pan-Americana de Saúde                         |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | ânion superóxido   |
| PBCLV:                       | Programa Brasileiro para Controle da Leishmaniose Visceral |
| PCR:                         | reação de polimerase em cadeia                             |
| PM:                          | pó molhável  |
| RDC                          | Resolução da Diretoria Colegiada                           |
| RFC:                         | reação de fixação de complemento                           |
| RIFI:                        | reação de imunofluorescência indireta                      |
| rk39:                        | antígeno recombinante k39                                  |
| RMPA:                        | região metropolitana de Porto Alegre                       |
| RNS:                         | espécies reativas de nitrogênio                            |
| ROS:                         | espécies reativas de oxigênio                              |

|                 |   |
|-----------------|---|
| rpm:            | rotações por minuto                                       |
| RPMI:           | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                    |
| RRP             | receptor de reconhecimento de padrão                      |
| SC:             | suspensão concentrada                                     |
| SDPF            | sangue dessecado em papel filtro                          |
| SFM             | sistema fagocítico mononuclear                            |
| SNC:            | sistema nervoso central                                   |
| <i>strips</i> : | cavidades de microplacas                                  |
| T:              | teste   |
| TCLE:           | termo de consentimento livre e esclarecido                |
| TGF- $\beta$ :  | fator de transformação de crescimento beta                |
| Th1:            | subpopulação de linfócitos T CD4+ do padrão T auxiliar 1  |
| Th2:            | subpopulação de linfócitos T CD4+ do padrão T auxiliar 2  |
| Th17            | subpopulação de linfócitos T CD4+ do padrão T auxiliar 17 |
| TNF- $\alpha$ : | fator de necrose tumoral alfa                             |
| TMB:            | tetrametilbenzidina                                       |
| T reg           | células T reguladoras                                     |
| TVT:            | tumor venéreo transmissível                               |
| U/mL            | unidade por mililitro                                     |
| UFCSPA:         | Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre |
| $\mu$ g/mL      | micrograma por mililitro                                  |
| $\mu$ m:        | micrômetro  |

**Lista de símbolos**

|     |                  |
|-----|------------------|
| %   | por cento        |
| °C  | graus Celsius    |
| °GL | grau Gay Lussac  |
| °   | graus            |
| ®   | marca registrada |

## Resumo

A leishmaniose visceral é uma das principais doenças negligenciadas, sendo causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos. O Brasil é responsável por 90% dos casos registrados nas Américas e, atualmente, a doença está em expansão e urbanização, em especial para áreas consideradas anteriormente indenes, a exemplo do Rio Grande do Sul, sendo o cão (*Canis familiaris*) considerado o principal reservatório doméstico. O presente estudo objetivou definir o perfil e avaliar a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) na região metropolitana de Porto Alegre (RMPA) a partir de ensaios imunocromatográfico (TR DPP®) e imunoenzimático (ELISA EIE®). Foram coletadas e processadas 405 amostras sanguíneas de cães dos municípios de Canoas (n=107), São Leopoldo (n=216) e Novo Hamburgo (n=82). Os critérios de exclusão foram cães filhotes, com comportamento agressivo e imunizados contra a LVC. Os cães incluídos no estudo foram caracterizados quanto ao sexo, tipo de pelagem, viabilidade reprodutiva e manifestações clínicas, sendo a maioria composta por fêmeas, cães esterilizados, pelagem curta e assintomáticos. Na imunocromatografia (triagem) a prevalência entre os municípios estudados foi de 2,96%. No ensaio imunoenzimático (confirmatório), a prevalência da região estudada variou entre 1,23% (plasma) e 0,98% (soro) e dentre aquelas amostras consideradas indeterminadas (fora do ponto de corte) foi de 1,48% (plasma) e 0,98% (soro). Não se encontrou concordância entre os métodos diagnósticos ( $\kappa=-0,364$ ), apesar desta ter sido considerada substancial, quando comparadas as amostras de soro e plasma ( $\kappa=0,571$ ). As amostras consideradas reagentes ou indeterminadas para LVC foram testadas para diagnóstico diferencial pelo SNAP 4Dx Plus®, sendo 23,80% reagentes para *Anaplasma* spp., não descartando reação cruzada ou coinfeção. Desse modo, conclui-se que a prevalência da LVC na RMPA variou de 1% a 3% conforme os testes empregados, ELISA EIE® e TR DPP®, respectivamente, em cães com perfil assintomático.

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose visceral canina, cães, prevalência, teste imunocromatográfico, ELISA.

## Abstract

Visceral leishmaniasis is one of the world's most neglected diseases. It is caused by protozoan from *Leishmania* genus and transmitted by the bite of female sandflies. Ninety percent of cases registered in America occur in Brazil and the disease is currently growing and becoming urbanized, especially in areas previously considered indene, such as Rio Grande do Sul state. The dog (*Canis familiaris*) is considered the main domestic reservoir. This study aimed at profiling the disease and evaluating the prevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL) in the metropolitan area of Porto Alegre (MAPA) using immunochromatographic (TR DPP<sup>®</sup>) and enzyme-linked immunosorbent (ELISA EIE<sup>®</sup>) assays. Four hundred and five blood samples were collected and processed from dogs from the municipalities of Canoas (n=107), São Leopoldo (n=216) and Novo Hamburgo (n=82). The exclusion criteria covered puppies, aggressive dogs and those immunized against CVL. Dogs included in this study were characterized according to sex, coat type, reproductive capabilities, and clinical manifestations. Most of them were females, neutered, with shorter-length fur and no symptoms. A prevalence of 2,96% was found in the studied municipalities through immunochromatographic assay. Enzyme-linked immunosorbent assay pointed to a prevalence between 1,23% (plasma) and 0,98% (serum). Among undetermined samples (outside cut off), prevalence was of 1,48% (plasma) and 0,98% (serum). A correlation between diagnostic methods could not be found by using Kappa's coefficient ( $k=-0,364$ ), although a substantial correlation could be identified when comparing matrices from serum and plasma samples ( $k=0,571$ ). Among reactive or undetermined samples for CVL, 23,80% were also reactive for *Anaplasma* spp. in a differential diagnostic test (SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup>). Those results do not allow us to discard false-positives CVL individuals (cross reacted) or even coinfection. Considering the results presented, our study found that the prevalence of CVL in MAPA was around 1% in the enzyme immunoassay and around 3% in the immunoassay test. These findings corroborate the difficulty of diagnostic accuracy, especially in areas whose profile involved is the asymptomatic dogs.

**Keywords:** *Leishmania*, canine visceral leishmaniasis, prevalence, dogs, immunochromatographic test, ELISA.

## 1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida pelo nome de calazar (“kala-azar”), é uma doença transmitida por vetor e de importância mundial (Andrade e cols., 2007, Krauspenhar e cols., 2007). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), ela está entre as seis doenças mais importantes causadas por protozoários (Thomaz-Soccol e cols., 2009) e classificada na categoria 01 – doença emergente e não controlada (Murray e cols., 2005).

Dentre as enfermidades tropicais, é a segunda em mortalidade e a quarta em morbidade (Kedzierski e Evans, 2014). De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a LV está inserida no grupo 3 – doença de difícil controle com as ferramentas disponíveis (OPAS, 2009).

Quando zoonose, ela envolve o cão (*Canis familiaris*) como reservatório; quando antroponose ou antroponose tem o homem como principal envolvido no ciclo de transmissão (Monteiro e cols., 2005). Se não tratada, a LV pode levar ao óbito 95% dos doentes (Maia-Elkhoury e cols., 2008), especialmente aqueles imunodeprimidos (Alves e Bevilacqua, 2004, Harhay e cols., 2011).

Está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, América Central e do Sul (Gomes e cols., 2008), sendo o Brasil, responsável por 90% dos casos registrados nas Américas. (Albuquerque e cols., 2009). Importante ressaltar que a Oceania e a Antártica não possuem casos relatados da doença (Dantas-Torres e cols., 2012, Griensven e Diro, 2012).

No Brasil, o primeiro caso reportado de LV foi no Mato Grosso, em 1913. Contudo, somente em 1934 foram diagnosticados, através de necropsia, novos casos em pacientes nordestinos cuja suspeita era febre amarela. Epidemiologicamente, até a década de 1950, haviam sido notificados 379 casos da LV no país (Maia-Elkhoury e cols., 2008), a qual era considerada predominantemente rural e silvestre, atingindo humanos e cães que viviam nessas áreas. Posteriormente, ela foi caracterizada como endêmica, com surtos epidêmicos ocasionais, principalmente em áreas rurais do Nordeste (Alves e Bevilacqua, 2004).

A doença em cães foi descrita, pela primeira vez, por Nicolle e Comte (1908 apud SOLANO-GALLEGO e cols., 2009) no início do século XX na Tunísia. Desde então, é continuamente estudada a fim de melhorar o conhecimento sobre essa infecção. Apesar da LV ser conhecida desde o século passado, ainda existem controvérsias sobre a origem do parasito e nomenclatura do agente etiológico.

De modo geral, a forma visceral da doença está associada à infecção por parasitos do subgênero *Leishmania* agrupados no complexo fenotípico *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* [*Leishmania* (*L.*) *donovani*, *Leishmania* (*L.*) *infantum*, *Leishmania* (*L.*) *chagasi*]. Alguns pesquisadores acreditam que a *L. chagasi* – descoberta em 1913 no Brasil por Chagas e Cunha - seja o mesmo agente etiológico da *L. infantum*, introduzida na América do Sul através dos cães de imigrantes europeus quando da colonização portuguesa e espanhola (Solano-Gallego e cols., 2009). Contudo, outros creem que a *L. chagasi* já estava presente nas Américas antes da colonização europeia (Dantas-Torres, 2006) e, por isso, trata-se do mesmo agente etiológico. Baseado na primeira hipótese acredita-se que o estabelecimento do protozoário no Novo Mundo foi facilitado pela distribuição e adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* (Dantas-Torres e cols., 2012). Segundo Harhay e cols. (2011) essa ideia favoreceria o argumento de que o controle da leishmaniose visceral canina (LVC) pode ser feito através da eutanásia.

Relativo à nomenclatura, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ), deve-se usar o primeiro nome *L. infantum*, porém, para fins didáticos, se aceita também a utilização da nomenclatura *L. chagasi*, quando se refere ao parasito isolado das Américas.

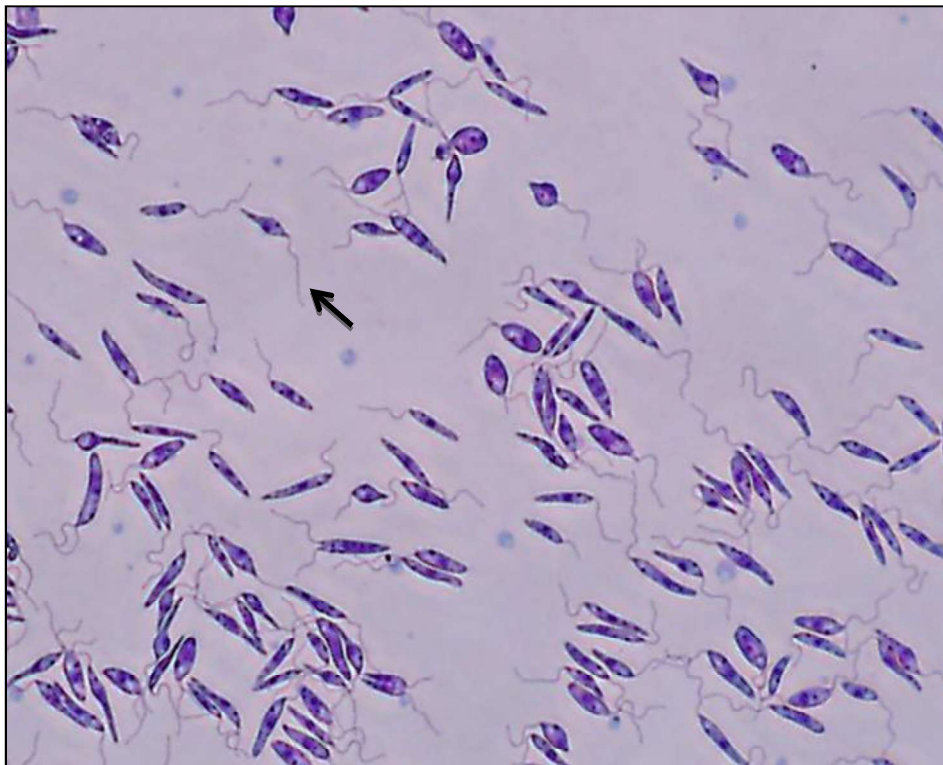
Atualmente, essa enfermidade sofre um processo de transição epidemiológica - aumento da incidência nas áreas endêmicas, urbanização da doença e expansão geográfica para o Sul do país (Gama e cols., 1998; Savani e cols., 2003; Alves e Bevilacqua, 2004; Andrade e cols., 2007). Desse modo, pode-se inferir que novos desafios na área de diagnóstico e vigilância epidemiológica são inerentes à situação corrente da doença (Sundar e Rai, 2002).

## 1.1 Revisão de literatura

### 1.1.1 Agente Etiológico

O protozoário *L. infantum* é um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose visceral canina (LVC) e humana (LVH) (Rosypal e cols., 2003). A *Leishmania* spp. é um parasito difásico, pois completa seu ciclo de vida em dois hospedeiros distintos: flebotomíneo e mamífero, os quais albergam, respectivamente, a forma promastigota<sup>1</sup> (flagelada e extracelular) (Figura 1) e amastigota<sup>2</sup> (intracelular) (Figura 2) (Solano-Gallego e cols., 2009).

Figura 1 – Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*



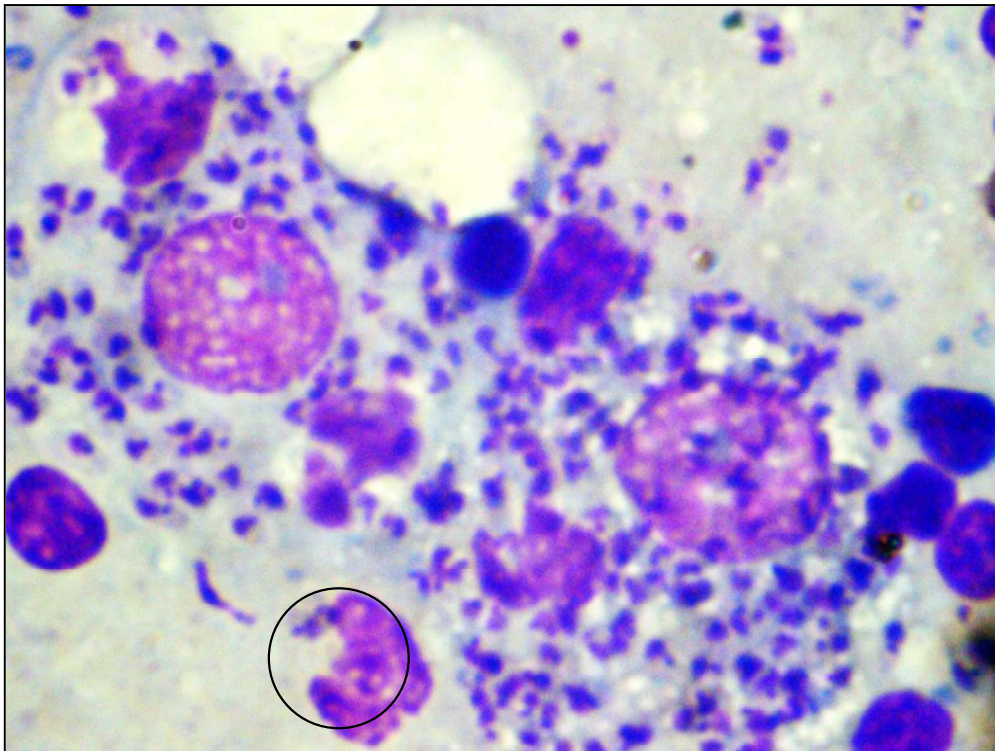
Fonte: cortesia do Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão.

---

<sup>1</sup> Promastigota: forma alongada e extracelular, com flagelo anterior, núcleo único e cinetoplasto. Tamanho entre 15 e 30µm de diâmetro e divisão por fissão binária longitudinal.

<sup>2</sup> Amastigota: forma ovalada e intracelular, com flagelo rudimentar, núcleo único e cinetoplasto. Tamanho entre 2,5 a 6,8µm de diâmetro e divisão por fissão binária.

Figura 2 - Formas amastigotas de *Leishmania* sp..



Fonte: cortesia da Médica Veterinária Rosemari de Oliveira.

### 1.1.2 Vetor

O agente etiológico da LV é transmitido por um flebotomíneo (Figura 3) pertencente à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomya*, estando dividido em 25 subgêneros. Medem em torno de 0,5 centímetros (cm), voam alto, mantendo as asas (cujo formato assemelha-se a ponta de lança) eretas mesmo em repouso (Camargo e Barcinski, 2003). Possuem corpo e asas recobertos por pilosidades, além de pernas e antenas longas. A cor varia do amarelo ao marrom-escuro com várias tonalidades nas regiões do corpo (Marcondes, 2011).

É conhecido popularmente pelos nomes de arrupio, arrupiado, arrepiado, asa-dura, asa-branca, cangalha, cangalhinha, birigui, tatuquira, ligeirinho, péla-égua, mosquito-palha, tatuquira ou freboi (Gama e cols., 1998, Oliveira e Araújo, 2003, Marcondes, 2011, Camargo e Barcinski, 2003). Ele se adapta facilmente ao meio, especialmente em áreas depauperadas (Monteiro e cols., 2005, Costa e cols., 2007, Maia-Elkhoury e cols., 2008) – o acúmulo de lixo, a

presença de criadouros e abrigos de animais são fatores favoráveis para o seu desenvolvimento, assim como áreas de rios e matas (Gama e cols., 1998).

Figura 3 – Exemplar de *Lutzomya longipalpis*



Fonte: Manual de Leishmaniose Visceral (MS, 2006).

O *Lutzomya* sp. possui hábito alimentar diversificado (seiva de plantas, néctar, secreção de afídeos e frutas maduras) e as fêmeas necessitam de sangue para ovoposição e, por conseguinte, completar seu ciclo de vida (Dias e cols., 2003, Costa, 2008). Existem plantas, a exemplo da *Acacia podalyriifolia*, que são atrativas para os flebotomíneos e os protegem contra predadores, fato esse que poderia explicar sua proliferação em áreas onde haja abundância desse tipo de vegetação, bem como encurtar o período de incubação extrínseco<sup>3</sup> (Costa, 2008). A ingestão de carboidratos é importante para o desenvolvimento da *Leishmania* spp. no tubo digestivo do flebótomo, (Marcondes, 2011).

---

<sup>3</sup> Período de tempo entre o mosquito estar infectado e se tornar infectivo.

No cão, o flebotomíneo tem preferência em picar áreas pouco pilosas como cabeça, ponte nasal (focinho), pavilhão auricular e áreas inguinais e perineais (Solano-Gallego e cols., 2009). Importante ressaltar o caráter oportunista na alimentação dessa espécie, pois podem sugar uma grande variedade de vertebrados (Dias e cols., 2003).

No Brasil, encontra-se, principalmente, o *Lutzomya longipalpis*, o qual tem um papel importante na epidemiologia da doença e ampla distribuição no país, embora *Lutzomya cruzi* também tenha sido identificado no Mato Grosso (Maia-Elkhoury e cols., 2008). Estudos em áreas endêmicas onde não foram encontrados *Lutzomya longipalpis*, sugerem o envolvimento de *Lutzomya migonei* e *Lutzomya firmatoi*, os quais apresentam grau de parentesco no grupo parafilético, na transmissão da LV (Souza e cols., 2003), além do *Lutzomya evansi* e *Lutzomya forattinii* (Costa e cols., 2013).

Travi e cols. (2002) avaliando a infectividade de algumas espécies de *Lutzomya* sp. em áreas indenes colombianas, a partir de cães sintomáticos e oligossintomáticos, concluíram que apesar do *Lutzomya youngi* possuir uma taxa de infecção superior a *Lutzomya longipalpis* e *Lutzomya evansi*, a intensidade de infecção indicou uma baixa permissividade para o desenvolvimento de *L. infantum* nesse vetor. Além disso, alguns vetores transmitem exclusivamente uma única espécie de *Leishmania* sp., enquanto outros podem transmitir múltiplas espécies (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Em estudo conduzido por Maia e cols. (2011), o número de promastigotas inoculadas por mosquito estaria entre 4,0 e  $4,19 \times 10^4$  parasitos. Além disso, o *Lutzomya longipalpis* demonstrou maior intensidade de infecção para a cepa viscerotrópica (IMT373), quando comparada com a dermatrópica (CUK3). Fêmeas infectadas e transmissoras da CUK3 demoraram 1,5 e 1,8 vezes mais tempo para concluir a digestão do sangue quando comparadas, respectivamente, com outras infectadas, não transmissoras e não infectadas.

### 1.1.3 Ciclo de Vida

Os ovos do *Lutzomya* sp. são inicialmente claros e escurecem após algumas horas, possuindo formato elíptico e comprimento entre 300 e 500 milímetros (mm). A ovoposição é realizada três a oito dias após a hematofagia (Marcondes, 2011) em ambiente terrestre úmido, rico em matéria orgânica e baixa luminosidade (Camargo e Barcinski, 2003), a exemplo de raízes e buracos de árvores, fendas e rachaduras, tocas de animais em decomposição, folhagens e solo úmido em áreas sombreadas (Otranto e Dantas-Torres, 2013). Importante salientar que a fêmea volta a procurar nova fonte de sangue após depositar os ovos (Marcondes, 2011).

A eclosão ocorre entre o 7º e 10º dia (Killick-Kendrick, 1999), passando por quatro fases, as quais têm duração entre 20 e 30 dias cada. As larvas são claras e vermiformes, possuem mandíbulas robustas, cápsula cefálica escura e esclerotizada. A cabeça e todos os segmentos do corpo possuem cerdas de extremidade dilatada cuja aparência é similar a um palito de fósforo. Comem detritos de animais e vegetais e se locomovem muito nos abrigos (Marcondes, 2011). Na última fase, a larva se fixa ao substrato, perde a cutícula e se transforma em pupa. O inseto adulto emerge entre 7 e 14 dias (Camargo e Barcinski, 2003). Em suma, são necessários 30 a 40 dias para o desenvolvimento do ovo em forma adulta, tempo esse, que pode variar de acordo com a temperatura, sendo a expectativa de vida do flebotomíneo estimada em 20 dias (Rio Grande do Sul, 2011). São produzidas ao ano, em média, 3 a 4 gerações (Camargo e Barcinski, 2003).

#### 1.1.4 Patogenia

A fêmea flebótoma ao fazer o repasto sanguíneo – pois necessita de sangue para maturar o aparelho reprodutor e fazer a ovoposição – é infectada ao ingerir formas amastigotas do hospedeiro contaminado (Rosypal e cols., 2003). Como a água constitui 80% do sangue sugado, a maior parte dela é logo eliminada para reduzir o volume e não atrapalhar a ação enzimática (Marcondes, 2011).

No interior do sistema digestório, o sangue ingerido é revestido pela matriz peritrófica tipo I por alguns dias, cuja função é impedir o dano e a oclusão das microvilosidades pelo sangue aglomerado e, desse modo, melhorar a ação das enzimas digestivas. Além disso, ela protege contra patógenos, pois restringe sua dispersão e o sequestro do ferro proveniente da hemoglobina (Myskova e cols., 2007, Marcondes, 2011). Por conseguinte, ocorre o desenvolvimento de formas promastigotas procíclicas flageladas as quais se multiplicam por divisão binária. Em seguida, a matriz rompe e as formas promastigotas são liberadas, sendo então denominadas de promastigotas nectomônadas. (Myskova e cols., 2007). As formas promastigotas nectomônadas aderem ao intestino médio através da inserção dos flagelos entre as microvilosidades, sendo então chamadas de leptômonadas (Myskova e cols., 2007), pois a capacidade do vetor se tornar infectante dependerá da habilidade das formas promastigotas se ligarem a ligantes específicos no intestino (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Essa adesão é controlada por modificações espécie-específicas de um glicoconjugado de superfície denominado lipofosfoglicano (LPG) e das galectinas do tubo digestivo, o qual impede que a *Leishmania* spp. seja expulsa do vetor e permite, também, o desenvolvimento do protozoário e a transmissão aos vertebrados (Marcondes, 2011). Quando isso não ocorre, os parasitos são excretados via fezes (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Ao final, ocorre a migração para o hipostoma, a diferenciação em formas metacíclicas e a inoculação dessas no reservatório quando da próxima picada (Rosypal e cols., 2003). Todavia, a competência do vetor depende da duração

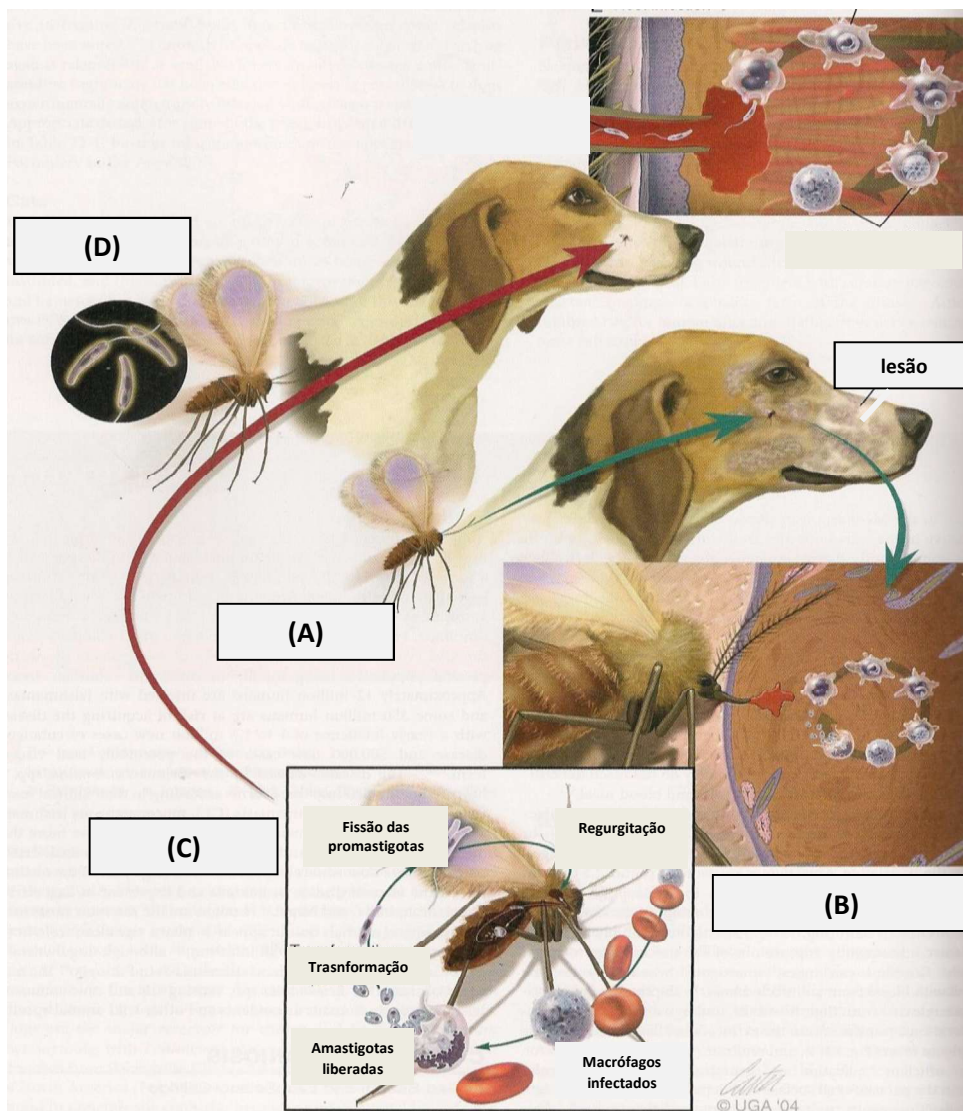
do período extrínseco de incubação, ou seja, o tempo necessário para as formas promastigotas ascenderem até a probóscida e, conseqüentemente, o flebotomíneo se tornar apto a transmitir o agente (Costa, 2008). De acordo com Marcondes (2011), a saliva do *Lutzomya longipalpis* contém um peptídeo chamado maxadilan, que atua como vasodilatador, inibe a ativação de macrófagos e influencia na visceralização do parasito.

No reservatório (Figura 4), as formas promastigotas inoculadas são englobadas pelos macrófagos e outros fagócitos, os quais tentam eliminar o parasito através da produção de espécies reativas derivadas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e nitrogênio (RNS), como óxido nítrico (NO) e descargas de hidrolases lisossomais (Solano-Gallego e cols., 2009). Dessa maneira, ocorre a perda do flagelo e a transformação para a forma amastigota, que irá se dividir por fissão binária até o rompimento das células infectadas.

Por conseguinte, novas células são infectadas, ocorrendo a expansão da infecção para a pele e outros tecidos, através da migração das células infectadas ou das formas amastigotas no sistema vascular (Rosypal e cols., 2003) – vasos linfáticos ou sanguíneos (Queiroz e cols., 2011). Importante ressaltar que o vetor se alimenta uma única vez do reservatório (Coutinho e Linardi, 2007), além de não existirem estudos conclusivos sobre reinfecção em cães (Solano-Gallego e cols., 2009).

**Os principais órgãos acometidos são aqueles pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear (SFM) (Alves e cols., 2010) como fígado, baço, rins, pele, medula óssea, trato gastrointestinal e linfonodos (Alves e cols., 2010, Rio Grande do Sul, 2011). No entanto, coração e pulmão também podem ser acometidos, embora haja poucos relatos envolvendo alterações clínicas e patológicas envolvendo esses órgãos, visto a necessidade de avaliação histopatológica para confirmação (Alves e cols., 2010).**

Figura 4 – Diagrama do ciclo da Leishmaniose Visceral Canina



O vetor não infectado (A) se alimenta de sangue do hospedeiro infectado e (B) ingere macrófagos infectados (C) que liberam as formas amastigotas no intestino do vetor, as quais se diferenciam nas formas promastigotas; (D) durante o repasto sanguíneo, o vetor regurgita essas formas infectantes no novo hospedeiro, dando início a um novo ciclo.

Fonte: adaptado de Baneth e Solano-Gallego (2012).

Em virtude da possibilidade do agente etiológico estar distribuído de forma uniforme na derme de cães infectados e ser o local de interação entre vetor e hospedeiro, a pele seria um órgão de escolha para testes diagnósticos (Madeira e cols., 2009), pois apresenta formas amastigotas tanto no epitélio lesionado como na pele intacta, especialmente em cães oligossintomáticos e sintomáticos (Queiroz e cols., 2011). Contudo, Laurenti e cols. (2013) afirmam que o parasitismo cutâneo não é essencial para ocorrer a transmissão do protozoário ao vetor.

#### 1.1.5 Transmissão

Embora a transmissão natural da LV ocorra através da picada do flebotomíneo fêmea *Lutzomya* sp., outros mecanismos podem estar envolvidos, em especial nas regiões onde existem casos da doença, mas ausência do vetor; ou quando há alta prevalência canina e baixas taxas da doença em humanos. São exemplos disso, o envolvimento de ectoparasitas a exemplo de pulga (Coutinho e Linardi, 2007, Ferreira e cols., 2009, Paz e cols., 2010) e carrapato (Coutinho e cols., 2005, Paz e cols., 2010), e a transmissão venérea ou transplacentária (Silva e cols., 2008).

Dentre os ectoparasitos envolvidos, *Ctenocephalides felis felis* é a subespécie de pulga predominante nos cães (Coutinho e Linardi, 2007, Ferreira e cols., 2009, Paz e cols., 2010). Ela é hematófaga, afeta a saúde e o bem-estar do hospedeiro em virtude de sua voracidade e também, pelo fato de se alimentar frequentemente. Os cães com o intuito de se libertar do desconforto ocasionado por esses artrópodos, tentam removê-los com os dentes e, conseqüentemente, acabam ingerindo o parasito, o qual pode estar contaminado com *L. infantum* (Coutinho e Linardi, 2007).

Carrapatos são parasitos hematófagos e vetores de inúmeros patógenos de vertebrados. Além disso, estão amplamente distribuídos, possuem altas taxas reprodutivas e de longevidade, além da capacidade em manter alta densidade populacional (Coutinho e cols., 2005). O *Rhipicephalus sanguineus*, espécie de carrapato comumente encontrada no Brasil, tem preferência tanto

por hospedeiros domésticos como pelos silvestres. O cão pode se infectar pela picada ou mesmo através do hábito de ingerir o parasito através do *grooming* ou lambedura, de modo a engolir o conteúdo intestinal do parasito (Coutinho e cols., 2005). Em um estudo de caso-controle a probabilidade de um cão ser soropositivo para LVC em área endêmica foi 53% e 300% maior na presença de carrapato e pulga, respectivamente (Paz e cols., 2013).

Com relação à transmissão venérea, Diaz e cols. (1992 apud SILVA e cols., 2008) descreveram lesões no epidídimo e nos testículos de cães, sendo que Catone e cols. (2003 apud SILVA e cols., 2008) relataram formas amastigotas na glândula de um canino portador de tumor venéreo transmissível (TVT). Diniz e cols. (2005) relataram que cães soropositivos sintomáticos estão propensos ao desenvolvimento de orquite. Estudos recentes demonstraram que cães portadores de LV apresentaram lesões no epidídimo, glândula e prepúcio, e alterações no sêmen, o que reforça a hipótese de transmissão da LV através do coito (Silva e cols., 2008). Nesse mesmo âmbito, Silva (2007) demonstrou que o sêmen contaminado é eliminado de forma intermitente e aleatória por cães infectados.

Apesar de Rosypal e cols. (2005 apud SILVA e cols., 2008) terem relatado formas amastigotas em útero canino, não foram encontradas evidências de *L. infantum* no sistema genital feminino (Silva e cols., 2008, Silva e cols., 2009). Em estudo realizado por Pangrazio e cols. (2009), não houve diferença na transmissão transplacentária entre fêmeas sintomáticas ou assintomáticas, o que leva a crer que o *status* clínico da fêmea não é fundamental nesse tipo de transmissão. No entanto, está sendo estudada a possibilidade de transmissão vertical e congênita (Petersen, 2009), embora Masucci e cols. (2003 apud PANGRAZIO e cols., 2009) tenham demonstrado a ocorrência de verticalização em cães naturalmente infectados e, por conseguinte, filhotes positivos no momento do nascimento. Boggiatto e cols. (2011) sugerem que há um risco maior na transmissão transplacentária quando comparada com a transvaginal.

Outra forma de transmissão da LVC é através da transfusão sanguínea. Essa é uma prática comum na rotina veterinária, sendo utilizada, especialmente, em situações de emergência (Freitas e cols., 2006). Consoante

a isso, Owens e cols. (2001 apud SILVA e cols., 2009) relataram um caso de transmissão da doença através dessa prática e Freitas e cols. (2006) concluíram, através de estudo experimental, que a *L. infantum* pode ser transmitida através de sangue total ou frações de células mononucleares de cães infectados para receptores, independente da condição clínica do doador.

#### 1.1.6 Reservatórios

É considerado um reservatório o hospedeiro com características que possibilitem a manutenção e disseminação do agente etiológico. A importância de cada espécie é variável entre as regiões, visto que resultados de estudos locais não podem ser extrapolados para outras áreas sem fortes evidências ecológicas (Dantas-Torres, 2007). De acordo com Baneth e Solano-Gallego (2012), os reservatórios variam com as regiões geográficas e podem incluir animais domésticos e silvestres. Todavia, seu conhecimento é importante para o controle da doença, uma vez que os hospedeiros atuam na manutenção do ciclo e dispersão da LV, além de explicar e auxiliar na sua epidemiologia (Muniz e cols., 2006).

O cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório do agente etiológico da LV no ciclo doméstico (Alves e Bevilacqua, 2004; Silva e cols., 2005), embora alguns autores sugiram que ele é, na realidade, o reservatório doméstico mais estudado. A espécie é considerada um importante elo na cadeia de transmissão, visto que a doença nos cães precede a ocorrência em humanos (Gama e cols., 1998, Savani e cols., 2003, Oliveira e cols., 2008) e, por isso, de acordo com Falqueto (1986 apud FREHSE e cols., 2010) e Scalone e cols. (2002), são animais sentinelas.

Segundo Rosypal e cols. (2003), cães mantidos no peridomicílio quando comparados com domiciliados, por estarem mais expostos, possuem maior chance de desenvolver a doença. Estudos indicam que a LVC possui maior prevalência naqueles de pelo curto, defendendo a hipótese de que esse tipo de pelagem facilitaria a picada pelo vetor (Penaforte e cols., 2013). Além disso, de acordo com Belo e cols. (2013 apud PENAFORTE e cols., 2013), o porte do

cão também seria um fator de risco, pois uma superfície corpórea maior facilitaria a transmissão.

Curi e cols. (2014) afirmam que nas áreas consideradas rurais, o risco seria maior nos cães domiciliados pelo fato deles serem sedentários, pois permaneceriam maior tempo no mesmo local e, portanto, seriam um alvo mais fácil quando comparados com aqueles tidos como errantes. Ao contrário do que ocorre nas áreas rurais, encontrou-se uma maior prevalência de cães soropositivos com pelagem longa em áreas urbanizadas, o que poderia ser explicado pela baixa densidade destes nas áreas rurais (Curi e cols., 2014).

Conforme estudo de Queiroz e cols. (2009), cães aparentemente saudáveis, mas portadores de *Leishmania* sp. reforçam a probabilidade de participação na disseminação e transmissão da doença, embora pesquisas demonstrem que alguns indivíduos são resistentes a LV. Apesar de alguns estudos afirmarem que 70% dos cães infectados são machos, essa informação ainda é discutível tendo em vista fatores como a desproporção entre a população de machos e fêmeas, particularmente nas regiões rurais; possível preferência do flebotômico por cães machos, a exemplo daqueles usados para caça ou segurança; ou mesmo uma menor testagem de fêmeas (Queiroz e cols., 2009).

Segundo Palatnik-de-Souza e Day (2011) é possível que exista uma predisposição racial para o desenvolvimento da LV a exemplo dos cães da raça Dogue Alemão, Boxer, Dobermann e Cocker na França, Portugal, Grécia e Brasil, respectivamente. Não obstante, a doença parece ser rara nos Collies, enquanto os galgos (*Ibizian Hound*) aparentam ser resistentes à doença.

De acordo com Baneth e cols. (2008), a suscetibilidade e resistência à LVC aparenta ter base genética. O gene N-RAMPI (*solute carrier Family 11 member a1 – Slc11c1*), que codifica uma proteína transportadora de ferro envolvida no controle da replicação intrafagossomal de parasitos e ativação de macrófagos, tem implicação nos cães que possuem polimorfismo e mutação do mesmo. O polimorfismo de um único nucleotídeo causado por mutação em região promotora do gene *Slc11a1* foi associado com a susceptibilidade à LVC, sendo o haplótipo (TAG -8-141) vinculado com predisposição em cães da raça

Boxer. Além disso, determinados alelos de HLA (HLA-DRB1) estão associados à suscetibilidade no cão (Solano-Gallego e cols., 2009).

O gato doméstico (*Felix catus*) também pode ser considerado reservatório, embora sua relevância no ciclo da doença ainda não esteja elucidada (Palatnik-de-Souza e Day, 2011). Outros autores sugerem que ele seja apenas um hospedeiro eventual, visto que foi demonstrada uma associação estatística positiva entre a soroprevalência canina e a sua presença (Silva e cols., 2012).

De acordo com Zanet e cols. (2014) o roedor *Rattus rattus* pode manter a infecção na ausência de outros reservatórios. Outra espécie envolvida, cuja infecção teve seu primeiro relato na década de 80, é a equina. Há registros da doença descritos em cavalos (*Equus caballus*), mulas (*Equus mulus*) e asnos (*Equus asinus*) (Gramiccia, 2011, Soares e cols., 2013).

Destaca-se a presença de gambás (*Didelphis albiventris*) no peridomicílio, visto que essa espécie é um importante reservatório de *Trypanossoma cruzi* e *L. infantum*, o que merece ser estudado e avaliado nas regiões brasileiras (Gama e cols., 1998). A presença desses animais aumenta o risco da infecção canina em 2,6 vezes, podendo servir de elo entre os ciclos domésticos e silvestres (Dias e cols., 2003, Andrade e cols., 2007, Costa e cols., 2007).

Outros reservatórios silvestres como a raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), o graxaim (*Cerdocyon thous*) (Maia-Elkhoury e cols., 2008), o cachorro-do-mato (*Speothos venaticus*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Souza e cols., 2014) podem existir simultaneamente a outros, o que explica alguns aspectos da cadeia natural desta doença (Oliveira e Araújo, 2003). Na Austrália, continente indene, o parasito foi encontrado em cangurus-vermelho (*Macropus rufus*) mantidos em cativeiro e também em vários outros marsupiais pertencentes à família Macropodidae (Best e cols., 2014).

Nesse sentido, foi realizado um estudo com 98 cepas de *L. infantum* oriundas de sete países da América Central e do Sul – isoladas de humanos, cães e reservatórios silvestres (*Cerdocyon thous* e *Didelphis marsupialis*) – as quais foram comparadas com o perfil de outras 308 de diferentes países da

Europa, África, Oriente Médio e Ásia. O resultado indicou que as cepas originadas dos hospedeiros silvestres não diferiram das amostras humanas e caninas (Souza e cols., 2014), o que reflete a importância do ciclo silvestre na transmissão e manutenção da LV.

Outro ponto a ser ressaltado é a susceptibilidade dos animais mantidos em cativeiro, a exemplo de zoológicos, visto que já foram diagnosticados pumas (*Puma concolor*), jaguares (*Panthera onca*), macaco saúá (*Callicebus nigrifrons*) (Souza e cols., 2014), bugios (*Alouatta guariba*), macacos-prego-do-peito-amarelo (*Cebus xanthosternos*), micos-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus crysomelas*), macacos-da-noite (*Aotus nigriceps*), macacos-parauacu (*Pithecia irrorata*) e saguis-imperador (*Saguinus imperator*) (Malta e cols., 2010) no Brasil. No entanto, por serem consideradas espécies em extinção, a eliminação desses animais é proibida devido a implicações éticas e conservacionistas (Souza e cols., 2014).

Dias e cols. (2003) chamam atenção para o papel da galinha como atrativo para o vetor, uma vez que ela poderia desempenhar importante influência no peridomicílio, juntamente com outros reservatórios. Da mesma forma, Otranto e cols. (2010), afirmam que a galinha pode ser considerada um fator de risco para a LV, uma vez que a mesma constitui uma “isca natural” para os flebotomíneos. No mesmo sentido, um estudo conduzido no estado do Maranhão, verificou que a preferência do flebotomíneo em ordem crescente foi: ave, roedor, humano, canino, gambá e equino (Dias e cols., 2003).

Pelo fato da galinha ser refratária à doença, possivelmente em virtude da alta temperatura corpórea (40°C), que impediria as aves, de modo geral, de albergarem o protozoário, foi sugerido que essa espécie teria efeito zoonótico sob o desenvolvimento do protozoário pelo vetor. Estudos conduzidos por Nieves e Pimenta (2002 apud OTRANTO e cols., 2010) descartaram essa hipótese. Otranto e cols. (2010) sugerem avaliar o papel das aves de caça, a exemplo do ganso (*Anser anser*) e do faisão (*Phasianus colchius*) na epidemiologia da LV.

Lainson e Shaw (1979 apud DIAS e cols., 2003) afirmam que na Amazônia paraense, o flebotomíneo tem preferência pelo cão, enquanto Quinell e cols. (1992 apud DIAS e cols., 2003) sustentam que a atração do flebotomíneo por determinado hospedeiro seria em decorrência de seu tamanho relativo, ou seja, uma criança atrairia maior número de flebotomíneos quando comparado com um cão e uma galinha, um pouco menos que seis galinhas. Todavia, existe a possibilidade de que o próprio homem sirva como reservatório da doença, sobretudo os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e crianças desnutridas (Oliveira e cols., 2008).

### 1.1.7 Imunidade

A LVC é considerada uma doença imunomediada devido a capacidade do parasito modificar o sistema imune do hospedeiro (Côrrea e cols., 2007). De acordo com Tizard (2002), os protozoários possuem uma longa associação e adaptação com seus hospedeiros, sendo refletida nos eficientes mecanismos de evasão à resposta imunológica. Dessa maneira, é possível inferir que o desenvolvimento da LVC irá depender da resposta imune e do tempo de infecção, fatores esses que irão determinar se ela irá progredir da forma subclínica para a clínica, pois condições imunossupressoras ou doença concomitante podem quebrar o equilíbrio e levar à progressão da enfermidade (Baneth e cols., 2008).

No geral, o cão é resistente à infecção, podendo resolver, eliminar ou mesmo restringi-la e, dessa forma, se manter assintomático por longos períodos, sendo considerado clinicamente resistente. No entanto, aqueles predispostos ao desenvolvimento da doença após a infecção, são tidos como suscetíveis (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

### 1.1.7.1 Resposta imune inata

A primeira linha de defesa é a imunidade inata ou não específica (Baneth e cols., 2008). A infecção invade o sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme, mucosas ou vísceras, a exemplo do baço, fígado, medula óssea, trato gastrointestinal e linfonodos (Alves e cols., 2010, Faria e Andrade, 2012).

A imunidade natural pode tanto restringir a infecção como também auxiliar na evasão da *Leishmania* spp. (Freire, 2010), tendo em vista que o parasito replica dentro dos macrófagos (Baneth e Solano-Gallego, 2012). A ação dos macrófagos está intrinsicamente relacionada ao tipo de estímulo ou citocinas presentes no início da infecção. Por exemplo, o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) inibe a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), ativação de macrófagos, favorecendo a replicação do parasito (Freire, 2010). Já as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$  são indutoras de potentes mecanismos leishmanicidas nas células infectadas (Baneth e cols., 2008).

### 1.1.7.2 Resposta imune adaptativa

O T helper CD4+ se divide em duas subpopulações de linfócitos: tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), os quais são definidos com base no padrão das citocinas. Enquanto Th1 secreta IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , induzindo ativação de macrófago e resposta mediada por células, o Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ , auxiliando numa resposta imunomediada por anticorpos (Côrrea e cols., 2007). Embora a resposta humoral esteja presente durante a infecção, os anticorpos não participam dos processos de proteção (Lima e cols., 2003), além do fato de sua resposta excessiva ser prejudicial (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Embora a produção de anticorpos seja baixa em cães assintomáticos ou recentemente infectados, os níveis dos anticorpos aumentam gradualmente ao longo do tempo (Maia e Campino, 2008), visto que cães infectados apresentam níveis elevados de anticorpos anti-*Leishmania* (Lima e cols., 2007, Maia e

Campino, 2008) e baixa resposta mediada por células T (Lima e cols., 2007). Contrariamente, células Th2 modulam negativamente a resposta de controle parasitário no curso de infecção (Baneth e Solano-Gallego, 2012), enquanto Th1 é associado a uma resposta protetora (Maia e Campino, 2008). Na leishmaniose, bem como em outras infecções, as células T CD4<sup>+</sup> denominadas de células T reguladoras FoxP3<sup>+</sup> (T reg), tem função supressora favorecendo a expansão da infecção (Freire, 2010). O papel do Th17 durante a infecção por *L. infantum* não está bem elucidado (Nascimento, 2012). Estudos experimentais relatam que a IL-17 age sinergicamente com o IFN- $\gamma$ , possuindo, desse modo, um papel protetor (Gama e cols., 2013).

De acordo com Maia e Campino (2008), a determinação das subclasses IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) são utilizadas como marcadores para avaliar a suscetibilidade e o *status* clínico de animais infectados. Neto e cols. (2010) detectaram IgG1 e IgG2 em amostras de soro em cães sintomáticos e assintomáticos, respectivamente, embora níveis aumentados de IgG2 estejam associadas à infecção clínica ativa.

Estudos recentes demonstraram que a concentração de IgG total estão elevadas em cães sintomáticos. Também foi descrito na literatura a ocorrência de elevados níveis de IgM nos mesmos, embora não haja uma correlação entre o *status* clínico e essa imunoglobulina (Neto e cols., 2010). Nesse contexto, o índice de avidéz (IA), que avalia a capacidade de ligação da IgG, pode contribuir para prever o tempo de infecção e, por conseguinte, discriminar entre pacientes com infecção recente e crônica. Pacientes sintomáticos e com alta reatividade para IgG2 exibiram maior IA comparado com aqueles assintomáticos, sendo ainda necessário estabelecer um limite de valores para a definição do IA para a LVC (Neto e cols., 2010).

No cão a placenta endoteliocorial permite somente a passagem de pequenas quantidades de IgG (5 a 10%), sendo a maioria transferida pelo colostro. A concentração de anticorpos IgG transferidos pelo colostro, de mães soropositivas para a prole, seria inversamente proporcional à idade da ninhada (Andrade e cols., 2001).

Em estudo de Andrade e cols. (2001), esses autores não detectaram IgM em filhotes entre 0 e 120 dias de idade, e não recomendam o diagnóstico da infecção na fase aguda através dessa imunoglobulina, pois afirmam que ela nem sempre é detectada nesse período. Além disso, demonstraram que a concentração de IgG, passivamente adquirida, em filhotes de cães de mães soropositivas naturalmente infectadas, permaneceu entre 14 e 70 dias e, portanto, os anticorpos maternos obtidos de forma passiva poderiam resultar em cães jovens falso-positivos. No entanto, deve-se levar em consideração que um teste positivo de cão nascido de mãe soropositiva não necessariamente seja de origem vertical, podendo este ser oriundo da picada de flebótomo, logo após o nascimento.

Em contrapartida, Genaro e cols. (1988 apud ANDRADE e cols., 2001) detectaram anticorpos anti-*Leishmania* da classe IgM e IgG entre 90 e 150 dias de idade, o que reforça o cuidado ao testar, interpretar o diagnóstico e, sobretudo, vacinar aqueles cães classificados como filhotes.

Em suma, a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na leishmaniose ainda é um desafio para os pesquisadores, tendo em vista que são inúmeros os mecanismos envolvidos na proteção e controle da doença no hospedeiro. Além disso, ainda existem as particularidades relacionadas aos órgãos alvo, espécies de *Leishmania* e fatores intrínsecos de cada hospedeiro.

### 1.1.8 Sinais Clínicos

A LVC é considerada uma doença imunomediada, pois o agente etiológico consegue modificar o sistema imunológico do hospedeiro. Nesse sentido, apesar da resposta imune humoral ser excessiva, ela é deletéria e não protetora. Entretanto, pelo fato da *L. infantum* ser um parasito intracelular, as defesas são dependentes da imunidade celular (Marcondes, 2006).

A doença no cão tem evolução lenta (Rio Grande do Sul, 2011) e o período de soroconversão varia de 2 a 8 meses (Andrade e cols., 2007) ou entre 3 meses e 7 anos (Otranto e cols., 2007). As manifestações clínicas são variáveis e dependentes da resposta imunológica (Thomaz-Soccol e cols., 2009), da suscetibilidade genética do cão, e também da virulência do parasito (Moshfe e cols., 2009). Além disso, alguns estudos afirmam que existem indivíduos naturalmente resistentes à doença (Rosypal e cols., 2003; Almeida e cols., 2005).

Cães infectados podem aparentemente estar saudáveis (assintomáticos), manifestar sinais leves, bem como moderados (oligossintomáticos) ou severos (sintomáticos) (Queiroz e cols., 2009, Rio Grande do Sul, 2011). Essa classificação é limitada, pois está baseada no exame físico e desconsidera aqueles que possuem disfunções orgânicas sem manifestações visuais aparentes (Fisa e cols., 1997, Solano-Gallego e cols., 2009).

Alguns autores, embasados em um modelo matemático, sugerem baixa ou ausência de infectividade pelos cães assintomáticos, conferindo pouca importância a eles na transmissão da LV. Dantas-Torres e cols. (2006 apud OTRANTO e cols., 2007) afirmam que a prevalência desses casos no Brasil é de 85,3%.

Michalsky e cols. (2007) sugerem que cães assintomáticos e oligossintomáticos estão aptos a infectar o vetor, embora a uma taxa menor quando comparados com os considerados sintomáticos, pois esses têm a potência de infectar cinco vezes mais. Contudo, Lima e cols. (2004), Moshfe e cols. (2009) e Barata e cols. (2013), demonstraram que cães assintomáticos

seriam, da mesma maneira que os sintomáticos, transmissores em potencial, além de responsáveis pela manutenção da doença e continuidade do ciclo doméstico da mesma.

Até o presente momento, se desconhece quais mecanismos nos cães são responsáveis pela resistência ou suscetibilidade, embora se saiba que as manifestações clínicas são afetadas por fatores como idade, sexo, nutrição, genética do hospedeiro, coinfeção ou doença concomitante, imunossupressão, carga parasitária, virulência do agente etiológico e método de transmissão. Além disso, a LVC, por ser uma doença sistêmica, pode envolver quaisquer órgãos, tecido, fluido biológico e, por conseguinte, manifestar sinais clínicos inespecíficos (Solano-Gallego e cols., 2009).

Em estudo experimental conduzido por Genaro (1993 apud SILVA, 2009) foi constatado que os cães inoculados com *L. infantum* poderiam evoluir para quatro formas distintas classificadas em:

- frusta: ausência de alterações visíveis, detecção de parasitos e desaparecimento dos mesmos em seguida;
- regressiva espontânea: parasitismo transitório na medula óssea e emagrecimento durante a fase inicial da doença, seguida de retomada do ganho de peso sem apresentar quaisquer outras alterações;
- aguda: parasitismo de medula óssea e pele, emagrecimento com evolução para caquexia, envolvimento ocular, nasal e sobrevida curta;
- crônica: parasitismo de medula óssea e pele, emagrecimento leve a moderado, sinais clínicos leves a moderados e sobrevida longa.

Dentre os sinais clínicos clássicos destacam-se: hipertermia, reação nodular localizada no local da picada, nódulos que podem ulcerar, linfadenopatia, perda de peso progressiva, anemia normocítica normocrômica não regenerativa, anorexia, alopecia localizada ou generalizada, lesões cutâneas, pelagem opaca, feridas no focinho e orelhas, onicogrifose, epistaxe, lesões oculares, membros edemaciados, claudicação, paresia dos membros posteriores, neuralgia, poliartrite, falência renal, diarreia, hemorragia intestinal e

hepatoesplenomegalia (Oliveira e Araújo, 2003; Rosypal e cols., 2003, Krauspenhar e cols., 2007, Silva e cols., 2008, Queiroz e cols., 2009, Rio Grande do Sul, 2011, Ribeiro e cols., 2013).

Apesar de raro, alguns cães podem manifestar lesões de mucosa (cavidade oral, língua e genitais), hepatite e colite crônica recidivante, atrofia do músculo masseter, polimiosite, meningite, doença cardiovascular (pericardite, **alterações no ritmo cardíaco, estertor**), vasculite sistêmica, tromboembolismo, enfermidades autoimunes e síndrome de hiperviscosidade (“doença do soro”) (Solano-Gallego e cols., 2009).

A alta concentração de anticorpos e a circulação de antígenos podem auxiliar na formação de imunocomplexos, os quais podem ocultar a concentração de anticorpos presentes em uma amostra (Carvalho e cols., 2013). Reações inflamatórias crônicas são observadas no fígado, baço, pele, medula óssea, trato gastrointestinal e linfonodos, enquanto rins e pulmões podem manifestar, respectivamente, glomerulonefrite com ou sem síndrome nefrótica e pneumonite crônica intersticial (Lima e cols., 2004).

Alguns autores observaram deposição de antígenos e imunoglobulinas nos espaços intersticial e intravascular do plexo coroide de cães portadores de LVC. Acredita-se que a origem dos anticorpos no liquor, apesar de não estar esclarecida, provenha do sangue em virtude de lesão da barreira hematoencefálica. Entretanto, existe a possibilidade de que os antígenos induzam a formação intratecal de anticorpos (Marcondes e cols., 2006, Marquez e cols., 2013). Estudo conduzido em zona endêmica relatou uma prevalência de 4% de sinais neurológicos em cães infectados (Feitosa e cols., 2000). Dentre as manifestações relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) estão: convulsões, alterações visuais, paralisia de nervos cranianos, andar em círculos e alterações locomotoras, a exemplo de paraparesia e paralisia dos membros (Marcondes e cols., 2006, Marquez e cols., 2013).

De acordo com Feitosa (2005 apud MARCONDES e cols., 2006), deve ser considerado o diagnóstico diferencial com outras doenças infecciosas tais como toxoplasmose, neosporose, erliquiose, babesiose e cinomose. Importante

salientar a dificuldade em encontrar as formas amastigotas no tecido nervoso (Marquez e cols., 2013).

Apesar dos exames laboratoriais não serem suficientes para estabelecer o diagnóstico da LVC, eles são parâmetros importantes para avaliar a condição clínica do paciente (Medeiros e cols., 2008). Nesse âmbito, os exames laboratoriais demonstram hipoalbuminemia que pode estar associada à falência renal e/ou hepática, hiperfosfatemia, hipermagnesemia, hipercolesterolemia, hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia – decorrente da ativação policlonal de linfócitos B e, por conseguinte, produção elevada de anticorpos (Medeiros e cols., 2008, Petersen e Barr, 2009, Ribeiro e cols., 2013).

A resposta leucocitária varia de acordo com a evolução da doença, sendo a leucocitose comumente encontrada (Medeiros e cols., 2008, Rio Grande do Sul, 2011). Devem ser levados em consideração fatores como *status* imunológico, sinais clínicos e presença de coinfeção, uma vez que a linfopenia e a monocitose são achados frequentes (Medeiros e cols., 2008).

Outras alterações incluem trombocitopenia, baixo hematócrito, proteinúria, aumento dos níveis séricos de creatinina e uréia, além das enzimas hepáticas fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT). (Petersen e Barr, 2009, Ribeiro e cols., 2013). Segundo Rosa (2001 apud RIO GRANDE DO SUL, 2011) os mecanismos patogênicos responsáveis pelo aparecimento dos sinais clínicos são a produção de reações granulomatosas e a formação de imunocomplexos circulantes, em especial no glomérulo renal, vasos sanguíneos e articulações.

Em suma, tanto os sinais clínicos bem como os resultados laboratoriais são comuns a outras moléstias, o que retarda o diagnóstico correto, mascara o quadro clínico e, por conseguinte, mantém o indivíduo no ambiente como um reservatório ativo (Rio Grande do Sul, 2011). O diagnóstico diferencial é necessário para distinguir dermatoses, demodicose, sarna sarcóptica, dermatite alérgica por picada de ectoparasita (DAPE), neoplasia cutânea, TVT, erliquiose, babesiose, riquetsiose, dirofilariose e doenças imunomediadas (Gomes e cols., 2008).

### 1.1.9 Diagnóstico

As opções de diagnóstico para a leishmaniose visceral canina aumentaram recentemente em número e em precisão, embora um diagnóstico definitivo ainda requeira resultados concordantes entre os testes existentes (Best e cols., 2014, p. 292).

O diagnóstico da LVC tem por objetivo confirmar a presença do parasito e aliar o histórico, sinais clínicos e anormalidades compatíveis com a doença e sua manifestação. Isso permite investigar a presença da infecção, seja para fins epidemiológicos ou clínicos em regiões endêmicas, para prevenir a transmissão do parasito através da transfusão sanguínea (bolsa de sangue), para monitorar resposta ao tratamento e coibir a importação de cães infectados (Solano-Gallego e cols., 2009).

Apesar de complexo e difícil, o diagnóstico pode ser realizado através de métodos sorológicos, parasitológicos ou moleculares, associado ao exame clínico e dados epidemiológicos (Michalsky e cols., 2007). Embora exista uma grande variedade de testes diagnósticos, até o presente momento não existe um antígeno ideal, de modo que ainda permanece um desafio o diagnóstico correto da LVC (Faria e Andrade, 2012).

Os profissionais e pesquisadores esbarram na escolha de um método apropriado, simples, sensível e específico, que possibilite o diagnóstico não apenas dos casos avançados, mas também dos iniciais, oligossintomáticos e assintomáticos (Alves e Bevilacqua, 2004, p. 262).

Os inquéritos caninos, até a década de 1930, eram realizados através de exames diretos (punção de fígado, baço e raspado de pele). Em 1957, alguns pesquisadores descreveram a reação de fixação de complemento (RFC), sendo o antígeno extraído do bacilo da tuberculose. No entanto, eram possíveis reações cruzadas a títulos baixos com a doença de Chagas e leishmaniose tegumentar americana (LTA). Títulos inferiores a 1:80 necessitavam confirmação por outras metodologias (Alves e Bevilacqua, 2004).

Na década de 1960 passou a ser utilizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Alves e Bevilacqua, 2004), cuja sensibilidade varia entre 68% e 100% e a especificidade entre 52% e 100%

(Coura-Vital e cols, 2014). No Brasil, títulos iguais ou superiores a 1:40 são considerados positivos (Alves e Bevilacqua, 2004).

De acordo com Monteiro e cols. (1994 apud BRAGA e cols., 1998) o controle do reservatório canino, a partir da imunofluorescência no eluato de sangue dessecado em papel filtro (SDPF), possibilitaria uma redução entre 0,5% e 1% da prevalência. Consoante a isso, Silva e cols. (2011) afirmam que cães infectados não poderiam ser identificados pela RIFI no SDPF o que proporcionaria a transmissão e manutenção do ciclo.

A partir da década de 70, surgiu o ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) o qual, apesar de ser pouco específico (83% a 98%), é altamente sensível (91% a 97%), embora a sensibilidade dependa dos antígenos utilizados (Alves e Bevilacqua, 2004, Maia e Campino, 2008, Coura-Vital e cols., 2014) e do estado clínico do cão a ser testado (Faria e Andrade, 2012).

O RIFI e o ELISA são testes sorológicos utilizados para o diagnóstico da LVC. Contudo, em ambos podem ocorrer reações cruzadas (Alves e Bevilacqua, 2004, Solano-Gallego e cols., 2009, Zanette e cols., 2014) com *Trypanossoma cruzi* (Rosypal e cols., 2003, Petersen, 2009), *Trypanossoma canis* (Barros e cols., 2012), *Ehrlichia canis* (Ferreira e cols., 2007, Manzillo e cols., 2013), *Babesia canis* (Laurenti, 2009), *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (Zanette e cols, 2014) e espécies causadoras de leishmaniose cutânea (Gomes e cols., 2008).

O teste de aglutinação em gota (DAT) surgiu em 1975, sendo adaptado para o diagnóstico da LVC no final da década de 80. Entre as limitações estão o período de incubação longo (18 horas) e a necessidade de diluições em série, o que dificulta o emprego da técnica em um grande número de amostras (Maia e Campino, 2008).

O xenodiagnóstico<sup>4</sup> não é um exame de rotina, mas pode ser empregado para determinar a importância epidemiológica do reservatório infectado, além da possibilidade de avaliar o paciente sob diferentes formas clínicas da doença (Michalsky e cols., 2007, Soares e cols., 2011). Em virtude

---

<sup>4</sup>xenodiagnóstico: flebotomíneos não infectados são alimentados com sangue do paciente suspeito e, posteriormente, seus intestinos são examinados para a detecção do parasito.

da necessidade de laboratórios especializados e de colônias bem estabelecidas de flebotomíneos, é raramente realizado (Maia e Campino, 2008).

O teste intradérmico de Montenegro consiste na inoculação de formas promastigotas inativas na derme com o intuito de avaliar a hipersensibilidade do cão ao antígeno. A leitura é realizada entre 48 e 72 horas, sendo considerado positivo se houver crescimento de nódulo com tamanho superior a 5 mm de diâmetro (Maia e Campino, 2008). Apesar de simples e barato, a leitura é demorada e há possibilidade de indução de falso positivo por iatrogenia, sendo útil apenas no diagnóstico de cães com infecção subclínica ou em estágio inicial da doença, pois não detecta a infecção em cães com a doença ativa (Maia e Campino, 2008).

Os métodos parasitológicos – citologia e cultura *in vitro* – têm como finalidade detectar formas amastigotas através da biópsia por aspiração com agulha fina (BAAF) de determinados órgãos (Mykolanis e cols., 2005, Solano-Gallego e cols., 2009), além de representarem o padrão-ouro (Thomaz-Soccol e cols., 2009).

A citologia consiste na visualização das formas amastigotas (Moreira e cols., 2002, Laurenti, 2009) em esfregaços de aspirados de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados pelas técnicas de Giemsa, Panótico rápido ou Leishman (Laurenti, 2009).

De acordo com Silva e cols. (2007), o linfonodo seria o órgão de eleição seguido por baço, sangue, medula óssea e pele. Deve-se atentar para o risco da punção esplênica em virtude de possíveis sangramentos (Sundar e Rai, 2002) e a dificuldade da BAAF de medula óssea – ambos métodos extremamente invasivos (Silva e cols., 2007).

Apesar da especificidade 100%, a sensibilidade depende do grau de parasitismo, tipo de material biológico coletado, processamento, coloração e observador. Além disso, quando o parasitismo é intenso o diagnóstico pode ser considerado rápido e seguro, porém, em animais considerados assintomáticos, ele é duvidoso (Laurenti, 2009). De acordo com Moreira e cols. (2007), isso ocorreria em virtude dos cães sintomáticos serem mais sensíveis pela baixa resposta imune facilitando a detecção das formas amastigotas, o contrário do que ocorre naqueles oligossintomáticos e assintomáticos.

Já a cultura *in vitro* é comumente utilizada com propósitos acadêmicos (Solano-Gallego e cols., 2009), sobretudo por ser mais trabalhosa e onerosa quando comparada com outros métodos diagnósticos. Não obstante, entre os outros propósitos estariam: obter um número suficiente do protozoário para usar como antígeno no diagnóstico imunológico, experimentação animal através de inoculação, além de testes *in vitro* para pesquisa de fármacos e diagnóstico da infecção como método complementar a outros testes (Sundar e Rai, 2002).

A técnica consiste em inocular a amostra a um meio de cultura – monofásico ou difásico (Sundar e Rai, 2002) – incubar a uma temperatura entre 22°C e 26°C e examinar, semanalmente, a presença das formas promastigotas. Os parasitos podem ser vistos na primeira semana, contudo, algumas vezes, se torna necessário realizar subculturas para sua visualização, sendo considerada negativa após quatro ampliações sucessivas negativas. Importante salientar que em virtude dos tecidos e/ou órgãos coletados não terem carga parasitária semelhante, pode existir diferença no crescimento das cepas de *Leishmania* sp.. Dessa maneira, alguns autores têm preferência por amostra de baço, seguido de linfonodo poplíteo e medula óssea (Maia e Campino, 2008). Dentre os motivos pelos quais a cultura *in vitro* não é um método diagnóstico amplamente realizado estão a demora no resultado, suscetibilidade a contaminação, dependência da carga parasitária e dificuldade de adaptação do parasito ao meio de cultura que, apesar de raro, pode ocorrer (Maia e Campino, 2008). Apesar de não ser comumente empregada como método diagnóstico, tendo em vista a demora de meses por resultado positivo, a inoculação em animais de laboratório – tais como hamster (*Mesocricetus auratus*), camundongo (*Mus musculus*) ou cobaia (*Cavia porcellus*) (Sundar e Rai, 2002) – é utilizada para avaliar sinais clínicos e coletar material com o intuito de isolar o parasito de baço e fígado, especialmente quando o risco de contaminação na coleta a campo é alta (Maia e Campino, 2008).

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é altamente específica e sensível, sendo o método mais adequado na detecção da infecção na fase aguda e no monitoramento da cura parasitológica dos portadores (Michalsky e cols., 2007). Amostras oriundas de medula óssea, linfonodo, baço e pele são

mais sensíveis quando comparadas com urina, sangue total, e *buffy coat*<sup>5</sup> (Solano-Gallego e cols., 2009). No entanto, o *buffy coat* quando comparado com o sangue total, é dez vezes mais sensível para a detecção do agente etiológico no PCR (Sundar e Rai, 2002). Além disso, a PCR também discrimina as espécies de *Leishmania* sp. em flebotomíneos e carrapatos (Dantas-Torres, 2007).

Importante salientar que a PCR de amostra canina deve ser realizada em conjunto com testes sorológicos e avaliação clínica patológica com o intuito de melhor determinar o diagnóstico. Esse método é também indicado em caso de exportação de cães para áreas não endêmicas, doação de sangue ou coabitação com indivíduos imunodeprimidos (Solano-Gallego e cols., 2009). A eficácia da técnica depende de alguns fatores tais como *primers* utilizados, número de cópias amplificadas da sequência alvo, método de extração do DNA, material biológico e protocolo utilizado (Maia e Campino, 2008).

Atualmente, o rk39 (epítipo imunodominante de 39 aminoácidos reconhecido por células B) clonado de *L. infantum* seria o mais potente e promissor antígeno recombinante. Ele é utilizado em testes imunocromatográficos como um método qualitativo e de triagem (Alves e Bevilacqua, 2004) de modo a diagnosticar amostras positivas (Lima e cols., 2010). Não há na literatura uma opinião concisa a respeito da acurácia do teste, pois enquanto alguns autores destacam sua elevada sensibilidade e especificidade, especialmente em cães sintomáticos (Michalsky e cols., 2007, Lemos e cols., 2008, Maia e Campino, 2008), outros consideram o teste baseado nesse antígeno pouco específico, o que aumentaria o número de falsos-positivos diagnosticados. Esse fato poderia estar associado à reação-cruzada com algum fator presente no sangue canino (Reithinger e cols., 2002).

Reações cruzadas com antígenos recombinantes são pouco prováveis (Solano-Gallego e cols., 2009), mas no estudo de Zanette (2006 apud LAURENTI, 2009) estas reações foram observadas em casos de erliquiose, coinfeção erliquiose/babesiose, toxoplasmose, neosporose e coinfeção

---

<sup>5</sup>*buffy coat*: é a fração de uma amostra de sangue que contém a maioria dos glóbulos brancos e plaquetas (camada leucocitária).

toxoplasmose/neosporose. Os ensaios imunológicos que utilizam esse antígeno, a exemplo dos testes rápidos, são ágeis e permitem a execução de medidas em tempo real (Lemos e cols., 2008). O treinamento para efetuar o teste é mínimo, não se fazendo necessário nenhum conhecimento específico (Otranto e cols., 2005) ou laboratório especializado, além da facilidade do transporte (Silva e cols., 2013).

A fim de executar medidas de controle e prevenção, é de extrema importância o diagnóstico precoce (Savani e cols., 2003, Otranto e cols., 2005). Contudo, em se tratando de cães considerados assintomáticos, não existem testes diagnósticos considerados padrão ouro, o que implica na necessidade de aperfeiçoamento dos mesmos (Otranto e Dantas-Torres, 2013).

Souza e cols. (2004) afirmam que a variedade de técnicas imunodiagnósticas, os inúmeros antígenos disponíveis e os diferentes critérios empregados para definição do ponto de corte, reduziriam a concordância entre os resultados e dificultariam a comparação dos dados epidemiológicos. Desse modo, são necessários métodos diagnósticos que auxiliem na detecção precoce de cães infectados e que possibilitem uma vigilância mais eficiente (Scalone e cols., 2002, Grimaldi Jr e cols., 2012).

Para a LV canina, um teste que apresente elevada sensibilidade deve ser preferido para os inquéritos epidemiológicos. Essa medida visa obter uma menor taxa de cães falsos negativos. A alta sensibilidade evitaria que os animais positivos não permanecessem como fontes de infecção para o vetor e desse para o ser humanos e outros animais (Alves e Bevilacqua, 2004, p. 263).

A sensibilidade de um teste pode variar de acordo com o curso clínico da infecção, a variabilidade genética e a resposta imune do hospedeiro (Grimaldi Jr e cols., 2012). Não existe na América do Sul, em virtude da presença permanente do flebotomíneo, um padrão de prevalência definido (Dantas-Torres e cols., 2012); na Europa, estudos demonstram que cães com idade inferior a 3 e superior a 8 anos possuem picos mais altos de prevalência da doença (Solano-Gallego e cols., 2009).

Cães oriundos de áreas endêmicas devem ter seus anticorpos avaliados a cada 6 ou 12 meses como medida preventiva. Da mesma maneira, indivíduos assintomáticos soronegativos, mas PCR positivos devem ser monitorados semestral ou anualmente, de modo a determinar a soroconversão e possível

manifestação da doença (Solano-Gallego e cols., 2009). Tal protocolo é justificado por Oliva e cols. (2006 apud COURA-VITAL e cols., 2013), pois estudos mostraram que os cães positivam no PCR após alguns meses – entre 1 e 6 meses em estudos experimentais, e entre 4 e 22 meses (média de 10,5 meses) para cães naturalmente infectados (Coura-Vital e cols., 2013).

Cães saudáveis, mas soropositivos com título de anticorpos baixos, devem ser novamente testados. Em caso de confirmação do resultado, devem ser monitorados a cada 3 ou 6 meses com o objetivo de avaliar a progressão da infecção. Se, durante o monitoramento, for constatado aumento do título, manifestação de sinais clínicos e anormalidades clínico patológicas, o cão deve ser considerado doente (Solano-Gallego e cols., 2009).

Importante ressaltar que em áreas onde a transmissão da LVC não está confirmada, apenas a sorologia é insuficiente para conclusão de diagnóstico, sendo necessário avaliar também dados clínicos, epidemiológicos e parasitológicos (Savani e cols., 2003). Os inquéritos epidemiológicos baseados no diagnóstico laboratorial devem ser encorajados, pois ajudam a avaliar a extensão do problema (Alves e Bevilacqua, 2004). Dessa maneira, é imprescindível compreender o funcionamento de cada método diagnóstico e suas limitações, com o intuito de definir não somente o teste mais apropriado, mas, também, sua interpretação (Solano-Gallego e cols., 2009).

#### 1.1.10 Legislação Brasileira

Segundo decreto presidencial número 51.838 sancionado na década de 1960 é obrigatória a notificação compulsória daqueles casos considerados positivos ou suspeitos (Brasil, 1963).

A identificação e sacrifício do cão são atividades preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LV humana. Esta recomendação está respaldada, dentre outras, na consideração de que o cão é importante reservatório da doença para o ser humano e na demonstração de que a doença canina precede a doença humana, sendo a primeira um dos responsáveis pelo avanço tanto espacial como temporal da segunda (Alves e Bevilacqua, 2004, p. 262).

Contrapondo a afirmação acima, Vieira e Coelho (1998 apud OLIVEIRA e ARAÚJO, 2003, p. 1688)<sup>6</sup> afirmam que:

“a observação da curva de casos humanos e dos índices da sorologia em cães no país revela que na última década foi constatado aumento dos casos humanos apesar da redução das taxas de soropositividade canina”.

A incidência da doença no Brasil e sua relação com a eutanásia de cães considerados soropositivos é conflitante e os dados apresentados na literatura divergem de acordo com o autor e região estudada, bem como se método isolado ou em conjunto com demais profilaxias. Sendo assim, há uma real necessidade de rever e reformular a eutanásia como medida de controle, uma vez que ainda são desconhecidos inúmeros aspectos referentes ao papel desempenhado pelo cão na epidemiologia da LV (Andrade e cols., 2007). Convém ressaltar que nas recomendações do Ministério da Saúde (MS), não existem atividades diretamente relacionadas à investigação dos fatores de risco associados com a infecção canina (Penaforte e cols., 2013). Nesse sentido, Santos e cols. (2010) consideram que eles variam entre regiões, por entenderem que a LVC seja particular de cada localidade e que o estilo de vida do cão possa influenciar a exposição ao vetor, a exemplos dos cães de guarda noturnos.

É também recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a eutanásia de cães reagentes por critério clínico-laboratorial ou clínico-epidemiológico, além da proibição do tratamento com medicações de uso humano ou não registradas no referido ministério (Brasil, 2008).

Costa (2001) demonstra que a eutanásia deve ser melhor discutida e revista a partir de alguns pontos:

1. Falta de correlação espacial entre a incidência cumulativa da doença humana e canina;
2. Ausência de risco significativo de coabitação com cães para o desenvolvimento da doença;

---

<sup>6</sup> Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: Aspectos epidemiológicos e de controle. SBMT. 1998; 31: 85-92.

3. Método pouco eficiente quando comparado com o controle vetorial e de suplementação alimentar;
4. Existência de outros vetores como fatores de infecção;
5. Alta taxa de reposição da população canina;
6. Baixa eficiência dos testes sorológicos e falta de indicadores clínicos ou laboratoriais de infectividade de cães para o vetor;
7. Experiências anteriores revelam que o sucesso do controle da LV a partir da eutanásia de cães se deu, concomitantemente, com o controle de vetores.

Na ausência de vetores ou de casos humanos, as medidas devem ser a vigilância sanitária e educação em saúde. Além disso, recomendam-se inquéritos sorológicos amostrais e identificação de vetores. De acordo com Jesus e Araújo (2007 apud FREHSE e cols., 2010) estudos de prevalência são úteis na prevenção e manutenção do *status* da área estudada (endêmica ou indene).

A incerteza dos métodos atuais de diagnóstico para a identificação de cães a serem eutanasiados é a maior preocupação nesse contexto, uma vez que ainda existem divergências no valor diagnóstico da sorologia (Silva e cols., 2011).

A eutanásia é indicada em casos de diagnóstico parasitológico positivo ou confirmação de casos clinicamente suspeitos através da sorologia em cães procedentes de áreas endêmicas (Costa, 2001). No entanto, a acurácia<sup>7</sup> dos testes sorológicos é duvidosa (Silva e cols., 2013). Nesse mesmo âmbito, de acordo com Zanette e cols. (2014), tal abordagem deveria ser reavaliada em virtude da possibilidade de haver reações cruzadas com outros agentes infecciosos. De acordo com Gavilani e cols. (2002) e Andrade e cols. (2007), existe um modelo matemático desenvolvido por Dye (1996) que avalia a eutanásia de cães como método empregado pelo governo para controlar a doença. Segundo esse autor, os cães eutanasiados são substituídos por novos cães, com o intuito de compensar a perda, o que influencia de forma negativa esse método de controle. Por conseguinte, as implicações epidemiológicas podem ser graves, pois uma população canina jovem possui baixa resposta

---

<sup>7</sup> É a capacidade do método em acertar o diagnóstico.

imunológica, alta prolificidade e maior vulnerabilidade a inúmeras doenças. Em seu estudo, Andrade e cols. (2007), demonstraram que os animais jovens foram mais suscetíveis à LV.

Outro fator determinante e pouco avaliado é o destino dos cadáveres de animais vindos a óbito em consequência da doença, seja por eutanásia ou de forma natural. De acordo com a resolução RDC número 306 de 7 de setembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os cadáveres animais são classificados como resíduos comuns (grupo D) e, por isso, não necessitam de tratamento prévio e devem ser encaminhados para aterros sanitários licenciados por órgão ambiental ou à empresas credenciadas para recolhimento de cadáveres.

#### 1.1.11 Urbanização

A LV se tornou endêmica e epidêmica nas grandes cidades brasileiras a partir da década de 1980 (Costa, 2008, Werneck, 2008), embora Monteiro e cols. (2005) e Maia-Elkhoury e cols. (2008) afirmem que o processo de urbanização tenha se acentuado na década de 70, particularmente nas periferias e nas áreas de transição entre as médias e grandes cidades. De acordo com Harhay e cols. (2011), o vetor tem se mostrado adaptado tanto ao meio periurbano como ao meio urbano brasileiro há mais de 30 anos, o que explica, em parte, a transmissão do agente etiológico nessas áreas.

Após décadas de tentativas de controle da doença Brasil, o número de casos tem aumentado consideravelmente no país e invadido as áreas urbanas (Costa, 2001), sendo que a cada 5 ou 10 anos ocorrem surtos epidêmicos nas regiões endêmicas (Rey e cols., 2005). Importante ressaltar que muitas famílias se instalam em localidades de desmatamento recente, em zonas periurbanas e de recursos escassos onde há a presença de flebotômíneos, levando consigo, muitas vezes, cães oriundos de regiões endêmicas (Oliveira e Araújo, 2003, Solano-Gallego e cols., 2009).

Além disso, o estabelecimento em novas áreas geográficas está vinculado ao movimento migratório de cães e humanos suscetíveis ou parasitados (Dantas-Torres e cols., 2012), em virtude do turismo ou da imigração (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Nesse âmbito, Harhay e cols. (2011) atentam para as rotas aéreas comerciais envolvendo as cidades endêmicas brasileiras e argentinas como um novo elo entre os reservatórios e o vetor, muitas delas com escalas na Europa. Outro ponto a ser ressaltado seria a mobilidade militar, a qual também é considerada um fator de risco para humanos e cães (Kim e cols., 2010).

De acordo com Gama e cols. (1998) e Costa e cols. (2007), as transformações ambientais decorrentes da intensa migração por pressões socioeconômicas e sociais, a pauperização da população em razão da má distribuição de renda, o êxodo rural e a crescente urbanização, explicam parcialmente, o agravamento da LV e o aparecimento de novos focos no país. Monteiro e cols. (2005) atentam para a interrupção da vigilância sanitária e afirmam que outros fatores devem estar envolvidos, a exemplo do potencial de transmissão em virtude da densidade, taxa de infecção vetorial e vulnerabilidade dos reservatórios ao desenvolvimento da doença.

Além disso, períodos cíclicos de estiagem concomitante com o fenômeno climático *El niño* contribuem para a expansão da doença, pois há a ocupação das margens fluviais e o desmatamento dessas áreas (Rey e cols., 2005). Desjeux (2001) ressalta que quaisquer mudanças nos fatores ambientais levam a uma mudança na distribuição do parasito. De acordo com Monteiro e cols. (2005), a LV ocorre com maior frequência em áreas quentes, de clima seco e com índice pluviométrico anual de 550 mm, sendo o pico de transmissão em regiões de altas temperaturas e umidade relativa do ar, principalmente no decurso da estação chuvosa.

Outro ponto a ser ressaltado é o aumento da virulência do agente etiológico decorrente da resistência aos fármacos utilizados para o tratamento, bem como dos inseticidas e da mudança na biologia do *Lutzomya longipalpis* (Werneck, 2008), visto que esse vetor está adaptado a diferentes habitats e reservatórios (Nascimento e cols., 2013, Costa e cols., 2013). A taxa de infecção depende de inúmeros fatores entre os quais se destacam a duração

da estação de transmissão, densidade vetorial, suscetibilidade e comportamento da espécie a ser acometida, grau de exposição ao vetor e, sobretudo, aplicação de medidas profiláticas.

Importante ressaltar que há prejuízo no desenvolvimento econômico das regiões consideradas endêmicas, tendo em vista o aumento da morbidade e mortalidade infantil e redução na capacidade de trabalho da população economicamente ativa (Oliveira e Araújo, 2003). Nesse mesmo âmbito, de acordo com o DALY<sup>8</sup> (*Disability Adjusted Life Years*), a leishmaniose está classificada em terceiro lugar.

---

<sup>8</sup> Indicador econômico cujo objetivo compete medir o número de anos de vida produtiva perdidos devido à morte prematura, incapacidade ou deficiência.

### 1.1.12 Epidemiologia

De acordo com Werneck (2008), a LV está em franca expansão a considerar o número de casos notificados e sua incidência anual – 5,1 casos para 100.000 habitantes (OMS, 2014). Maia-Elkhoury e cols. (2008) relatam que as notificações, particularmente, nas médias e grandes cidades, tiveram ênfase na década de 1980, embora a década de 1990 seja caracterizada pelo aparecimento da doença em novos municípios.

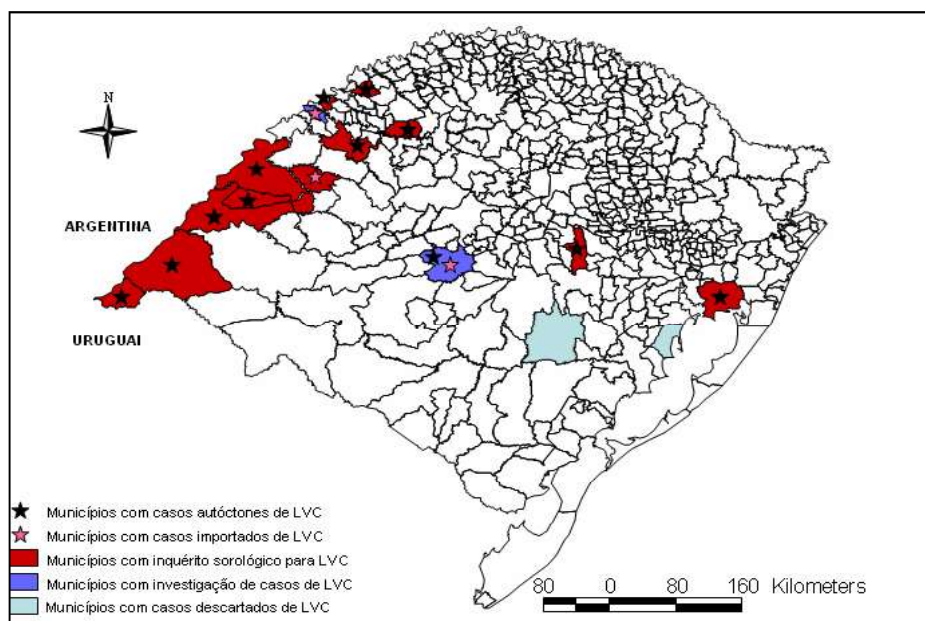
O início do século XXI tem evidenciado casos de LV em áreas anteriormente consideradas indenes, assim como o aumento da incidência em crianças, as quais frequentemente vêm a óbito, devido à gravidade da doença nessa faixa etária (Camargo e Barcinski, 2003). Calcula-se que existam em torno de 40 milhões de cães no Brasil, sendo 5 milhões desses animais habitantes da área rural. Além disso, eles estão se tornando comuns em regiões consideradas “áreas protegidas”, o que contribui para o desequilíbrio do ciclo de vida silvestre. Deste modo, há prejuízo na distribuição espacial entre hospedeiros e patógenos afetando, por conseguinte, a dinâmica das doenças, pois o contato da fauna e povos nativos com esses cães aumentaria consideravelmente o risco da enfermidade (Curi e cols., 2014).

Dados oriundos de organizações não governamentais ou de médicos privados não são incluídos e as informações dos órgãos oficiais subestimam o real problema da doença, fato esse, que ocorre em inúmeros países (Thakur, 2000, Desjeux, 2001, Faria e Andrade, 2012). Levantamento feito pela OMS em 2012 apontou que a maioria das mortes em humanos não são registradas e que a taxa registrada de letalidade encontra-se entre 10% e 20%, mesmo com tratamento (Ready, 2014).

O Brasil é um dos países mais afetados, sendo relatados, em humanos, 4200 a 6300 casos ao ano (Peixoto e cols., 2014) – as taxas de letalidade em 1994, 2003 e 2009 foram respectivamente 3,4%, 8,5% e 5,8% (Melo e Fortaleza, 2013). Ressalta-se que tanto a prevalência como a soroprevalência possuem taxas variáveis, pois são dependentes de condições climáticas e ecológicas, as quais determinam a abundância do vetor (Solano-Gallego e cols., 2009).

Segundo dados do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS/RS), órgão vinculado à Secretaria da Saúde, até dezembro de 2010, a prevalência da LVC nos municípios de São Borja, Uruguai e Porto Alegre foram 22,5%, 14% e 4,1%, respectivamente. Apesar de ter ocorrido a caracterização do agente etiológico na cidade de Santa Maria, não foram relatados, a partir de vigilância epidemiológica, amostras sororreagentes (Figura 5).

Figura 5 – Situação da Leishmaniose Visceral Canina no estado do Rio Grande do Sul (Jan/2010)



Fonte: Programa de Vigilância das Leishmanioses /DVAS/CEVS/ SES-RS.

### 1.1.13 Profilaxia

Os conceitos, atitudes e credences da população acerca das doenças endêmicas são fatores importantes para o controle e conhecimento epidemiológico. Além disso, para desenvolver estratégias contra uma enfermidade, deve-se conhecer o comportamento do homem diante da mesma, de modo a melhor orientá-lo. Ressalta-se ainda que, no que diz respeito a essas enfermidades, as populações residentes nas zonas rurais e periféricas carecem de informações (Gama e cols., 1998). Esses autores através de um estudo prospectivo, avaliaram o nível de conhecimento sobre a LV em populações residentes em áreas endêmicas no Maranhão. Quando questionados sobre prevenção, 77,8% dos entrevistados não sabiam quais medidas preventivas tomariam e os demais evitariam cães doentes, criadouros de mosquitos ou mesmo a pessoa enferma.

Importante salientar que, nesse estudo, o percentual de indivíduos que receberam informações de fontes informais é superior àqueles que foram informados através de programas oficiais de combate e prevenção da LV. Segundo Estes (1984 apud GAMA e cols., 1998) e Garcia-Zapata (1990 apud GAMA e cols., 1998), nos países em desenvolvimento, as ações dirigidas para controlar e prevenir determinado problema de saúde em uma população afetada ou exposta, sempre exclui a educação popular como medida sanitária concreta, o que, na maioria das vezes, tende a levar ao fracasso os programas oficiais.

Outro estudo realizado no ano de 2008 confirmou que o nível de conhecimento da população ainda está limitado a informações superficiais e atitudes profiláticas inespecíficas (Borges e cols., 2008). Todavia, a participação efetiva da comunidade na profilaxia da LV seria uma medida de extrema importância e impacto, uma vez que a população estando capacitada em identificar um caso pelos principais sinais e sintomas, poderia referir os suspeitos de modo precoce aos serviços de saúde (Gama e cols., 1998).

Gama e cols. (1998) chamam atenção para algumas medidas imprescindíveis a serem executadas de modo a informar a população e reduzir o risco de exposição:

1. Implementação de programas profiláticos, a exemplo de educação em saúde, saneamento básico, melhoria das habitações e promoção da participação das populações, em especial nas regiões endêmicas;
2. Capacitação e reciclagem dos profissionais da saúde;
3. Implantação de postos médicos de atendimento nas áreas maior risco e de canis municipais, com o intuito de referir os casos suspeitos.

O programa brasileiro para controle da LV (PBCLV) é composto pela integração de três medidas: distribuição gratuita do tratamento específico para humanos, de modo a evitar o óbito (principalmente entre a população de baixa renda, pois são as principais vítimas); controle de reservatórios domésticos e vetores, a partir de exame sorológico dos cães domésticos, sendo eutanasiados aqueles soropositivos; e uso de inseticidas (aspersão espacial ou aplicação residual) (Brasil, 2006).

Essas medidas são sustentadas sob o ponto de vista que a incidência da LV em humanos está diretamente relacionada ao número de cães infectados e a fatores entomológicos (Costa e cols., 2007). Savani e cols. (2003) afirmam que a realização dessas medidas em conjunto tem contribuído para a redução dos casos humanos, em especial nas áreas urbanas. De acordo com Dantas-Torres e cols. (2012) são eutanasiados, anualmente, milhares de cães, sendo o número de casos humanos estimado em 3500/ano por esses autores.

As medidas preconizadas pelo MS para controlar e combater a LV possuem limitações. Entre elas é possível citar a necessidade em manter um sistema de vigilância epidemiológica permanente, o que não ocorre, visto os escassos recursos (humanos e financeiros); os resultados conflitantes relativos à eutanásia canina (Araújo e cols., 2013); e a falta de acurácia dos testes diagnósticos para a detecção da LVC (Lemos e cols., 2008, Araújo e cols. 2013).

Outro ponto é a demora entre coleta da amostra, análise e implementação de medida profilática (Lemos e cols., 2008, Grimaldi Jr e cols., 2012). Nesse mesmo âmbito, de acordo com a OPAS e a OMS, as medidas disponíveis para o controle da doença são limitadas, laboriosas e caras (OPAS, 2009). Além disso, muitas das medidas preconizadas são inviáveis na maioria dos centros urbanos (Melo e Fortaleza, 2013).

Estudos têm demonstrado que o controle do vetor tem se destacado (Costa e cols., 2007). De acordo com Costa (2001) o controle vetorial deve ser realizado quando introdução recente da doença, aumento da incidência e incidência cumulativa maior que 5 casos por 100.000 habitantes ao ano. Contudo, é uma medida de alto custo, complexa e que requer recursos humanos e insumos (Oliveira e cols., 2008).

Oliveira e Araújo (2003) e Monteiro e cols. (2005) indicam a necessidade de mapear a fauna flebotômica de modo a conhecer a biologia do vetor no seu habitat natural, além de conhecer a sazonalidade da variação dessa população, para posterior controle. Maia-Elkhoury e cols. (2008) sustentam a necessidade de estudar o comportamento do *Lutzomya*, particularmente no ambiente urbano, o que poderia explicar a participação do vetor na urbanização da LV (Costa, 2008).

A aplicação de inseticidas (residual e extensiva), como forma de combater o *Lutzomya longipalpis* deve ser realizada a partir de registros na área de casos humanos e caninos e presença do vetor (Costa, 2001, Oliveira e Araújo, 2003). Ela deve ser residual e extensiva, em ciclos semestrais (dois ciclos anuais) e obedecer um raio de 1.000 metros a partir do caso humano e 200 metros na zona rural, sendo progressivamente ampliado pela incorporação de áreas adjacentes, à medida que sejam identificados cães positivos.

A borrifação deve ser aplicada no teto (até três metros de altura) e nas paredes internas e externas do domicílio, além dos abrigos de animais (galinheiros, pocilgas, currais e canis) ou anexos. Dentre os pesticidas comumente utilizados estão a cipermetrina sob a formulação de pó molhável (PM) – 125 mg.i.a/m<sup>2</sup> e a deltametrina em suspensão concentrada (SC) – 25 mg.i.a/m<sup>2</sup> (Rio Grande do Sul, 2011, Otranto e Dantas-Torres, 2013). Esse

método está direcionado a eliminação das formas adultas do flebotomíneo (Oliveira e Araújo, 2003) e fêmeas endofílicas<sup>9</sup> (Killick-Kendrick, 1999), além de evitar ou reduzir o contato do vetor com a população de risco (Rio Grande do Sul, 2011).

Uma das limitações no emprego dos inseticidas consiste na dificuldade em abranger os locais de reprodução e abrigo dos flebotomíneos (Otranto e Dantas-Torres, 2013), pois se dispõe apenas de 3% de informação acerca destes (Marcondes, 2011), além do uso descontínuo e em épocas inapropriadas (Reinhold-Castro, 2008). Apesar da indicação, na atualidade, do uso dos piretróides, chama a atenção que os organoclorados diclorodifeniltricloroetano e hexaclorociclohexano (DDT e HCH) já foram empregados e mostraram excelente eficácia no controle e combate da população flebotomínica no Brasil. No entanto, a alta toxicidade, seus efeitos adversos e poluição ambiental, tornaram o uso restrito (Otranto e cols., 2007, Otranto e Dantas-Torres, 2013).

Os microorganismos *Bacillus thuringiensis israelenses* e *Bacillus sphaericus* são bioinseticidas letais ao *Lutzomya* sp. e utilizados para controlar as larvas (Killick-Kendrick, 1999, Amora e cols., 2009). Contudo, no que diz respeito ao *Bacillus thuringiensis*, problemas com a formulação, fermentação durante a fabricação e pesquisa de mercado inadequada levaram à retirada dos produtos comercialmente disponíveis (Amora e cols., 2009).

Amora e cols. (2009) relatam que a gregarina *Ascogregarina chagasi* reduziu, *in vitro*, a longevidade e fecundidade do *Lutzomya longipalpis*. Entretanto, ainda é discutido o controle biológico através desse parasito. Outro microorganismo também estudado é o nematódeo intestinal *Rhabditida steinermatidae* o qual é albergado pelo *Lutzomya* sp. Quando o vetor está em condições de estresse, o parasito tende a aumentar sua colonização e, desse modo, interfere no desenvolvimento do vetor. Alguns países, a exemplo da Bolívia, investiram na completa destruição do habitat flebotomínico como forma de controlar as larvas, seguido da exploração da área.

---

<sup>9</sup>endofílicas: espécie que matura seus ovos no interior de locais, a exemplo dos domicílios.

Além do controle de vetores, é imprescindível que o programa de controle seja realizado em parceria com programas de assistência nutricional, pois crianças desnutridas constituem um alto risco de infecção por *Leishmania infantum* (Costa, 2001). Sendo uma doença associada às precárias condições socioeconômicas e sanitárias, as políticas públicas, objetivando diminuir a incidência da LV, deveriam garantir não somente a resolução das desigualdades nos padrões de saúde, mas, sobretudo, acesso a educação, habitação e saneamento básico (Oliveira e Araújo, 2003).

Importante ressaltar que cada município tem suas prioridades e está estruturado de modo diferente. Tais fatos implicam investimento em medidas profiláticas, visto que os municípios endêmicos investem significativamente no controle da LV em comparação com aqueles indenes ou de mínima casuística (Oliveira e cols., 2008). Tendo em vista a expansão da doença para áreas antes consideradas incólumes, são necessários programas de prevenção, embora os responsáveis por cães e também as autoridades de saúde pública ainda estejam despreparados para lidar com a realidade futura (Dantas-Torres e cols., 2012).

No que diz respeito ao controle e prevenção exclusivos da LVC, o uso de coleira à base de deltametrina 4% (Scalibor®) diminui a incidência da picada por flebotômíneos entre 80% e 96% (Rosypal e cols., 2003), reduzindo, consideravelmente, o risco de infecção, além de proteger contra outros ectoparasitos (pulgas e carrapatos). Killick-Kendrick e cols. (1997), a partir de estudo realizado com cães e flebotômíneos, concluíram que o uso da coleira permitiria o controle da zoonose, a redução da incidência e possivelmente sua erradicação. Esta tem duração de até 6 meses sendo o princípio ativo distribuído pelo tecido adiposo entre 1 e 2 semanas (Solano-Gallego e cols., 2009). Outro fator importante é o efeito irritante e tóxico para os flebotômíneos, causando desorientação e morte quando em contato com a pele do cão tratado (Rosypal e cols., 2003).

Uma nova opção de coleira cujo princípio ativo é a combinação de imidacloprid 10% e flumetrina 4,5% (Seresto®), utilizável em cães e gatos está disponível desde novembro de 2014 no país. De acordo com o fabricante, ela confere proteção contínua por até 8 meses contra flebotomos, pulgas e

carrapatos, sendo o princípio ativo liberado em baixas doses e de forma constate, além de ser resistente à água (Otranto e Dantas-Torres, 2013).

De modo geral, essas coleiras devem ser empregadas em larga escala e não de forma isolada, devendo ser respeitado o prazo de validade e trocadas quando extraviadas ou quebradas (Manzillo e cols., 2006). Nesse âmbito, Otranto e Dantas-Torres (2013) afirmam que cães errantes oriundos de áreas endêmicas deveriam fazer uso da coleira repelente, pois são considerados mantenedores do ciclo, principalmente em ambiente urbano e também nos períodos de baixa incidência de flebotomíneos (Fraga e cols., 2012). Além disso, estudo realizado por Gavilani e cols. (2002) em região endêmica no Irã, constatou que a incidência da LV em crianças foi reduzida com o encoleiramento dos cães.

Outra opção de medida profilática são os ectoparasiticidas à base de permetrina 50% e imidacloprid 10% sob a formulação *spot on*, cuja eficácia varia conforme o número de vezes usado ao mês. Cães tratados uma ou duas vezes ao mês teriam uma taxa de proteção entre 88,9% e 90,36% e 90,73% e 100%, respectivamente (Otranto e cols., 2007). Todavia, quando aplicado, esse inseticida leva em torno de 24 horas até se espalhar completamente pelo estrato córneo e possui duração de 3 semanas. De um modo geral, os inseticidas de uso tópico representam uma ferramenta promissora na redução da transmissão da infecção aos cães (Otranto e Dantas-Torres, 2013), além de conferir proteção contra pulgas e carrapatos.

Em se tratando de cães saudáveis que irão habitar ou visitar áreas endêmicas, é recomendado o uso de coleira repelente 2 semanas antes da viagem e trocá-la a cada 5 meses. Piretróides sob a formulação *spot on* ou spray devem ser aplicados 2 dias antes e repetidos a cada 2 ou 3 semanas, respectivamente. Ainda assim, ao retornar para a região de origem, é recomendada avaliação clínica e laboratorial como indicado para cães que habitam regiões endêmicas (Solano-Gallego e cols., 2009).

A vacinação canina é uma ação que beneficia não somente a população alvo, mas também a humana. Palatnik-de-Souza (2009 apud OTRANTO e DANTAS-TORRES, 2013) afirma que a imunoterapia reduz a incidência da doença, especialmente em áreas endêmicas. Nesse mesmo âmbito, um estudo recente demonstrou a diminuição da incidência da doença após a vacinação de milhares de cães em duas regiões endêmicas no sudeste brasileiro (Dantas-Torres e cols., 2012). Embora o MS não autorize ou adote a vacinação como medida de controle, os médicos veterinários nesse país a recomendam (Otranto e Dantas-Torres, 2013) de acordo com protocolo pré-estabelecido e orientação do MAPA, responsável pela autorização e liberação da vacina (Brasil, 2007).

Apesar de existirem marcas consagradas de vacina no mercado – duas no Brasil e uma na Europa –, o custo ainda é proibitivo para grande parte da população. Além disso, ainda estão em estudo outros potenciais antígenos vacinais e adjuvantes (Otranto e Dantas-Torres, 2013). Consoante a isso, chama-se atenção que os responsáveis por cães moradores de áreas rurais ou afastadas dos centros urbanos, na maioria das vezes, não dispõem de atendimento veterinário (Dantas-Torres e cols., 2012).

Considerando os outros modos de transmissão da LVC a exemplo da transfusão sanguínea, vertical e transplacentária, seria interessante testar aqueles cães doadores de sangue e reprodutores, independente do sexo, ou mesmo a indicação da orquiectomia e da ovariectomia daqueles cães oriundos de zonas endêmicas ou reagentes.

Em síntese, o controle da LV é complexo pela diversidade de vetores e reservatórios (Killick-Kendrick, 1999) e a OMS propõe a erradicação da doença até o ano 2020 (Amazigo e cols., 2012). Ações conjuntas entre médicos, veterinários, pesquisadores, autoridades em saúde pública e políticos são imprescindíveis de modo a buscar uma plataforma de planejamento e estratégias de controle sustentáveis a partir de uma perspectiva de saúde pública, visto que a epidemiologia da LV é complexa e o vetor mostrou-se altamente capaz de ser adaptar a outros ambientes.

## 1.2 Justificativa

Considerando a falta de dados epidemiológicos regionais e locais sobre a leishmaniose e a necessidade de controle da expansão da doença para áreas não endêmicas, principalmente por meio do diagnóstico em seu principal reservatório, o cão, o presente estudo objetivou caracterizar o perfil epidemiológico e clínico da leishmaniose visceral em cães da região metropolitana de Porto Alegre, por meio dos testes: imunocromatográfico, imunoenzimático e parasitológico.

## 1.3 Materiais e métodos

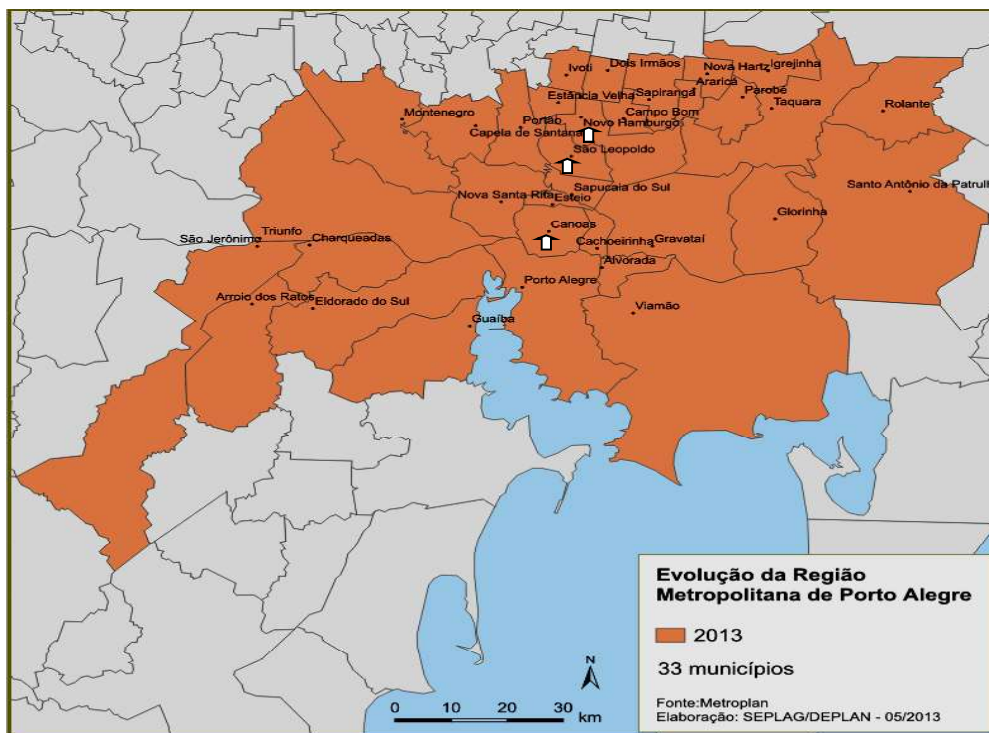
### 1.3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), sob o protocolo 118/13. Os responsáveis legais pelos cães foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Apêndice 1) antes da coleta das amostras e pesquisa de dados. Os mesmos foram igualmente informados de que, ao final da pesquisa, receberiam um relatório contendo os resultados obtidos pelos diferentes testes realizados, assim como suporte técnico em relação a dúvidas sobre LVC.

### 1.3.2 Área de abrangência

O estudo foi realizado em três municípios da região metropolitana de Porto Alegre (RMPA)<sup>10</sup>, a qual concentra 37% da população gaúcha e, atualmente, abrange 33 cidades (Tabela 1). O trabalho foi realizado nos municípios de Canoas (latitude 29° 55' 8" e longitude 51° 10' 41"), São Leopoldo (latitude 29° 45' 39" e longitude 51° 9' 8") e Novo Hamburgo (latitude 29° 41' 5" e longitude 51° 8' 31") pela existência de canis populosos, proximidade com a capital e, sobretudo, pela aceitação por parte dos responsáveis legais (Figura 6).

Figura 6 – Municípios integrantes da região metropolitana de Porto Alegre



Fonte: Metroplan (2013)

<sup>10</sup>Área composta por um núcleo urbano densamente povoado e por suas áreas vizinhas menos povoadas. As regiões metropolitanas incluem uma ou mais áreas urbanas, bem como cidades-satélites e áreas rurais que estão socioeconomicamente conectadas ao urbano núcleo central.

De acordo com a classificação de Köppen-Geiger, o clima dos municípios estudados é Cfa (clima temperado úmido com verão quente). Canoas está localizada a 15 metros de altitude do nível do mar, com temperatura média de 19,4°C e índice pluviométrico de 1418 mm/ano, ocorrendo o maior índice de precipitação durante o mês de setembro (139 mm) e o menor em novembro (102 mm). Já São Leopoldo está a 6 metros de altitude do nível do mar, possui temperatura média de 19,5°C e índice pluviométrico de 1440 mm/ano, ocorrendo o maior índice de precipitação durante o mês de setembro (140 mm) e o menor em novembro (104 mm). Novo Hamburgo está a 43 metros de altitude do nível do mar, a temperatura média é 19,4°C e o índice pluviométrico é de 1467 mm/ano, ocorrendo o maior índice de precipitação durante o mês de setembro (143 mm) e o menor em novembro (106 mm).

A distância entre Porto Alegre e os locais de coleta nas cidades de Canoas, São Leopoldo e Novo Hamburgo é de 19,8 km, 38,5 km e 40,9 km respectivamente. Canoas está afastada 24 km de São Leopoldo, sendo este último município distante, aproximadamente, 8,2 km de Novo Hamburgo.

Os canis em Canoas e Novo Hamburgo localizavam-se em áreas urbanas, enquanto o canil em São Leopoldo estava situado em uma área que alternava entre residências urbanas, áreas rurais e vasta vegetação, caracterizando uma área rururbana. Outro ponto a ser salientado era a proximidade do local com o aterro sanitário municipal.

### 1.3.3 População de estudo

A amostragem foi definida com base na prevalência da doença no município de Porto Alegre estabelecida em 4,1%, de acordo com os dados do boletim epidemiológico estadual (volume 13/ número 01/ ano 2011) (Rio Grande do Sul, 2011), uma vez que não havia dados sobre a epidemiologia da doença nos municípios estudados. Para o cálculo do tamanho da amostra utilizou-se a plataforma desenvolvida pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística da Universidade Federal de São Paulo (LEE-USP-SP), sendo estabelecido um total de 378 cães. Os fatores de exclusão foram cães com temperamento agressivo ou arisco, filhotes e aqueles imunizados contra LVC.

Os cães eram alocados coletivamente, variando entre dois e oito indivíduos, separados por porte, afinidade e condição clínica em baias protegidas da chuva, com acesso ao sol e sombra. Não havia contato direto com vegetação densa; o piso era de cimento, sendo este, em alguns casos de “terra batida”. A limpeza dos canis era realizada diariamente, no entanto, era visível a presença de ectoparasitas na população estudada.

#### 1.3.4 Coletas de dados e amostras sanguíneas para sorologia

Através de inquérito epidemiológico, foi realizada a anamnese de cada cão e a caracterização da população quanto ao sexo, raça, classificação da pelagem (curta ou longa) e viabilidade reprodutiva (Apêndice 2). Foram coletadas 405 amostras sanguíneas através da venopunção das veias jugular ou cefálica, de cães oriundos dos municípios de Canoas (n=107), São Leopoldo (n=216) e Novo Hamburgo (n=82).

Para tanto, após antissepsia com algodão embebido em álcool 70°GL, foram coletados 3mL de sangue com o auxílio de seringa descartável acoplada a agulha hipodérmica 25 x 7mm – 1mL em tubo EDTA e 2mL em tubo com separador de gel. As amostras foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos e, posteriormente separadas alíquotas de 200 µL de plasma e soro para a realização dos testes sorológicos. Além disso, amostras de *buffy coat* de todos os cães foram armazenadas para futuros ensaios moleculares.

Os cães cujos testes imunocromatográfico ou imunoenzimático foram considerados reagentes em um ou ambos os testes imunológicos ou indeterminados no ELISA EIE® (amostras com valores acima ou abaixo do ponto de corte) foram submetidos à nova coleta de sangue em tubo heparinizado e punção de linfonodo mandibular, cervical ou poplíteo para realização de testes parasitológicos (citologia e cultura “in vitro”). Como controle pareado, foram incluídos igual número de cães não reagentes. O tempo dispendido entre as coletas e o processamento do material no laboratório foi de, aproximadamente, 3 horas.

### 1.3.5 Diagnóstico diferencial

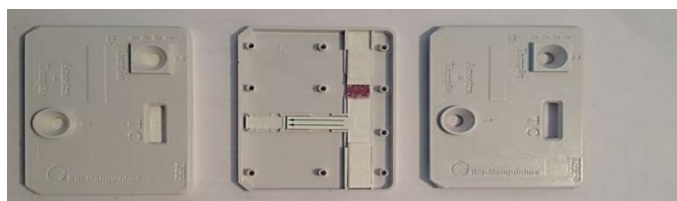
Objetivando o diagnóstico diferencial com enfermidades que poderiam estar relacionadas com reação cruzada nos testes sorológicos (falso-positivos) ou concomitantes à LVC, realizou-se o teste SNAP 4DX Plus® daquelas amostras consideradas indeterminadas ou reagentes em um ou em ambos os testes.

### 1.3.6 Teste Imunocromatográfico "Dual-Path Platform" (TR DPP®)

O TR DPP® é um ensaio imunocromatográfico qualitativo desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz (TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, Fiocruz/Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) para diagnóstico rápido da LVC, especialmente em locais distantes ou impossibilitados de enviar material para laboratório de referência. Desde 2012, ele vem sendo usado como triagem para inquéritos caninos, sendo permitido o uso de sangue periférico total ("ponta de orelha"), venoso, soro ou plasma (Domingos, 2012).

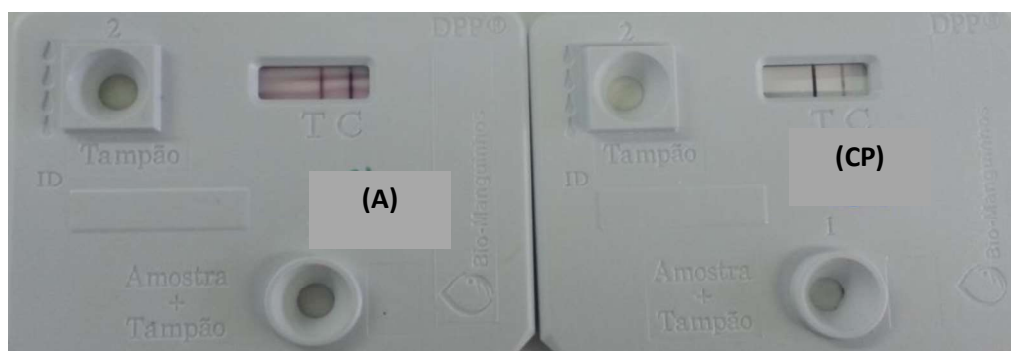
O teste emprega a combinação da proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para *Leishmania* sp.. Em sequência, reagem com antígenos recombinantes de *L. infantum* ligados a uma membrana de nitrocelulose (fase sólida) (Figura 7). O resultado é considerado positivo se ocorrer o aparecimento de uma linha de coloração rosada nas linhas teste (T) e controle (C) (Figura 8), negativo quando nenhuma linha aparecer na linha T (Figura 9) e inválido se a linha C falhar em aparecer (Otranto e cols., 2007).

Figura 7 – Visão interna do teste TR DPP®



Fonte: Emeline Riboldi

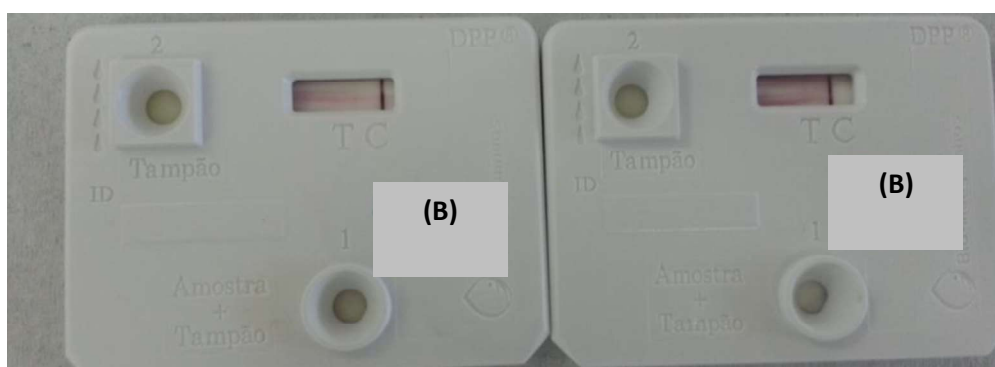
Figura 8 – Exemplo de resultado positivo no TR DPP®



(A): amostra positiva; (CP): controle positivo.

Fonte: Msc. Regina Bones Barcellos (CDCT/FEPPS)

Figura 9 – Exemplo de resultado negativo no TR DPP®



(B): amostra negativa

Fonte: Msc. Regina Bones Barcellos (CDCT/FEPPS)

Para a execução do teste, foi adicionado 5  $\mu$ L da amostra com o auxílio de uma alça coletora ao poço #1, seguido pela adição de duas gotas do tampão de corrida – o tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos ao antígeno. Aguardou-se 5 minutos até o desaparecimento das linhas T e C da janela para, em seguida, ser adicionado quatro gotas do tampão ao poço #2. Posterior a essa etapa, foi realizada a leitura entre 10 e 15 minutos, sendo excluídos aqueles testes com resultado superior a 25 minutos. Como controle de positividade para cada lote contendo os testes utilizou-se plasma de cão positivo.

### 1.3.7 Teste Imunoenzimático (ELISA EIE®)

O teste ELISA EIE® (Fiocruz/Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, sendo executado no CDCT/FEPPS. Ele vem sendo usado desde o ano de 2012 como confirmatório do TR DPP® e emprega antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major* (espécie causadora de leishmaniose cutânea), obtidos de cultura *in vitro*.

As amostras de soro de todos os cães (N=405) foram testadas por ELISA EIE®. Resultados considerados reagentes e indeterminados<sup>11</sup> no teste de ELISA EIE® e/ou no TR DPP® foram retestados por ELISA EIE® nas matrizes soro e plasma. Como controle utilizou-se plasma de cão positivo. Os indivíduos reagentes em pelo menos uma das matrizes foram considerados positivos no teste imunoenzimático.

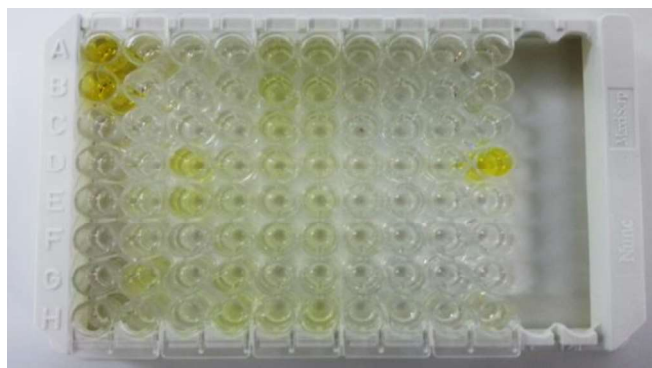
Para a execução do ELISA EIE®, os antígenos são adidos e adsorvidos nas cavidades de microplacas (*strips*), sendo posteriormente adicionados os controles e as amostras, devidamente diluídas. Na etapa seguinte, adiciona-se um anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado a enzima imunoperoxidase. A reação foi evidenciada através do uso da tetrametilbenzidina (TMB), formando composto de coloração azul turquesa (amostra reagente). A adição do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ao final da execução do teste tem como objetivo interromper a reação – amostras reagentes passarão da tonalidade azul para amarela e aquelas negativas (não reagentes) não desenvolverão cor (Figura 10). A leitura da placa é realizada por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nanômetros (nm). Para a validação do teste, a densidade ótica (DO) dos controles positivos deve ser igual ou maior que 0,500 e daqueles negativos entre 0,050 e 0,120. Sendo assim, quando os resultados estavam fora desses limites, o ensaio foi repetido.

---

<sup>11</sup> As amostras indeterminadas compreendem a faixa de valores em torno do *cut off*, dentro da qual não se pode ter certeza do resultado.

O *cut off* (ponto de corte - CO) de cada placa é a média da DO dos controles negativos multiplicada por 2. Para melhor classificar aqueles valores tidos como indeterminados considerou-se o intervalo mínimo e máximo de 10% do CO para melhor compreensão dessa escala. Foram consideradas amostras reagentes aquelas com DO igual ou superior ao CO, não reagentes com DO inferior ao CO e indeterminadas aquelas que apresentarem valores entre os limites mínimo e máximo.

Figura 10 – Resultado do teste ELISA EIE®



Fonte: Msc. Regina Bones Barcellos (CDCT/FEPPS).

### 1.3.8 Citologia

Para a execução do aspirado de linfonodo por BAAF foi utilizada seringa de 10mL e agulha 25x7mm, além da antissepsia prévia do local com álcool 70°GL. Após a coleta, foi adicionada uma alíquota de cada amostra em uma lâmina e realizou-se a técnica de deslizamento. Cada lâmina foi deixada secar a temperatura ambiente e submersa por, aproximadamente, 30 segundos nos reagentes panótico 1 (solução de triarilmetano 0,1%), panótico 2 (solução de xantenos a 0,1%) e panótico 3 (solução de tiazinas a 0,1%). Em seguida, as lâminas foram lavadas e deixadas secar ao ar na posição vertical.

As lâminas foram avaliadas para verificação da presença de formas amastigotas utilizando-se microscópio ótico em objetiva de imersão. A citologia foi realizada no laboratório Pathos®.

### 1.3.9 Cultura "in vitro"

Amostras de sangue e material da punção de linfonodos dos cães reagentes nos testes sorológicos foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura para avaliação do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* sp.. Para tanto, as amostras oriundas do BAAF de linfonodos poplíteo, mandibular ou cervical superficial foram coletadas com o auxílio de seringa de 5mL e agulha 25x7mm contendo 1mL tampão fosfato-alcálico (PBS) e 50 µg/mL de estreptomicina e 50U/mL de penicilina. Os aspirados foram armazenados em caixa térmica de isopor à temperatura ambiente por um período de 2 a 3 horas até a chegada ao laboratório. As amostras sanguíneas heparinizadas foram mantidas em bolsa térmica refrigerada.

A separação das amostras sanguíneas em alíquotas de plasma e *buffy coat*, bem como os inóculos para crescimento de *Leishmania* foram executados no Laboratório de Imunologia da UFCSPA. As amostras de *buffy coat* e aspirado de linfonodos foram inoculados em meio de cultura específico para crescimento de *Leishmania*, sendo utilizado dois diferentes meios o RPMI e o

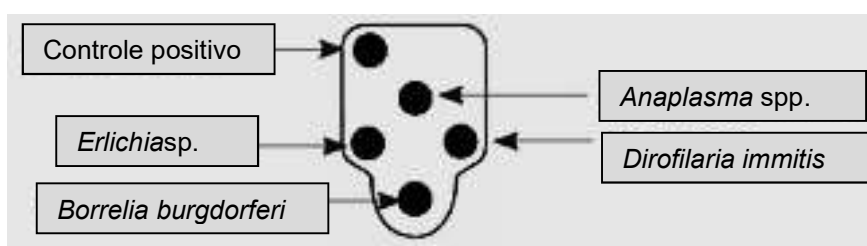
M199 suplementado com SBF 20% e urina humana 2%. As garrafas de cultura foram incubadas em estufa  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e analisadas semanalmente em microscópio invertido durante 4 semanas.

### 1.3.10 Teste Imunoenzimático (SNAP 4Dx Plus®)

O SNAP 4DX Plus® é um ensaio imunológico qualitativo baseado na tecnologia imunoenzimática (ELISA) e desenvolvido pelo laboratório Idexx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) com o intuito de diagnóstico rápido para detecção do antígeno de *Dirofilaria immitis*, anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia canis* em soro, plasma ou sangue total canino (Figura 11).

O teste foi realizado de acordo com as normas do fabricante e executado no CDCT/FEPPS. Por meio do plasma, testou-se o total de 21 amostras reagentes ou indeterminadas para LVC, seja somente no TR DPP® (n=10), ELISA EIE® (n=5), concomitante as duas técnicas (n=2) e aquelas indeterminadas (n=4) no ELISA EIE®, independente da matriz utilizada.

Figura 11 – Leitura do SNAP 4Dx Plus®



Fonte: Adaptado de Idexx (<http://www.idexx.com>)

### 1.3.11 Análise estatística

As informações referentes aos animais e os resultados dos testes diagnósticos foram organizados em planilhas no programa *Excel*<sup>®</sup> e transportados para o *SPSS* versão 18.0 para análise estatística. Os dados foram apresentados em frequência e porcentagem.

Para avaliação da associação entre os testes diagnósticos, utilizou-se o teste exato de Fisher<sup>12</sup>. O grau de concordância foi avaliado através do teste qui-quadrado<sup>13</sup> e do coeficiente Kappa<sup>14</sup>.

---

<sup>12</sup> É indicado quando o tamanho de duas amostras independentes é pequeno e consiste em determinar a probabilidade exata de ocorrência de uma frequência observada, ou de valores mais extremos.

<sup>13</sup> Aplicável a dados representados em forma de frequência para detectar significância estatística da diferença entre dois grupos independentes

<sup>14</sup> Mede o grau de concordância e varia geralmente de 0-1 (embora os números negativos sejam possíveis) onde um grande número significa maior confiabilidade, valores próximos ou menores que zero sugerem que o acordo é atribuível ao acaso.

## 1.4 Resultados

A partir dos dados coletados no inquérito epidemiológico caracterizou-se a população canina quanto ao sexo, viabilidade reprodutiva e pelagem.

O perfil epidemiológico foi apresentado com base na imunocromatografia (triagem) e no ensaio imunoenzimático como padrão confirmatório (teste ouro) e a prevalência de cada município e região calculada de acordo com os respectivos testes. O diagnóstico diferencial para coinfeção ou reação cruzada foi avaliado através do SNAP 4Dx Plus® e seus resultados foram comparados com aqueles encontrados previamente nos testes imunológicos.

De modo a avaliar a concordância entre os testes diagnósticos e as matrizes soro e plasma, calculou-se o coeficiente *Kappa*. A associação entre os testes diagnósticos foi avaliada através do teste qui-quadrado e teste exato de Fisher.

### 1.4.1 Caracterização da população

Através do inquérito epidemiológico da população estudada (N=405), constatou-se que a maioria era composta por cães esterilizados (78,76%) e pelagem curta (82,71%). Relativo ao sexo, a população entre machos e fêmeas equiparou-se quando avaliada a amostra total, porém, nos municípios de São Leopoldo e Novo Hamburgo a maioria da população era composta por fêmeas (60,67% e 59,75%, respectivamente), ao contrário do encontrado em Canoas (29,90%) (Tabela 2).

Relativo ao *status* sanitário, de forma geral, os animais apresentavam parâmetros clínicos dentro da normalidade bem como condição corporal adequada, entretanto, foi observada presença de ectoparasitas. Durante avaliação clínica foi notado que alguns cães manifestavam doenças de pele, como DAPE (n=4) e sarna (n=3), nódulos mamários ou em membros (n=6), TVT (n=2), emagrecimento (n=1), onicogribose (n=2) e alterações oftalmológicas como ceratoconjuntivite seca (n=1).

#### 1.4.2 Teste Imunocromatográfico (TR DPP®)

Dos 405 plasmas testados foram reagentes 12 amostras, entre os municípios de Canoas (n= 5), São Leopoldo (n=6) e Novo Hamburgo (n=1). De acordo com o ensaio imunocromatográfico, a prevalência para cada município e região estudada seria, respectivamente, de 4,67%, 2,77%, 1,21% e 2,96% (Tabela 3).

#### 1.4.3 Teste imunoenzimático (ELISA EIE®)

Dos 405 soros testados, Canoas apresentou uma amostra reagente (n=1) e três indeterminadas (n=3) e São Leopoldo uma amostra reagente (n=1) e sete indeterminadas (n=7). Novo Hamburgo não apresentou amostra reagente ou indeterminada (n=0) (Tabela 4).

As amostras reagentes e indeterminadas no ELISA EIE® e reagentes no TR DPP® foram retestadas usando soro e plasma por ensaio imunoenzimático. Para aquelas amostras retestadas com plasma encontrou-se 5 amostras reagentes e 6 indeterminadas. Relativo ao soro, foram 4 reagentes e 4 indeterminadas (Tabela 4).

A prevalência da região estudada, considerando todas as amostras reagentes na testagem e retestagem, variou entre 1,23% (n=5) (plasma) e 0,98% (n=4) (soro); considerando aquelas amostras reagentes, e dentre aquelas consideradas indeterminadas, a prevalência foi de 1,48% (n=6) (plasma) e 0,98% (n=4) (soro) (Tabela 5).

De acordo com a totalidade das amostras por município, a prevalência para Canoas e São Leopoldo seria, respectivamente, 1,86% (n=2) e 1,38% (n=3) (plasma); 1,86% (n=2) e 0,92% (n=2) (soro). Já a prevalência das amostras indeterminadas considerando apenas plasma seria 0,93% (n=1) e 2,31% (n=5) para os municípios de Canoas e São Leopoldo, respectivamente. Para soro, seria 1,85% (n=4) apenas para a cidade de São Leopoldo. (Tabela 5).

#### 1.4.4 Citologia

Não foram visualizadas formas amastigotas nas amostras avaliadas.

#### 1.4.5 Cultura "in vitro"

Não foi visualizado crescimento de formas promastigotas nas amostras avaliadas.

#### 1.4.6 Teste imunoenzimático para diagnóstico diferencial (SNAP 4Dx Plus®)

Dentre as amostras reagentes nos ensaios sorológicos (n=21), 23,80% (n=5) foram consideradas reagentes apenas para *Anaplasma* spp<sup>1</sup> (Figura 12) (Tabela 6).

Figura 12 – Resultado positivo para *Anaplasma* spp. – SNAP 4Dx Plus®



Fonte: Msc. Regina Bones Barcellos (CDCT/FEPPS)

---

<sup>1</sup> O SNAP 4Dx Plus® não é capaz de diferenciar entre as espécies de *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*. Um resultado positivo indica a presença de anticorpos para ambas ou não.

#### 1.4.7 Avaliação dos testes diagnósticos

A avaliação dos métodos diagnósticos utilizados no presente estudo foi realizada através de duas comparações: TR DPP® (triagem) e ELISA EIE® (confirmatório); e ELISA EIE® entre as matrizes soro e plasma.

Considerando o ensaio imunoenzimático como padrão diagnóstico (confirmatório), das 405 amostras testadas, sete (n=7) foram reagentes, sendo duas (n=2) verdadeira-positivas (TR DPP e ELISA EIE®) e cinco (n=5) falsa-negativas (negativa no TR DPP®). Dentre as quatorze (n=14) amostras negativas, quatro (n=4) foram verdadeira-negativas (TR DPP® e ELISA EIE®) e dez (n=10) falsa-positivas (reagente no TR DPP®) (Tabela 7).

Na avaliação entre as matrizes do ensaio imunoenzimático, considerando plasma como padrão diagnóstico, das 405 amostras testadas, quatro (n=4) foram reagentes, sendo duas (n=2) verdadeiro-positivas e duas (n=2) falso-positivas. Dentre as oito (n=8) amostras negativas, oito (n=8) foram verdadeira-negativas e nenhuma (n=0) foi falsa-negativa (Tabela 8). Embora tenha sido possível comparar as amostras quanto a reagentes (falso-positivos e verdadeiro-positivos) e não reagentes (falso-negativos e verdadeiro-negativos), não foi permitido avaliar os métodos diagnósticos no que diz respeito à sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos (negativo e positivo), uma vez que não foi possível definir com exatidão um grupo controle de cães reagentes para LVC através dos testes considerados padrão-ouro (citologia e cultura) cujos resultados são essenciais para a realização de tais cálculos e interpretação dos mesmos.

Ao comparar o teste imunocromatográfico com o imunoenzimático, não foi encontrada correlação entre eles ( $P = 0,061$  e  $\kappa = -0,364$ ).

Ao se avaliar o índice Kappa entre as amostras de soro e plasma referentes ao teste imunoenzimático ( $P = 0,028$  e  $\kappa = 0,571$ ) e entre as amostras de soro testadas e retestadas ( $P = 0,035$  e  $\kappa = 0,615$ ) demonstrou-se concordância em ambas.

Com relação aos testes ELISA EIE® e SNAP 4Dx Plus®, os quais são considerados independentes, não foi possível encontrar uma associação entre eles e seus resultados ( $P = 0,110$ , teste Exato de Fisher).

## 1.5 Discussão

O Rio Grande do Sul, a partir da confirmação de caso autóctone da LVC e registro de *Lutzomyia longipalpis* na cidade de São Borja, deixou de ser considerada região indene em 2008. No ano seguinte, nesse mesmo município, foi notificado o primeiro caso humano de LVH, embora a LTA esteja documentada desde 2002 no Estado (Rio Grande do Sul, 2011). Acredita-se que a doença tenha ingressado no Rio Grande do Sul pela fronteira com a Argentina, em virtude da alta prevalência nesse país (Monteiro e cols., 2010).

Considerando que a LV está adentrando em regiões e/ou cidades antes consideradas incólumes, estudar novas áreas geográficas é uma etapa crítica, de modo a iniciar ou melhorar a vigilância epidemiológica da leishmaniose no país (Zuben e cols., 2014). Além disso, é uma maneira de não negligenciar essas localidades em virtude de serem consideradas indenenes e manter um monitoramento sobre a situação de toda uma área.

Nesse sentido, avaliou-se nesse estudo o perfil epidemiológico e clínico da LVC na RMPA, considerando as intensas relações de trânsito entre os municípios e a capital, a confirmação de casos de LVC e LVH em Porto Alegre, bem como o desconhecimento da prevalência de LVC nos municípios estudados.

Com relação à caracterização do perfil dos animais positivos e/ou suspeitos em relação ao sexo, tipo de pelagem (curta ou longa) e viabilidade reprodutiva, dados na literatura indicam que essas características diferem de acordo com a região estudada, não existindo um consenso entre os pesquisadores sobre a prevalência da doença de acordo com o sexo. Quanto à pelagem, cães com pelagem curta estão mais propensos a serem picados pelo vetor, o que poderia justificar a maior prevalência (Penaforte e cols., 2013). A importância da castração implica não somente no controle populacional de cães errantes ou andarilhos, mas também, em evitar o risco relativo à transmissão de zoonoses (OMS, 1990) – no caso da LVC, coibir a transmissão via sexual e vertical (parâmetros esses ainda em estudo).

Embora a literatura considere que cães considerados assintomáticos possam possuir disfunções orgânicas sem manifestações clínicas aparentes (Fisa e cols., 1997, Solano-Gallego e cols., 2009), sendo necessária uma avaliação clínico-laboratorial para melhor classificação, aquelas encontradas durante o inquérito epidemiológico (DAPE, sarna, nódulos mamários ou em membros, TVT, emagrecimento, onicogrifose e alterações oftalmológicas) caracterizaram uma população clinicamente assintomática.

De modo a estabelecer o diagnóstico correto da LVC é essencial conhecer a base dos testes diagnósticos, suas limitações e interpretação clínica (Marcondes e cols., 2006). Com relação aos testes diagnósticos utilizados, apesar de um número maior de cães considerados reagentes (n=12) terem sido diagnosticados no ensaio imunocromatográfico, quando comparado com o encontrado no imunoenzimático (n=7), eles se mostraram discordantes.

De acordo com a literatura, apesar do TR DPP® ser tido como uma perspectiva promissora, não existe um consenso no que diz respeito a sua sensibilidade em cães assintomáticos. Conforme estudo conduzido por Grimaldi e cols. (2012), o TR DPP® apresentou elevada sensibilidade apenas para cães sintomáticos (98%), mas em assintomáticos, este parâmetro foi baixo (47%). Em contrapartida, Laurenti e cols. (2014) encontraram uma elevada sensibilidade para cães sintomáticos (89,4%) e assintomáticos (92,1%). A elevada sensibilidade nos cães classificados como assintomáticos, poderia ser justificada pela possibilidade desses indivíduos estarem em um estágio ativo da doença (Laurenti e cols., 2014), visto que a sensibilidade da imunocromatografia dependeria dos *status* clínico (variabilidade genética do hospedeiro e resposta imune específica) (Grimaldi e cols., 2012). Importante ressaltar que no presente estudo, alguns testes apresentaram reações fracas na linha T, dificultando a correta interpretação do teste, fato este, também referido por Castro-Júnior e cols. (2013).

Alusivo ao ensaio imunoenzimático, quando comparadas as matrizes plasma e soro, houve uma concordância substancial entre elas ( $\kappa = 0,571$ ), embora sejam poucos os estudos que utilizem o plasma para avaliação nos respectivos testes. No entanto, no que tange ao ELISA EIE®, embora ele seja considerado pouco preciso nos casos de cães assintomáticos (Gontijo e Melo,

2004), é importante ressaltar que a especificidade do teste depende dos antígenos utilizados, os quais podem provir de culturas promastigotas ou proteínas recombinantes, sendo esse último considerado mais acurado (Badaró e cols., 1998), pois forneceria uma especificidade entre 90% e 96%, enquanto antígenos brutos proporcionariam especificidade de 87%.

Laurenti (2010) afirma que o antígeno *L. major* utilizado pelo ELISA EIE® produziria resultados falso-positivos e negativos em virtude de provir de uma espécie causadora de leishmaniose cutânea. De acordo com Laurenti (2009 apud SILVA e cols., 2013), a utilização de antígenos homólogos, a exemplo de *L. infantum*, melhoraria a acurácia do teste. Contudo, apesar da maior especificidade do antígeno homólogo, a diferença encontrada não seria significativa para suspender a fabricação do ensaio imunoenzimático com o antígeno *L. major* (Silva e cols., 2013). Desse modo, independente do antígeno utilizado, deve ser levada em consideração a realização de dois testes distintos de modo a aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Em caso de discordância, é indicado repetir o exame ou optar por outro método diagnóstico (Baneth e Aroch, 2008).

Coura-vital e cols. (2014) sugerem que o ELISA EIE® seja utilizado como triagem e o TR DPP® como confirmatório, pois essa estratégia permitiria o diagnóstico em laboratório em virtude de um melhor controle de qualidade (mão de obra especializada) e aumento da credibilidade na leitura dos resultados, visto a necessidade de um leitor óptico para sua confirmação e, sobretudo, pelo baixo custo do ensaio imunoenzimático (US\$1,63) quando comparado com a imunocromatografia (US\$2,72).

Nesse mesmo âmbito, se levarmos em consideração o protocolo indicado pelo MS, apenas uma das 21 amostras seria considerada reagente, sendo excluídas seis amostras que foram reagentes apenas no ensaio imunoenzimático, o que nos leva a repensar o protocolo indicado pelo governo, uma vez que cães possivelmente infectados estariam excluídos do PBCLV (APÊNDICE C).

Além disso, tendo em vista a possibilidade de haver diferença em relação às matrizes soro e plasma pelo teste de ELISA EIE<sup>®</sup>, bem como em relação ao antígeno utilizado, nossos resultados indicam a necessidade de utilizar metodologia adicional para escolha da melhor matriz, como também, confirmação dos reagentes para diagnóstico de LVC.

Em relação a possíveis diagnósticos diferenciais, dos 21 cães considerados reagentes (por imunocromatografia e/ou ensaio imunoenzimático) no presente estudo, cinco foram reagentes para *Anaplasma* spp. pelo SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup>. Como não houve associação entre o ELISA EIE<sup>®</sup> e o SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup>, sobretudo por serem testes independentes, não se pode descartar a presença de coinfeção com *Leishmania* sp e *Anaplasma* spp. ou de resultados falso-positivos para LVC no ensaio imunoenzimático. Apesar da escassez de dados na literatura sobre reação cruzada ou mesmo coinfeção de *Leishmania* spp. com *Anaplasma* spp., em estudo realizado por Souza e cols. (2013) um cão apresentou positividade na sorologia para *L. infantum* e para *Borrelia vogeli* e, concomitantemente, o mesmo foi reagente na nPCR para *Anaplasma* spp., *Leishmania* spp. e complexo *L. donovani*.

Couto e cols. (2010) em estudo utilizando o SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup> bem como o teste *Leishmania* SNAP<sup>®</sup>, encontrou três cães (2,3%) positivos tanto para *Anaplasma* spp. como também para *L. infantum* (coinfeção). Além disso, esse mesmo estudo afirma que a prevalência do *Anaplasma* spp. aparenta ser maior em cães institucionalizados, quando comparado com aqueles oriundos de clínica particular. Do mesmo modo, Miró e cols. (2013), utilizando os mesmos testes diagnósticos, encontraram uma alta positividade entre *Anaplasma* spp. e *L. infantum* em amostras de cães que vivem em ambiente externo (*outdoor*).

É importante salientar que todos os cães avaliados em uma ou ambas as metodologias empregadas neste estudo foram considerados clinicamente assintomáticos e possuíam pulga e/ou carrapato. Estudos indicam que a LVC pode ser transmitida através de ectoparasitas (Coutinho e cols., 2005, Coutinho e Linardi, 2007, Ferreira e cols., 2009, Paz e cols., 2010). O carrapato é o principal responsável pela transmissão de parasitos intracelulares, a exemplo da *Ehrlichia canis* (Ferreira e cols., 2007, Manzillo e cols., 2013) e da *Babesia canis* (Laurenti, 2009, Laurenti, 2014), os quais podem estar concomitantes à LVC ou

interferir nos resultados (falso-positivos). Em nosso estudo, 23,80% dos cães reagentes em um ou ambas as metodologias (ensaio imunocromatográfico e imunoenzimático) foram positivos no ensaio qualitativo (SNAP 4Dx Plus®) para *Anaplasma* spp. De acordo com Otranto e cols., 2010 o *Anaplasma* spp. poderia prejudicar a resposta imune e potencializar a transmissão de outros patógenos ou aumentar a severidade de infecções induzidas por outros parasitos. O resultado de coinfeção deve ser interpretado de acordo com informações da região geográfica, história de exposição ao vetor e *status* clínico do indivíduo (Cardoso e cols., 2012).

Em relação a outros métodos diagnósticos para identificação de LVC, no presente estudo, não foi possível relacionar os testes imunológicos com os parasitológicos, uma vez que tanto a citologia quanto a cultura foram negativas para todas as amostras testadas. De acordo com Brasil (2003) a citologia tem pouca especificidade em cães assintomáticos, sendo a sensibilidade inferior a 30% (Ferrer, 1999), além do fato de cães assintomáticos terem baixo rendimento das formas amastigotas (Mykolanis e cols., 2005). A baixa densidade parasitária pode resultar em falso-negativos na citologia, ou mesmo dificultar a identificação morfológica (Gomes e cols., 2008), aliado ao fato dos parasitos não estarem dispostos de forma homogênea no mesmo tecido (Ferrer e cols., 1988).

Com relação à cultura, a sensibilidade depende de fatores como tipo de meio utilizado e quantidade de material usado na cultura. Amostras colhidas de diferentes linfonodos aumentam a chance de positividade da cultura, quando comparadas ao BAAF de um único linfonodo (Gradoni, 2002) Sendo assim, o não isolamento das formas promastigotas pode estar relacionado à baixa densidade parasitária e ao pouco material colhido na amostragem realizada neste estudo.

De acordo com a OMS (1990), a cultura é a técnica considerada padrão ouro para a identificação de *Leishmania* spp.. Contudo, deve-se levar em consideração a possibilidade de contaminação durante a coleta e a chance do parasito não se adaptar ao meio de cultura, além do fato de que nem todas as cepas crescem com facilidade ou que os tecidos ou órgãos de um mesmo indivíduo não possuem a mesma carga parasitária (Evans, 1989).

Nesse mesmo sentido, a cultura através do sangue não é recomendada, pois além de ser lenta e demorada (Sundar e Rai, 2002), pode gerar metabólitos tóxicos no meio e, por conseguinte, diluir a carga parasitária (Freitas e cols., 2006). Nesse sentido, comparado com a medula óssea, baço e linfonodo, a densidade parasitária no sangue tende a ser menor (Reithinger e cols., 2002) e, por isso, a cultura irá requerer um maior número de ampliações e o uso de um meio rico em nutrientes de modo a assegurar o crescimento, a manutenção e multiplicação da *Leishmania* spp. (Freitas e cols., 2006). Infere-se que o não crescimento das formas promastigotas em cultura de amostra sanguínea pode estar relacionado à baixa densidade parasitária das amostras, fato esse, em concordância com o relatado por Maia e cols. (2010), não podendo ser descartados os demais motivos citados anteriormente.

Consoante a isso, não foi permitido avaliar os métodos diagnósticos no que diz respeito à sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos (negativo e positivo), uma vez que não foi possível definir com exatidão aqueles cães reagentes para LVC através dos testes parasitológicos (padrão-ouro) cujos resultados são essenciais para a realização de tais cálculos e interpretação dos mesmos.

Tendo em vista os resultados imunológicos e parasitológicos, independentemente do método diagnóstico utilizado, a casuística na RMPA ( $\cong 1\%$ ) ainda é baixa, em especial quando comparada com a capital (4,1%) e demais regiões brasileiras. Ainda assim, estudos transversais são essenciais para o aperfeiçoamento da vigilância sanitária e para que condutas adequadas com vistas à profilaxia sejam efetivamente implantadas.

Deve-se levar em consideração também as mudanças climáticas, bem como as migrações e, sobretudo, a proximidade do estado com países fronteiriços com elevada prevalência da doença. Apesar dos custos elevados, pesquisas envolvendo novos ensaios imunológicos devem ser incentivadas e aqueles testes já estabelecidos deveriam ser constantemente reavaliados em áreas geográficas endêmicas e indenes.

Considerando a não concordância entre os diferentes testes diagnósticos apresentada no presente estudo, novas pesquisas devem ser realizadas,

especialmente em áreas não endêmicas, de modo a assegurar um diagnóstico acurado, além da padronização e desenvolvimento de testes com melhor desempenho, visto que inúmeros cães são eutanasiados anualmente com base nesses resultados. Além disso, deve-se atentar ao fato de possíveis reações-cruzadas com outros agentes, o que pode levar à condenação indivíduos falso-positivos para LVC.

Outro ponto a ser ressaltado é a falta de divulgação de dados epidemiológicos envolvendo cães e também de dados humanos os quais se encontram desatualizados. É necessário união entre os Ministérios da Saúde e da Agricultura, de modo que a ação conjunta entre o Poder Executivo e governos estaduais e municipais possam prevenir o avanço da doença e, por conseguinte, salvar vidas.

## 1.6 Conclusão

Diante dos resultados apresentados nosso estudo concluiu que a prevalência da LVC na RMPA ficou em torno de 1% no ensaio imunoenzimático, variando conforme a matriz utilizada e ao redor de 3% no ensaio imunocromatográfico. Esses achados corroboram com a dificuldade de precisão diagnóstica, especialmente em áreas cujo perfil envolvido é o de cães assintomáticos.

## 1.7 Referências

- Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Set-Out;40(5):594-5.
- Krauspenhar C, Beck C, Sperotto V, Silva AA, Bastos R, Rodrigues L. Leishmaniose Visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural.* 2007;37(3):907-10.
- Thomaz-Soccol V, Castro EA, Navarro IT, Farias MR, Souza LM, Carvalho Y, et al. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009 Jul-Set;18(3):46-51.
- Murray HW, Berman JD, Davies C, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366:1561-77.
- Kedzierski L, Evans KJ. Immune response during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitol.* 2014;141(12):1-19.
- Organização Pan-Americana da Saúde. Consulta de experts OPAS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas. 2009.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DM, Barata RA, Paula EV, et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 Mar-Abr;38(2):147-52.
- Maia-Elkhoury ANC, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica.* 2008 Dez;24(12):2941-7.
- Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica.* 2004 Jan-Fev;20(1):259-65.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011;27(09):403-09.
- Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008;175:45-52.
- Albuquerque PLMM, Junior GBS, Freire CCF, Oliveira SBC, Almeida DM, Silva HF, et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-zar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2009;26(4):330-33.
- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 2012;28(12):531-38.
- Griensven JV, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am.* 2012;26:309-22.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009;165:1-18.

Dantas-Torres, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*2006;101(1):117-8.

Gama MEA, Barbosa JS, Pires B, Cunha AKB, Freitas AR, Ribeiro IR, et al. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica.* 1998 Abr-Jun;14(2):381-90.

Savani ESMM, Schimonsky BV, Camargo MCGO, D'áuria SRN. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. *Rev Saude Publica.* 2003;37(2):260-2.

Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):951-8.

Rosypal AC, Zajac AM, Lindsay DS. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet Clin Small Anim.* 2003;33:921-37.

Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas e kalazar. *Endemias [periódico na Internet].* 2003 [acesso em 2013 Fev];[aproximadamente 4 p.]. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/inter/0410113/downloads/kalazar.pdf>

Marcondes CB. *Entomologia médica e veterinária.* 2ª ed. São Paulo: Atheneu;2011.

Oliveira SS, Araújo TM. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cad Saude Publica.* 2003 Nov-Dez;19(6):1681-90.

Costa CHN, Tapety CMM, Werneck, GL. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Jul-Ago;40(4):415-19.

Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomya longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saude Publica.* 2003 Set-Out;19(5):1373-80.

Costa CHN. Characterization and speculation on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2008 Dez;24(12):2959-63.

Souza MB, Marzochi MCA, Carvalho RW, Ribeiro PC, Pontes CS, Caetano JM, et al. Ausência de *Lutzomya longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no município do Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica.* 2003 Nov-Dez;19(6):1881-5.

Costa PL, Dantas-Torres F, Silva FJ, Guimarães VCFV, Gaudêncio K, Brandão-Filho SP. Ecology of *Lutzomya longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. *Acta Trop.* 2013;126:99 -102.

Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci.* 2002;72:83-6.

Baneth G, Solano-Gallego L. Leishmanioses. In: Greene C. Infectious diseases of the dog and cat. New York: Elsevier;2012.p.734-49.

Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votypka J, Volf P. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. PLoS Negl Trop Dis.2011;5(6):1-6.

Otranto D, Dantas-Torres, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol. 2013 Jul;29(7):339-345

Killick-Kendrick R. The Biology and Control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol. 1999;17:279-289.

Rio Grande do Sul; Divisão de Vigilância Epidemiológica. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Porto Alegre: 2011;13(1):1-8.

Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes Infect. 2007;9:317-24.

Queiroz NMGP, Silveira RCV, Noronha Jr ACF, Oliveira TMFS, Machado RZ, Starke-Buzzeti WA. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. Vet Parasitol. 2011;178:1-8.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet Parasitol. 2007;147:320-5.

Alves GBB, Pinho FA, Silva SMMA, Cruz MSP, Costa FAL. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Braz J Med Biol Res.2010; 43(3) 310-15.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Moura-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? Res Vet Sci. 2009;87:260-2.

Laurenti MD, Rossi CN, Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. Vet Parasitol. 2013;196:296-300.

Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F, Lima VMF. Potencial role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp.. Vet Parasitol.2009;165:150-4.

Paz GF, Ribeiro MFB, Magalhães DF, Sathler KPB, Morais MHF, Fiúza VOP, et al. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: a case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. Prev Vet Med. 2010;97:131-3.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara T, Botelho JR, Maria MD, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2005;128:149-55.

- Silva FL, Rodrigues AAM, Rego IOP, Santos RLH, Oliveira RG, Silva TMA, et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2008;151:86-90.
- Paz GF, Reis IA, Avelar DM, Ferreira ECM, Werneck GL. Ectoparasites and anti-*Leishmania* antibodies: Association in an observational case-control study of dogs from a Brazilian endemic area. *Prev Vet Med.* 2013;112:156-9.
- Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol.* 2005;42:650-8.
- Silva FL. Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania chagasi* e soroconversão de cadelas acasaladas com cães portadores [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais;2007.
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos, RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;160:55-9.
- Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected tissues from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol.* 2009;165:327-31.
- Petersen CA. New means of canine leishmaniasis transmission in North America: the possibility of transmission to humans still unknown. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009 Mar:1-5.
- Boggiatto PM, Gibson-Corley N, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(4):1-6.
- Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol.* 2006;137:159-67.
- Dantas-Torres F. The role of dog as reservoir of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007;149:139-146.
- Muniz LHG, Rossi RM, Neitzke HC, Monteiro WM, Teodoro U. Estudo dos hábitos alimentares de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. *Rev Saude Publica.* 2006;40:1087-93.
- Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad Saude Publica.* 2005 Jan-Fev;21(1):324-8.
- Oliveira CDL, Morais MHF, Machado-Coelho, GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad Saude Publica.* 2008 Dez;24(12):2953-8.
- Frehse MS, Júnior HG, Ullmann LS, Camossi LG, Machado JG, Langoni H, et al. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;10(1):64-6.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002;104:275-85.

Penaforte KM, Belo VS, Teixeira-Neto RG, Ribeiro RAN, Oliveira RB, Schettini DA, et al. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22(4):592-96.

Curi NHA, Pascoal AMO, Massra RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani R, et al. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around atlantic forest fragments. *Plos One.* 2014;9(8):1-11.

Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Queiroz JW, et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of northeast Brazil. *Res Vet Sci.* 2009;86:267-73.

Palatnik-de-Souza CB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2011;197(4):1-10.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeaud P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7):324-30.

Silva JP, Werneck GL, Macedo EC, Carvalho H, Cruz MSP. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Jul-Ago;45(4):480-4.

Zanet S, Sposimo P, Trisciuglio A, Giannini F, Strumia F, Ferroglio E. Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. *Vet Parasitol.* 2014;199:247-9.

Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol.* 2011;181:23-30.

Soares IR, Silva SO, Moreira FM, Prado LG, Fantini P, Maranhão RPA, et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2013;197:665-9.

Souza TD, Turchetti AP, Fujiwara RT, Paixão TA, Santos RL. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet Parasitol.* 2014;200:233-41.

Best MP, Ash A, Bergfeld J, Barret J. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. *Vet Parasitol.* 2014;202:292-5.

Malta MCC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira ALS, Costa EA, Santos RL. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet Parasitol.* 2010;169:193-7.

Otranto D, Testini G, Buonavoglia C, Parisi A, Brandonisio O, Circella E, et al. Experimental and field investigation on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum* with emphasis on the domestic chicken. *Acta Trop.* 2010;113:80-3.

Côrrea APFL, Dossi ACS, Vascelos RO, Munari DP, Lima VMF. Evaluation of transformation growth factor  $\beta$ 1, interleukin-10 and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Parasitol.2007;143:267-74.

Tizard IR. Imunologia veterinária: uma introdução. 6ª ed. São Paulo: Roca;2002.

Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amazon Saude.2012;3(2):47-57.

Freire SM. Células T reguladoras (T reg) e sua relação com as alterações esplênicas e com as manifestações clínicas de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* [mestrado]. Teresina: Universidade Federal do Piauí;2010.

Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res.2003;36(4):485-9.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol. 2008;158:274-87.

Lima VMF, Peiro JR, Vasconcelos RO. IL-6 and TNF- $\alpha$  production during active canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol.2007;115:189-93.

Nascimento, MSL. Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum/chagasi* [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;2012.

Gama MEA, Gomes CMC, Silveira FT, Laurenti MD, Gonçalves EG, Silva AR, et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. Rev Soc Bras Med Trop.2013;46(6):741-5.

Neto RGT, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RWA, Coura-Vital W, Quaresma PF, et al. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2010;169:248-57.

Andrade HM, Toledo VPCP, Mayrink W, Genaro O. Passive transmission of humoral and cellular immunity in canine visceral leishmaniasis. Revue Méd. Vét.2001;152(4):317-24.

Marcondes JS, Feitosa FLF, Ikeda-Garcia FA, Lima VMF, Perri SHV, Feitosa MM. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. R Bras Ci Vet. 2006;13(1):20-4.

Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, et al. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid 50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. Vet Parasitol. 2007;144:270-8.

Moshfe A, Mohebal M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, et al. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. Acta Trop. 2009;112:101-5.

Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Parasitol. 2005; 127:227-32.

Fisa R, Gallego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, et al. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by Dot-ELISA. J Vet Diagn Invest. 1997;9:50-5.

Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVMR, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol. 2007;147:67-76.

Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. Acta Trop. 2004;92:43-53.

Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. Biomed Res Inter. 2013;1-6.

Genaro O. Leishmaniose visceral canina experimental [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas;1993.

Ribeiro RR, Silva SM, Fulgêncio GO, Michalick MSM, Frèzard FJG. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. Rev Bras Parasitol Vet. 2013 Jul-Set;22(3):373-78.

Carvalho CA, Partata AK, Hiramoto RM, Borborema SET, Meireles LR, Nascimento, et al. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminar results in canine and human samples. Acta Trop. 2013;123:128-36.

Marquez M, Pedregosa JR, Lópes J, Marco-Salazar P, Fondevila D, Pumarola M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. J Vet Diagn Invest. 2013;25(1):142-6.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). Clin Vet. 2000; 28: 36-44.

Medeiros CMO, Melo AGC, Lima AKF, Silva ING, Oliveira LC, Silva MC. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. Ci Anim. 2008;18(1):43-50.

Petersen CA, Barr SC. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? Vet Clin Small Animal. 2009;39:1065-74.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Leal GGA, Moreira ND et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. Plos one.2014;9(3):1-6.

Braga MDM, Coêlho ICB, Pompeu MMLP, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, et al. 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. Rev Soc Bras Med Trop. 1998 Set-Out;31(5):419-24.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. Vet Parasitol.2011;179:257-61.

Zanette MF, Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RFC, et al. Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. Ver Soc Bras Med Trop. 2014;47:1-3.

Barros JHS, Almeida ABPF, Figueiredo FB, Sousa VRF, Fagundes A, Pinto AGS, et al. Trans R Soc Trop Med Hyg.2012;106:419-23.

Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol. 2007;146:245-41.

Manzillo VF, Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Papparcone R, Fiorentino E, et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by Leishmania infantum. PLOS Negl Trop Dis. 2013;7(5):1-8.

Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. BEPA. 2009;67(6):13-23.

Soares MRA, Mendonça IV, Bonfim JM, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. Acta Trop. 2011;117:6-9.

Mykolanis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs affected with *Leishmania infantum*. Vet Clin Pathol. 2005;34(3):243-7

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbetti CEP. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2002;39(2):103-6.

Silva AK, Bonello FL, Baratelli SC, Pinheiro A, Santana EA, Silva FP, et al. Avaliação parasitológica em amostras obtidas de linfonodos e medula óssea de cães sorologicamente positivos para leishmaniose. *Cien Agr Saude.* 2007;7:7-12.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia FR, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007;145:245-52.

Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Neto LS, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2010;173:330-3

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop.* 2008;107:205-7.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using a immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;10(7):2352-6.

Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Leone N, Caprariis D, Chirico J, et al. Recombinant K39 Dipstick Immunochromatographic Test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17:32-7.

Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Filho CJLB, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet J.* 2013;195:252-3.

Souza BMPS, Rebouças MF, Oliveira LS, Freitas DS, Julião FS, Alcântara AC, et al. Comparação entre diferentes preparados proteicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. *RBSPA.* 2004;5(1):31-40.

- Grimaldi Jr G, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:54-9.
- Coura-Vital W, Reis AB, Reis LES, Braga SL, Roat BM, Aguiar-Soares RDO, et al. Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Vet Parasitol.*2013;197:411-7.
- Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Decreto 51.838 de 14 de março de 1963. Baixa Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses.
- Santos JML, Dantas-Torres F, Mattos MRF, Lino FRL, Andrade LSS, Souza RCA, et al. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(1):41-5.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria interministerial nº.1426 de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano e não registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
- Costa CHN. Mudanças no controle da leishmaniose no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001 Mar-Abr;34(2):223-28.
- Gavilani ASM, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. *Lancet.* 2002; 360:374-9.
- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55:125-30.
- Werneck GL. Fórum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saude Publica.* 2008 Dez;24(12):2937-40.
- Rey LC, Martins CV, Ribeiro HB, Lima AAM. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. *J Pediatr.* 2005; 81(1):73-8.
- Kim DY, Reilly TJ, Schommer SK, Spagnoli ST. Imported leishmaniasis in dogs, US military bases, Japan. *Emerg Infect Dis.*2010;16(12):2017-8.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:239-243.
- Nascimento BWL, Saraiva L, Neto RGT, Meira PCLS, Sanguinette CC, Tonelli GB et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state – Brazil. *Acta Trop.* 2013;125:262-8.
- Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis: epidemiological report of the Americas. 2014;2:1-4.
- Thakur CP. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:156-7.
- Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.*2014;6:147-54.

Peixoto HM, Oliveira MRF, Romero GAS. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health*. 2014;20(3):1-17.

Melo EC, Fortaleza CMCB. Challenges in the therapy of visceral leishmaniasis in Brazil: a public health perspective. *J Trop Med*. 2013;1-5.

Borges KE, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DC, Ribeiro LML et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2008;24(4):777-84.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, Brasília. 120p, 2006.

Araújo VEM, Pinheiro LC, Almeida MCM, Menezes FC, Morais MHF, Reis IA, et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *Plos Negl Trop Dis*. 2013;11(7):1-9.

Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*. 2008;107:205-207.

Reinhold-Castro KR, Scodro RBL, Dias-Svertutti AC, Neitzke HC, Rossi RM, Kuhl JB, et al. Avaliação de medidas de controle de flebotomíneos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;3:269-76.

Amora SSA, Bevilacqua ML, Feijó FMC, Alves ND, Maciel MV. Control of phlebotomine (Diptera:Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotrop Entomol*. 2009;38:303-10.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1997;11:105-11.

Manzillo VF, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol*. 2006;142:142-5.

Fraga DBM, Solcà MS, Silva VMG, Borja LS, Nascimento EG, Oliveira GS, et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. *Vet Parasitol*. 2012;190:591-94.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº. 31 de 9 de julho de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação, registro e renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina.

Amazigo UV, Leak SGA, Zoure HGM, Njepuome N, Lusamba-Dikassa PS. Community-driven interventions can revolutionise control of neglected tropical diseases. *Trends Parasitol.* 2012;28(06):231-38.

Monteiro SG, Stainki DR, Dalmolin F, Braccini ET, Filho STLP, Gaira MS, et al. Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: uma contribuição para a discussão das leishmanioses na região sul do Brasil. *Vet Zootec.* 2010;17(4):497-501.

Zuben APB, Angerami RN, Castagna C, Baldini MBD, Donalisio MR. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(3):385-8.

Organização Mundial da Saúde. Guidelines for dog population management. Genebra;1990.

Laurenti MD, Santana Leandro Júnior MV, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2014;205:444-50.

Castro-Júnior JG, Freire ML, Campos SPS, Scopel KKG, Porrozzi R, Silva ED, et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual path platform (DPP®) and pcr assays. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2013;56(3):225-9.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Ver Bras Epidemiol.* 2004;7(3):338-49.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto E, et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1998;173:758-61.

Laurenti MD. Patologia das leishmanioses [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2010.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis a diagnostic and clinical challenge. *Vet J.* 2008;175:1-14.

Souza KCM, André MR, Herrera HM, Andrade GB, Jusi MMG, Santos LL, et al. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal.* 2013;22(4):525-31.

Couto CG, Lorentz L, Beall MJ, Shields J, Bertolone N, Couto IJ et al. Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10(9):885-8

Miró G, Montoya A, Roura X, Gálvez R, Sainz A. Seropositivity rates for agents for canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasite Vectors.* 2013;117(6):1-9.

Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Diniz PPVP, Caprariis D, et al. Diagnosis of canine vector-borne diseases in Young dogs: a longitudinal study. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3316-24.

Cardoso L, Mendão C, Carvalho LM. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study. *Parasit vectors.* 2012;62(5):1-9.

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

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of the International Canine Leishmaniasis . Fórum Barcelona-Spain.1999:6-10.

Ferrer LM, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*1988;29(6):381-8.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum Sevilha-Spain 2002:7-14.

Evans D (1989). Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania. UNDP/ World Bank/ WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Genova: WHO

Maia C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop.*2010;116:193-9.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil epidemiológico e clínico da LV em cães da região metropolitana de Porto Alegre.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população de estudo na região metropolitana de Porto Alegre (municípios de Canoas, São Leopoldo e Novo Hamburgo);
- Caracterizar o perfil clínico dos cães;
- Detectar a reatividade para LV em amostras sanguíneas de cães através de ensaio imunocromatográfico (TR DPP®) e imunoenzimático (ELISA EIE®);
- Relacionar os testes imunológicos com aqueles parasitológicos;
- Avaliar a casuística da doença na região metropolitana de Porto Alegre.
- Investigar possíveis diagnósticos diferenciais com: *Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis*;

1 **3 Artigo científico redigido em inglês**

2  
3 Artigo a ser submetido para “Veterinary Parasitology” (ISSN: 0304-4017 e fator  
4 de impacto 2,545).

5  
6 **Canine visceral leishmaniasis prevalence in metropolitan area of**  
7 **Porto Alegre, Southern Brazil**

8  
9 Emeline de Oliveira Riboldi<sup>1</sup>, Pedro Roosevelt Torres Romão<sup>2</sup>, Regina Bones  
10 Barcellos<sup>3</sup>, Maria Lúcia Rosa Rosseti<sup>3</sup>, Rosemari Terezinha de Oliveira<sup>4</sup>, Eliane  
11 Dallegrave<sup>1\*</sup>

12  
13 <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências  
14 da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90050-  
15 170, Brazil

16 <sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação  
17 em Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Básicas da Saúde,  
18 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto  
19 Alegre, RS, 90050-170, Brazil

20 <sup>3</sup>Centro de Desenvolvimento Científico Tecnológico. Fundação Estadual de  
21 Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, Rio Grande do  
22 Sul, CEP 90610-000

23 <sup>4</sup>Laboratório Pathos, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, CEP 90670-120

24  
25  
26  
27  
28  
29  
30 \*Corresponding author: Eliane Dallegrave

31 Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde  
32 de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre 90050-170, Rio Grande do Sul,  
33 Brazil. Phone: +55 5133038794

34 E.mail address: [elianedal@ufcspa.edu.br](mailto:elianedal@ufcspa.edu.br) (E. Dallegrave).

35

36 **Abstract**

37

38 Visceral leishmaniasis is one of the most important neglected diseases, widely  
39 distributed in the world. It is caused by parasites from *Leishmania* genus and  
40 transmitted by female sandflies (*Lutzomyia* sp.). Ninety percent of cases  
41 registered in America occur in Brazil and the disease is currently growing and  
42 becoming urbanized, especially in areas previously considered indene, such as  
43 the state of Rio Grande do Sul. The dog (*Canis familiaris*) is considered the main  
44 domestic reservoir. This study aimed to evaluate the prevalence of canine  
45 visceral leishmaniasis (CVL) in the metropolitan area of Porto Alegre (MAPA)  
46 using immunochromatographic (TR DPP<sup>®</sup>) and enzyme-linked immunosorbent  
47 (ELISA EIE<sup>®</sup>) assays. Samples (n=405) of serum and plasma were obtained from  
48 blood of dogs from the municipalities of Canoas (n=107), São Leopoldo (n=216)  
49 and Novo Hamburgo (n=82). Immunochromatographic assays found a  
50 prevalence of 2.96% in the studied municipalities. Enzyme-linked immunosorbent  
51 assays pointed to a variable prevalence of 1.23% (plasma) and 0.98% (serum).  
52 Cytology and *in vitro* culture were performed on samples considered reactive  
53 and/or undetermined in either assay. Amastigote and promastigote forms were  
54 not visualized. A correlation between diagnostic methods could not be found  
55 using Kappa's coefficient (k=-0,364), although a substantial correlation was  
56 identified comparing serum and plasma matrices (k=0,571). Although 23.8% of  
57 reactive samples for CVL were also reactive for *Anaplasma* spp. in a differential  
58 diagnostic test (SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup>), no association was found according to Fisher's  
59 exact test between ELISA EIE<sup>®</sup> and SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup>. However, we cannot  
60 discard false-positives CVL individuals (cross reacted) or even coinfection. In this  
61 study we found a prevalence of about 1% for CVL in MAPA using ELISA EIE<sup>®</sup>  
62 assay, varying according to the matrice used and around 3% using  
63 immunochromatographic test. These data are in accordance with previous results  
64 in non-endemic areas with predominance of asymptomatic dogs.

65

66 Keywords: *Leishmania*, canine visceral leishmaniasis, prevalence, dogs,  
67 imunochromatographic test, ELISA.

68

## 69 1. Introduction

70

71           Visceral Leishmaniasis (VL), also known by the name of Kalazar (“kala-  
72 azar”), is a disease of international importance (Andrade et al., 2007,  
73 Krauspenhar et al., 2007) and is transmitted by female sandflies of the *Lutzomya*  
74 genus. When it is a zoonosis, it uses the dog (*Canis familiaris*) as its reservoir;  
75 when called an anthroponosis or an anthropozoonosis, it has the humans as the  
76 main actor in its transmission cycle (Monteiro et al., 2005).

77           The visceral manifestation of the disease is associated with infection from  
78 parasites of the *Leishmania* subgenus grouped in the phenotypic complex  
79 *Leishmania (Leishmania) donovani* [*Leishmania (L.) donovani*, *Leishmania (L.)*  
80 *infantum*, *Leishmania (L.) chagasi*]. Some researchers believe that the *L. chagasi*  
81 – discovered in Brazil in 1913 by Chagas and Cunha – is the same etiological  
82 agent of *L. infantum*, introduced in South America by European immigrants during  
83 the Portuguese and Spanish colonization (Solano-Gallego et al., 2009). The  
84 disease is distributed throughout tropical and subtropical regions in Asia, Africa,  
85 the Middle East, Central and South America (Gomes et al., 2008). Brazil registers  
86 around 90% of all cases in the Americas (Albuquerque et al., 2009).

87           According to the World Health Organization (WHO), it is among the six most  
88 important diseases caused by protozoan (Thomaz-Soccol et al., 2009) and it is  
89 classified as Category 1 – emergent and uncontrolled disease (Murray et al.,  
90 2005). Among tropical diseases, it is the second in mortality and the fourth in  
91 morbidity (Kedzierski e Evans, 2014) and according to the Pan American Health  
92 Organization (PAHO) VL is considered an disease of hard control with the tools  
93 currently available. If untreated, it may bring to death 95% of the individuals

94 (Maia-Elkhoury et al., 2008), especially those immunosuppressed (Alves e  
95 Bevilacqua, 2004, Harhay et al., 2011).

96 Brazil is one of the most affected countries, with 4.200 to 6.300 related cases  
97 per year (Peixoto et al., 2014). In Brazil mortality rates in 1994, 2003 and 2009  
98 were respectively 3.4%, 8.5% and 5.8% (Melo e Fortaleza, 2013). Most human  
99 deaths are not recorded and that the mortality rate is around 10% and 20%  
100 (20.000 – 40.000), even with adequate treatment (Alvar et al 2012, Ready, 2014).

101 In Brazil as in other countries, leishmaniasis is currently under a process of  
102 epidemiological transition, with a rise of its incidence in endemic areas,  
103 urbanization of the disease and geographic expansion to the Southern of the  
104 country (Gama et al., 1998; Savani et al., 2003; Alves e Bevilacqua, 2004;  
105 Andrade et al., 2007). The state of Rio Grande do Sul, after the confirmation of  
106 an autochthonous case of Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) and registration  
107 of *Lutzomia longipalpis* in the city of São Borja, stopped being considered an  
108 indene region in 2008 (Rio Grande do Sul, 2011). Thus, considering that VL is  
109 entering regions and/or cities that were previously considered harmless, and the  
110 current lack of knowledge regarding the prevalence of CVL in all studied  
111 municipalities, this study evaluated the epidemiological and clinical profile of CVL  
112 in the Metropolitan Area of Porto Alegre (MAPA).

113

## 114 2. Methodology

115

116 The epidemiological profile was conducted by means of a transversal study  
117 based in an epidemiologic inquiry, characterization of the animals, clinical  
118 evaluation and gathering of samples for running CVL diagnostic tests in dogs  
119 from kennels of the MAPA.

120

### 121 2.1. Studied area

122

123 The study was conducted in kennels located in the municipalities of Canoas  
124 (latitude 29° 55'8'' and longitude 51° 10' 41''), São Leopoldo (latitude 29° 45' 39''  
125 and longitude 51° 9' 8'') e Novo Hamburgo (latitude 29° 41' 5'' and longitude 51°  
126 8' 31''), which integrate the Metropolitan region of the state's Capital City, Porto  
127 Alegre. Canoas is 24 km apart from São Leopoldo, which is 8.2 km distant from  
128 Novo Hamburgo.

129 According to Köppen-Geiger classification, the climate in those municipalities  
130 is Cfa (humid and temperate Climate with a hot summer). Canoas is located 15  
131 meters above sea level, with an average temperature of 19.4°C and average  
132 rainfall of 1,418 mm/year. São Leopoldo is 6 meters above sea level, has an  
133 average temperature of 19.5°C and average rainfall of 1,440 mm/year. Novo  
134 Hamburgo is at 43 meters above sea level, with an average temperature of  
135 19.4°C and average rainfall of 1,467 mm/year. Canoas and Novo Hamburgo's  
136 kennels are located in urban areas, while São Leopoldo's Kennel lies in an area  
137 which holds both urban residences, rural homes and lush vegetation, which  
138 characterizes a transition area.

## 139 2.2 Ethics

140

141 The project was approved by the Comitêe of Ethics in the Use of Animals  
142 (CEUA) of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
143 (UFCSPA), under reference number 118/13. The dog's legal guardians were  
144 informed about the objectives of the research and signed consent forms before  
145 samples were collected and the data analyzed.

146

## 147 2.3 Characterization of the animals and studied population

148

149 The anamnesis and clinical evaluation of each dog was conducted by  
150 means of an epidemiological inquiry, in which we also characterized the  
151 population according to sex, race, coat type (short or long) and reproductive  
152 capabilities. Blood samples were collected from 405 mongrel dogs from the  
153 municipalities of Canoas (n=107), São Leopoldo (n=216) and Novo Hamburgo  
154 (n=82). The exclusion criteria covered puppies, aggressive dogs and those  
155 immunized against CVL.

156

## 157 2.4 Collection and processing of samples

158

159 Blood samples were collected through venipuncture of jugular or cephalic  
160 veins (1 ml in EDTA tubes and 2 ml in tubes with gel separators). Samples were  
161 centrifuged at 2.000 rpm for 10 minutes and aliquots of serum and plasma were  
162 kept at -80°C until the serological tests were made. Dogs whose serological tests  
163 were considered reactive or indeterminate were submitted to a second blood

164 sampling in heparinized tubes and puncture of mandibular, cervical or popliteal  
165 lymph nodes for parasitological tests. An equal number of non-reactive dogs were  
166 included for matched control. Time spent between collection and processing of  
167 the material at the laboratory was of approximately 3 hours. To evaluate possible  
168 cross reaction with other diseases in serological tests (false-positives) or that  
169 could co-infect patients, a SNAP 4DX Plus® was conducted with samples that  
170 were either positive or suspicious in one or both tests.

171

### 172 3. Diagnostic tests

173

#### 174 3.1. Dual Path Platform (DPP®)

175

176 DPP® is a qualitative immunochromatographic assay test developed by  
177 Fundação Oswaldo Cruz (TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina, Fiocruz/Bio-  
178 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) to give a fast diagnosis for CVL, especially  
179 in places either isolated or unable to send material to reference laboratories.  
180 Since 2012, the Brazilian Ministry of Health recommends the use of DPP for  
181 screenings of CVL (joint technical note number 01/2011 –  
182 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS), allowing for the use of peripheral blood (ear tip),  
183 venous blood, serum or plasma. The test uses a combination of protein A  
184 conjugated with colloidal gold particles and *Leishmania* antibodies. Afterwards,  
185 they react with recombinant antigens from *L. infantum* connected to a  
186 nitrocellulose membrane (solid fase). The result is considered positive if a pink  
187 line shows up in both the test (T) and control (C) lines; negative when no line  
188 shows up in T line; and invalid when line C fails to appear. The plasma of positive

189 dog was used as control. Tests that showed weak reactions in T line, obscuring  
190 precise interpretations, were repeated.

191

### 192 3.2. Enzyme-linked immunosorbent test (ELISA EIE®)

193

194 The ELISA EIE® test (Fiocruz/Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) has  
195 been used since 2012 as a means to confirm TR DPP® results. The test uses  
196 soluble and purified *L. major* antigens (the species responsible for cutaneous  
197 leishmaniasis), obtained from *in vitro* culture. The test was performed according  
198 to the manufacturer's instructions. To better classify undetermined values, we  
199 considered a minimum and maximum interval of 10% from the cut off (CO). Thus,  
200 we classified samples with Optical Density (DO) equal or superior to the CO as  
201 reactive; those with DO below CO were considered non-reactive; and samples  
202 whose values were between minimum and maximum intervals were classified as  
203 undetermined.

204 Serum samples from all dogs (N=405) were tested with ELISA EIE®. Results  
205 classified as reactive or undetermined in ELISA EIE® and/or TR DPP® were  
206 retested with ELISA EIE® in serum and plasma matrices. The plasma of a positive  
207 dog was used as control. Reactive individuals in at least one of the matrices were  
208 considered positive in the immunoenzymatic test.

209

### 210 3.3. SNAP 4DX Plus®

211

212 SNAP 4DX Plus® (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) is a  
213 qualitative immunoassay based in immunoenzymatic technology for fast

214 diagnosis. The test detects antigens from *Dirofilaria immitis* and antibodies from  
215 *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia*  
216 *canis* in canine serum, plasma and blood. In this study 21 samples of plasma with  
217 reactive or undetermined results in TR DPP®, ELISA EIE® or both techniques  
218 were tested. The test was performed according to the manufacturer's  
219 instructions.

220

#### 221 3.4. Cytology

222

223 To performed cytology analyses, a sample from either mandibular, cervical  
224 or popliteal lymph node was collected through fine-needle aspirated biopsy by  
225 (FNAB). After collection, a smear of lymph node cells was prepared and stained  
226 by rapid panoptic. The presence of amastigote forms was investigated through  
227 optical microscopy (Olympus CX 22LED - augment 1000x).

228

#### 229 3.5. *In vitro* culture

230

231 For *in vitro* culture, heparinized blood samples and mandibular, cervical or  
232 popliteal lymph node samples were collected through FNAB using syringes  
233 containing 1 ml of alkaline phosphate buffer (PBS) and 50 U/ml of penicillin, and  
234 afterwards inoculated in a 5 ml medium. Aspirated samples were kept under  
235 refrigeration for 2 to 3 hours until be processed.

236 Buffy coat and aspirated lymph nodes samples were inoculated in specific  
237 medium for *Leishmania* growth. Two different mediums were used: RPMI and  
238 M199 supplemented with FBS 20% and human urine 2%. Culture bottles were

239 incubated at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  and weekly analyzed under inverted microscope during 4  
240 weeks.

241

#### 242 4. Statistical analysis

243

244 The program SPSS version 18.0 was used for statistical analysis of the  
245 results, with data presented in frequency and percentage. Chi-square test and  
246 Fisher's exact test were used to evaluate the association between diagnostic  
247 tests. The agreement was found using Kappa's coefficient.

248

#### 249 5. Results

250

251 Based on the epidemiological inquiry made with dogs from the MAPA  
252 (N=405), we could characterize the sample according to the data presented in  
253 Table 1. Most of the sample was composed by sterilized dogs (78.76%) with  
254 short-length coat (82.71%). Concerning sex, the male and female population was  
255 balanced when the whole sample was analyzed, however in the municipalities of  
256 São Leopoldo and Novo Hamburgo, most of the population was composed of  
257 females (60.68% and 59.75%, respectively), while in Canoas it was the contrary  
258 (29.9%) (Table 1).

259

260 Regarding the sanitary status, in general most animals presented normal  
261 clinical parameters and body conditions, although the presence of ectoparasites  
262 was often observed. Besides that, some dogs presented skin diseases, such as  
263 allergic dermatitis to ectoparasite bites (ADEB) (n=4) and scabies (n=3); nodules  
(in breasts or limbs) (n=6); transmissible venereal tumors (TVT) (n=2), emaciation

264 (n=1), onychogryphosis (n=2) and sicca keratoconjunctivitis (n=1). Considering  
265 specific signals for CVL, it is important to point out that the observed signs, such  
266 as nodule reactions, eye injuries, and onychogryphosis were isolated  
267 manifestations in a few animals. Furthermore, there was no classic manifestation  
268 of symptoms in any single individual, being all animals considered asymptomatic  
269 for CVL (Table 1).

270 The prevalence of CVL in the studied area was calculated using the results  
271 of immunochromatographic and enzyme-linked immunosorbent assays from  
272 dog's serum and plasma samples. Relative to the results found in the  
273 immunochromatographic assay, a total of 12 plasma samples were considered  
274 reactive, 5 of them from Canoas, 6 from São Leopoldo and 1 from Novo  
275 Hamburgo (Table 2), with a prevalence of 4.67%, 2.77%, 1.21% for each  
276 Municipality respectively, and 2.96% for the studied area as a whole.

277 According to the enzyme-linked immunosorbent assay using canine serum  
278 samples, 1 reactive sample and 3 undetermined were found in Canoas, while 1  
279 reactive and seven were considered undetermined in São Leopoldo. Novo  
280 Hamburgo did not present any reactive or undetermined sample. Reactive and  
281 undetermined samples in ELISA EIE<sup>®</sup> that were positive in TR DPP<sup>®</sup> were  
282 retested using serum and plasma using enzyme-linked immunosorbent assays.  
283 Samples retested with plasma revealed five reactive and six undetermined.  
284 Assays with serum detected four reactive and four undetermined samples (Table  
285 2).

286

287 According to the entire sample by municipality, the prevalence in Canoas and  
288 São Leopoldo was 1.86% (n=2) and 1.38% (n=3) in the plasma matrix and 1.86%  
289 (n=2) and 0.92% (n=2) in the serum matrix, respectively. The prevalence of  
290 undetermined plasma samples was of 0.93% (n=1) and 2.31% (n=5) for the  
291 municipalities of Canoas and São Leopoldo, respectively, while the serum  
292 prevalence of undetermined samples was of 1.85% (n=4) in the city of São  
293 Leopoldo. The prevalence in the municipalities determined by ELISA EIE<sup>®</sup> varied  
294 from 1.23% (n=5) (plasma) and 0.98% (n=4) (serum). Among samples  
295 considered undetermined, prevalence was of 1.48% (n=6) (plasma) and 0.98%  
296 (n=4) (serum) (Table 2).

297 Among animals considered reactive in at least one of the diagnostic tests  
298 employed, regardless of the matrix used, the population (n=17) was  
299 characterized as being composed by short-length coat dogs (82.35%), sterilized  
300 (61.9%) and asymptomatic (94.11%). Although one dog from Canoas presented  
301 a limb node, this sign was not related to CVL. Relative to sex, the reactive  
302 population in the municipalities of São Leopoldo and Novo Hamburgo was  
303 composed in majority by females, while in Canoas the dogs were male (Table 3).

304 Regarding to the distribution of reactive and undetermined samples (n=21),  
305 10 samples were considered reactive only in TR DPP<sup>®</sup>, 5 only in ELISA EIE<sup>®</sup>, 2  
306 in both assays and 4 undetermined in ELISA EIE<sup>®</sup>, regardless of the matrix  
307 (Figure 1).

308

309        Considering the results of SNAP 4Dx PLUS<sup>®</sup> performed with reactive and  
310        undetermined samples (n=21) in assays for CVL, 23.80% (n=5) were reactive  
311        only to *Anaplasma spp.* (Table 2). The table 5 presents the results of serological  
312        tests for CVL and SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup>, demonstrating that there is no correlation  
313        between results.

314        Comparing the immunochromatographic and enzyme-linked immunosorbent  
315        assays using Kappa's coefficient, no correlation was found between diagnostic  
316        methods (  $P = 0.061$  e  $\kappa = -0.364$ ). Nevertheless, accordance was found between  
317        serum and plasma matrices referring to the enzyme-linked immunosorbent assay  
318        ( $P = 0.028$  e  $\kappa = 0.571$ ) and between tested and retested serum samples ( $P =$   
319         $0.035$  e  $\kappa = 0.615$ ). Concerning ELISA EIE<sup>®</sup> and SNAP 4Dx Plus<sup>®</sup> tests, which  
320        are considered independent, it was not found association ( $P = 0.110$ ).

321

## 6. Discussion

Considering the epidemiology of CVL in Brazil, the prevalence of 1% found by the enzyme-linked immunosorbent assay for the cities of metropolitan area of Porto Alegre is considered very low, confirming data previously established for cities in the Southern of Brazil (Rio Grande do Sul, 2011). It is important to highlight that the current study provides the first data for CVL prevalence in this region and that the surveillance is necessary, considering the potential risk of dissemination of disease. According to Gama et al. (1998) and Costa et al. (2007), environmental changes due to intense migration following socioeconomical pressure, accompanied by growing urbanization partially explain the expansion of CVL and the appearance of new *Leishmania* focus. The disease present a higher frequency in warmer areas, with a dry climate and an annual rainfall of 550 mm. The transmission peak occurs in regions with high temperatures and high air humidity, mostly in the course of the rain season (Monteiro et al., 2005). Moreover, the establishment of CVL in new geographic areas is related to the migration of dogs and humans either parasitized or susceptible (Dantas-Torres et al., 2012). The dogs included in this study were located in urban or close-to-urban areas, near Porto Alegre, whose prevalence in 2008 was evaluated in 4.1% (Rio Grande do Sul, 2011).

The canine population included in this study was mainly composed by females, short-length coat individuals and sterilized dogs. Characteristics of the infected population differ according to the region, with an absence of consensus among researchers regarding the prevalence of the disease by sex. However, short-length coat dogs would be more inclined to be bitten by the vector, which

347 would justify a higher prevalence (Penaforte et al., 2013). Concerning  
348 reproductive viability, although there is no striking data regarding sexual, vertical  
349 or transplacental transmission in canines, sterilization may have an impact not  
350 only on the population control of stray dogs, but also in the risk of transmission of  
351 zoonosis (OMS, 1990).

352 In relation to the serologic methodologies applied for CVL diagnosis in this  
353 study, the prevalence found varied according to the assay and the matrix used.  
354 The immunochromatographic assay, which is the recommended test for  
355 screening, showed greater prevalence (of around 3%) compared to the enzyme-  
356 linked immunosorbent assay (confirmatory, with 1%). No association was found  
357 between tests, since some samples reactive in the confirmatory assay were not  
358 detected in the screening.

359 Considering the protocol indicated by the Ministry of Health, only one, out  
360 of 21 samples, would be considered reagent, with the exclusion of six samples,  
361 which reacted only to the enzyme-linked immunosorbent assay. This allows us to  
362 rethink the protocol indicated by the government, in which dogs possibly infected  
363 would be ruled out from the Brazilian Control Plan for Visceral Leishmaniasis  
364 (BPVL) (Figure 1).

365 Although TR DPP<sup>®</sup> was first seen as a promising alternative, there is no  
366 consensus regarding its sensibility to asymptomatic dogs. In a study conducted  
367 by Grimaldi et al. (2012), TR DPP<sup>®</sup> presented a high sensibility only for  
368 symptomatic dogs (98%), but this parameter was low for asymptomatic dogs  
369 (47%). Laurenti et al. (2014) found a high sensibility for dogs both symptomatic  
370 (89.4%) and asymptomatic (92.1%). High sensibility in asymptomatic dogs could  
371 be explained by the possibility of those individuals being in an active state of the

372 disease (Laurenti et al., 2014), since sensitivity to the immunochromatographic  
373 assay depends on clinical status (hosts genetic variability and specific immune  
374 response) (Grimaldi et al., 2012). Furthermore, in the current study, some assays  
375 presented weak reactions on the T line, which hindered the interpretation of the  
376 test, a fact that was already referred by Castro-Júnior et al. (2013).

377 It is important to highlight that the specificity of the test depends on the  
378 antigens used and that the use of recombining proteins could provide more  
379 accurate results (Badaró et al., 1998). Laurenti (2010) reported that *L. major*  
380 antigen used by ELISA EIE® produces false-positives and false-negatives  
381 because it comes from a species associated with cutaneous leishmaniasis.  
382 According to Laurenti (2009), the use of homologous antigens, such as *L.*  
383 *infantum*, would improve the accuracy of the test. However, according to Silva et  
384 al. (2013), albeit the greater specificity of the homologous antigen, the difference  
385 found would not be sufficiently significant to the point of suspending the  
386 manufacturing of enzyme-linked immunosorbent assays with the *L. major*  
387 antigen. Thus, independently from the antigen used, the realization of two  
388 different tests must be considered as a mean to heighten the sensitivity and  
389 specificity of the diagnose (Falqueto et al., 2009).

390 In relation to possible differential diagnosis, since there was no association  
391 between ELISA EIE® and SNAP 4Dx Plus®, we are unable to discard the  
392 possibility of co-infection with *Anaplasma* spp. or false-positive results for the  
393 CVL. Despite the lack of data in the literature regarding cross reactions or even  
394 co-infections of *Leishmania* spp. with *Anaplasma* spp., in a study conducted by  
395 Souza et al. (2013) a dog showed positive serology for *L. infantum* and for  
396 *Borrelia vogeli* while, concomitantly, it was also reactive in the nested polymerase

397 chain reaction (nPCR) for *Anaplasma* spp., *Leishmania* spp. and complex *L.*  
398 *donovani*. According to Otranto et al. (2010), *Anaplasma platys* could harm the  
399 immune response and enhance the transmission of other pathogens or increase  
400 the severity of infections induced by other parasites. A co-infection result must be  
401 interpreted according to information from its geographical region, the subject's  
402 history of exposition to the vector and the individual's clinical status (Cardoso et  
403 al., 2012).

404 Couto et al. (2010), in a study using SNAP 4Dx Plus® and *Leishmania*  
405 SNAP®, found three positive dogs (2.3%) for both *Anaplasma* spp. and *L.*  
406 *infantum* (coinfection). Besides, this same study claims that the prevalence of  
407 *Anaplasma* spp. appears to be higher in sheltered dogs, when compared to those  
408 coming from private clinics. In a similar result, Miró et al. (2013), used the same  
409 diagnostic tests and found a high positivity between *Anaplasma* spp. and *L.*  
410 *infantum* in samples from dogs that lived outdoors.

411 Concerning cytology, low parasite density, which is common in asymptomatic  
412 animals, may result in false-negatives, or even hamper morphological  
413 identification (Gomes et al, 2008), a problem enhanced by the fact that parasites  
414 are not homogenously distributed in tissue (Ferrer, 1988). Asymptomatic dogs  
415 have low specificity, sensitivity below 30% and low parasite load (Mykolanis et  
416 al., 2005), which justifies the absence of amastigotes in the aspired lymph nodes  
417 in the current study. Additionally, failure to isolate promastigote forms from the  
418 lymph node and blood samples, as occurred in this study, may be related to the  
419 low quantity of aspirated material or to the low density of parasites in the sample,  
420 mainly in the blood, a fact in accordance with reported by Maia et al. (2010).

421 In general, diagnostic methods should be progressively reviewed and used  
422 with caution, especially in those individuals classified as asymptomatic. There are  
423 still no truly accurate tests to diagnose those individuals, who may be considered  
424 potential disseminators. Thus, it is possible that some infected dogs become part  
425 of the epidemiological cycle, while others are unfairly sent to euthanasia.

426 Another factor to consider in relation to the impact of the euthanasia of  
427 infected dogs in the epidemiology of CVL is the substitution of euthanized dogs  
428 for new dogs, with the objective to compensate the loss of the owners. This  
429 response has serious epidemiological implications, because a young canine  
430 population has a low immune response, high prolificacy and a higher vulnerability  
431 to diseases (Dye, 1996).

432 Our study showed a low prevalence of CVL in MAPA, especially when  
433 compared to the capital city and the endemic regions from Brazil. The accuracy  
434 of diagnostic tests should be taken into account in non-endemic areas where the  
435 population is composed mainly by asymptomatic individuals. Moreover, our  
436 results showed that some reactive samples in the confirmatory test (ELISA EIE®)  
437 were not reactive in the screening tests (TR DPP®), which could lead to an  
438 epidemiological threat in situations where only reactive samples in screening  
439 were sent for confirmatory analysis.

440

## 441 7. Conclusion

442

443 The prevalence of CVL in MAPA is between 0.98% and 1.23% in the  
444 enzyme-linked immunosorbent assay, varying according to the matrix used,  
445 serum or plasma, respectively. When considering only the  
446 immunochromatographic assay, prevalence was of 2.96%. Those findings  
447 corroborate the difficulty in accuracy found on current diagnostic methods,  
448 especially in areas where the subjects profile is of asymptomatic dogs.  
449 Considering the variability in the performance of the different diagnostic tests  
450 presented in this study, and according to a widely disseminate view among  
451 scholars (Lemos et al., 2008, Faria e Andrade, 2012, Araújo et al., 2013, Coura-  
452 Vital et al., 2014), the mandatory euthanasia of contaminated dogs should be  
453 reviewed.

454 In spite of the elevated costs, researches involving new immunological  
455 assays should be encouraged and those test already established should be  
456 constantly reevaluated in both endemic and indene areas. In this sense, in view of  
457 the possibility of differences regarding serum and plasma matrices in the ELISA  
458 EIE<sup>®</sup> test, as well as to the kind of antigen used, our results indicate the need to  
459 use additional methods to choose the best matrix and the importance of  
460 confirming reactive samples by means of molecular assays. Data presented in  
461 this study corroborates the difficulties to diagnose CVL, especially in the  
462 asymptomatic population. Finally, it is crucial to expand epidemiologic  
463 surveillance to other municipalities in the Rio Grande do Sul state – especially  
464 those in the vicinity of endemic areas and also, include molecular methods to  
465 better understand the results obtained with the kits.

466

467 Conflict of interest statement

468

469 The authors declare no conflicts of interest.

470

471 Acknowledgments

472

473 The authors would like to thank Fiocruz/Biomanguinhos for the donation of all  
474 immunochromatographic and enzyme-linked immunoabsorbent assays used in  
475 this research. We are also indebted to Brazilian research agencies -  
476 CNPQ/CAPES and FAPERGS - and animal welfare boards from the  
477 municipalities of Canoas, São Leopoldo and Novo Hamburgo.

478

479 References

480

481 Albuquerque, P.L.M.M., Junior, G.B.S., Freire, C.C.F., Oliveira, S.B.C., Almeida,  
482 D.M., Silva, H.F., Cavalcante, M.S., Sousa, A.Q. 2009. Urbanization of visceral  
483 leishmaniasis (kala-zar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.*  
484 26(4), 330-333.

485 Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den  
486 Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and  
487 global estimates of its incidence. *PLoS One.* 7(5), 1-12.

488

- 489 Alves WA, Bevilacqua PD. 2004. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da  
490 leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia  
491 de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad Saude Publica. Jan-  
492 Fev;20(1), 259-265.
- 493 Andrade, A.M., Queiroz, L.H., Nunes, G.R., Perri, S.H.V., Nunes, C.M. 2007.  
494 Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. Rev Soc Bras  
495 Med Trop. Set-Out;40(5), 594-595.
- 496 Araújo, V.E.M., Pinheiro, L.C., Almeida, M.C.M., Menezes, F.C., Morais, M.H.F.,  
497 Reis I.A., Assunção, R.M., Carneiro, M. 2013. Relative risk of visceral  
498 leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. Plos Negl Trop Dis. 11(7),  
499 1-9.
- 500 Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E. M., Pedral-  
501 Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J.M., Houghton, R.L., David, J.R., Reed, D.J.  
502 1998. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral  
503 leishmaniasis. Journal of Infection Diseases. 173, 758-761.
- 504 Cardoso, L., Mendão, C., Carvalho, L.M. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*,  
505 *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania*  
506 *infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national  
507 serological study. Parasit vectors. 62(5), 1-9.
- 508 Castro-Júnior, J.G., Freire, M.L., Campos, S.P.S., Scopel, K.K.G., Porrozzi, R.,  
509 Silva, E.D., Colombo, F.A., Silveira, R.C.V., Marques, M.J., Coimbra, E.S. 2013.  
510 Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de  
511 Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual path  
512 platform (DPP®) and pcr assays. Rev Inst Med Trop São Paulo. 56(3), 225-229.

- 513 Costa, C.H.N., Tapety, C.M.M., Werneck, G.L. 2007. Controle da leishmaniose  
514 visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Rev Soc*  
515 *Bras Med Trop.* Jul-Ago;40(4), 415-419.
- 516 Coura-Vital, W., Ker, H.G., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D.O., Leal, G.G.A.,  
517 Moreira, N.D., Oliveira, L.A.M., Machado, E.M.M., Morais, M.H.F., Côrrea-  
518 Oliveira, R., Carneiro, M., Reis, A.B. 2014. Evaluation of change in canine  
519 diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil  
520 and a new proposal for diagnosis. *Plos one.* 9(3),1-6.
- 521 Couto, C.G., Lorentz, L., Beall, M.J., Shields, J., Bertolone, N., Couto, I.J., Couto,  
522 K.M., Nash, S., Slack, J., Kvitto, H., Westendorf, N., Marin, L., Iazbik, C., Vicario,  
523 F.C., Sanz, P., Ruano, R. 2010. Serological study of selected vector-borne  
524 diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vector*  
525 *Borne Zoonotic Dis.* 10(9):885-888.
- 526 Dantas-Torres, F., Sollano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., Paiva-  
527 Cavalcanti, M., Otranto, D. 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New  
528 Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 28(12), 531-538.
- 529 Dye, C. 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.*  
530 55: 125-30.
- 531 Falqueto, A., Ferreira, A.L., Santos, C.B., Parrozzi, R., Costa, M.V.S., Teva, A.,  
532 Cupolillo, E., Campo-Neto, A., Grimaldi, G.JR. 2009. Cross-sectional and  
533 longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum*  
534 visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito  
535 Santo). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 80 (4), 559-565.
- 536

- 537 Faria, A.R., Andrade, H.M. 2012. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina:  
538 grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amazon  
539 Saude. 3(2):47-57.
- 540 Ferrer, L.M., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J.A., Domingo, M. 1988. Skin  
541 lesions in canine Leishmaniasis. J. Small Anim. Pract. 29 (6), 381-388.
- 542 Gama, M.E.A., Barbosa, J.S., Pires, B., Cunha, A.K.B., Freitas, A.R., Ribeiro,  
543 I.R., Costa, J.M.L. 1998. Avaliação do nível de conhecimento que populações  
544 residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do  
545 Maranhão, Brasil. Cad Saude Publica. Abr-Jun;14(2), 381-390.
- 546 Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C., Alves, L.C. Diagnosis  
547 of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. 2008. Vet J. 175,  
548 45-52.
- 549 Grimaldi Jr, G., Teva, A., Ferreira, A.L., Santos, C.B., Pinto, I.S., Azevedo, C.T.,  
550 Falqueto, A. 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based  
551 on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of  
552 canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 106:54-59.
- 553 Harhay, M.O., Olliaro, P.L., Costa, D.L., Costa, C.H.N. 2011. Urban parasitology:  
554 visceral leishmaniasis in Brazil.. Trends Parasitol. 27(09), 403-409.
- 555 Kedzierski, L., Evans, K.J. 2014. Immune response during cutaneous and  
556 visceral leishmaniasis. Parasitol. 141(12), 1-19.
- 557 Krauspenhar, C., Beck, C., Sperotto, V., Silva, A.A., Bastos, R., Rodrigues, L.  
558 2007. Leishmaniose Visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul,  
559 Brasil. Cienc Rural. 37(3), 907-910.
- 560 Laurenti, M.D. 2009. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico  
561 na leishmaniose visceral americana canina. 67(6),13-23.

- 562 Laurenti MD. Patologia das leishmanioses [tese]. São Paulo: Faculdade de  
563 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2010.
- 564 Laurenti, M.D., Santana Leandro Júnior, M.V., Tomokane, T.Y., De Lucca,  
565 H.R.L., Aschar, M., Souza, C.S.F., Silva, R.M., Marcondes, M., Matta,V.L.R.  
566 2014. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine  
567 serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.*2014;205:444-450.
- 568 Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri  
569 S, Dietze R. 2008. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid test  
570 (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop.* 107,  
571 205-207.
- 572 Maia-Elkhoury, A.N.C., Alves, W.A., Sousa-Gomes, M.L., Sena, J.M., Luna, E.A.  
573 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude*  
574 *Publica.* Dez;24(12), 2941-2947.
- 575 Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., Campino, L. 2010. Experimental canine  
576 leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop.* 116,  
577 193-9.
- 578 Melo, E.C., Fortaleza, C.M.C.B. 2013. Challenges in the therapy of visceral  
579 leishmaniasis in Brazil: a public health perspective. *J Trop Med.* ,1-5.
- 580 Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de  
581 Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011.  
582 Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose  
583 visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças  
584 Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública.

- 585 Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvex, R., Sainz, A. 2013. Seropositivity rates  
586 for agentes for canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study.  
587 Parasite Vectors. 117(6):1-9.
- 588 Monteiro, E.M., Silva, J.C.F., Costa, R.T., Costa, D.C., Barata, R.A., Paula, E.V.,  
589 Machado-Coelho, G.L.L., Rocha, M.F., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S. 2005.  
590 Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes  
591 Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. Mar-Abr;38(2):147-152.
- 592 Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, .C, Saravia, N.G. 2005. Advances in  
593 leishmaniasis. Lancet. 366, 1561-1577.
- 594 Mykolanis, M.E., Papaioannou, N., Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F.,  
595 Billinis, C., Kontos, V.I. 2005. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs  
596 affected with *Leishmania infantum*. Vet Clin Pathol. 34(3), 243-247
- 597 Organização Mundial da Saúde. 1990. Guidelines for dog population  
598 management. Genebra.
- 599 Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Diniz, P.P.V.P.,  
600 Caprariis, D., Lia, R.P., Menck, N., Stanneck, C., Capelli, G., Breitschwerdt. 2010.  
601 Diagnosis of canine vector-borne diseases in Young dogs: a longitudinal study. J  
602 Clin Microbiol. 48(9), 3316-3324.
- 603 Peixoto, H.M., Oliveira, M.R.F., Romero, G.A.S. 2014. Serological diagnosis of  
604 canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis.  
605 Trop Med Int Health. 20(3), 1-17.
- 606 Penaforte, K.M., Belo, V.S., Teixeira-Neto, R.G., Ribeiro, R.A.N., Oliveira, R.B.,  
607 Schettini, D.A., Silva, E.S. 2013. *Leishmania* infection in a population of dogs: an  
608 epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. Rev Bras  
609 Parasitol Vet. 22(4), 592-596.

- 610 Ready, P.D. 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 6, 147-  
611 154.
- 612 Rio Grande do Sul; Divisão de Vigilância Epidemiológica. Centro Estadual de  
613 Vigilância em Saúde. 2011. Boletim Epidemiológico. Porto Alegre, 13(1), 1-8.
- 614 Savani, E.S.M.M., Schimonsky, B.V., Camargo, M.C.G.O., D'áuria, S.R.N. 2003.  
615 Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica,  
616 São Paulo. Rev Saude Publica. 37(2), 260-262.
- 617 Silva, D.A., Madeira, M.F., Abrantes, T.R., Filho, C.J.L.B., Figueiredo, F.B. 2013.  
618 Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral  
619 leishmaniasis. Vet J. 195, 252-253.
- 620 Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L.,  
621 Bourdeau, P. Oliva, G., Baneth, G. 2009. Directions for the diagnosis, clinical  
622 staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 165, 1-  
623 18.
- 624 Souza, K.C.M., André, M.R., Herrera, H.M., Andrade, G.B., Jusi, M.M.G., Santos,  
625 L.L., Barreto, W.T., Machado, R.Z., Oliveira, G.P. 2013 .Molecular and  
626 serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for  
627 *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet  
628 Jaboticabal. 22(4), 525-531.
- 629 Thomaz-Soccol, V., Castro, E.A., Navarro, I.T., Farias, M.R., Souza, L.M.,  
630 Carvalho, Y., Bispo, S., Membrive, N.A., Minozzo, J.C., Truppel, J., Bueno, W.,  
631 Luz, E. 2009. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil:  
632 implicações epidemiológicas. Rev Bras Parasitol Vet. Jul-Set; 18(3), 46-51.

Table 1. Characterization of dogs from the metropolitan area of Porto Alegre (MAPA) sampled for visceral leishmaniasis research.

| Characteristics   | Municipalities studied the metropolitan area of Porto Alegre |                   |                       |                   | RMPA |                       |                   |       |
|-------------------|--|-------------------|-----------------------|-------------------|------|-----------------------|-------------------|-------|
|                   | Canoaas<br>n=107   | Prevalence<br>(%) | São Leopoldo<br>n=216 | Prevalence<br>(%) |      | Novo Hamburgo<br>n=82 | Prevalence<br>(%) | n=405 |
| Female            | 32   | 29,90             | 125                   | 60,68             | 49   | 59,75                 | 206               | 50,86 |
| Male              | 75   | 70,10             | 91                    | 42,12             | 33   | 40,25                 | 199               | 49,14 |
| Sterilized        | 107  | 100,00            | 139                   | 64,35             | 73   | 89,02                 | 319               | 78,76 |
| Short-length coat | 90   | 84,11             | 187                   | 86,58             | 58   | 70,74                 | 335               | 82,71 |
| Long coat         | 17   | 15,89             | 29                    | 13,42             | 24   | 29,26                 | 70                | 17,28 |
| Symptomatic*      | 02   | 1,87              | 15                    | 6,95              | 02   | 2,43                  | 19                | 4,70  |
| Asymptomatic      | 105  | 98,13             | 201                   | 93,05             | 80   | 97,57                 | 386               | 95,30 |

\* Clinical signs presented by the dogs (clinical evaluation): allergic dermatitis to ectoparasite bites (ADEB), scabies, lumps (in breasts or limbs), Transmissible Venereal Tumors (TVT) onychogryphosis and keratoconjunctivitis sicca.

Table 2. Serological tests of plasma and/or serum samples of dogs from metropolitan area of Porto Alegre

| Results                   | Diagnostic Tests   |                     |                  |                               |     |
|---------------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|-----|
|                           | TR DPP®<br>plasma  | ELISA EIE®<br>serum | ELISA®<br>plasma | SNAP<br>4DXPlus® <sup>d</sup> |     |
|                           | Local <sup>a</sup> |                     |                  |                               |     |
|                           | n <sup>b</sup>     |                     |                  |                               |     |
| Reactives                 | CN                 | 7                   | 5                | 2                             | 2   |
|                           | SL                 | 9                   | 6                | 2                             | 3   |
|                           | NH                 | 1                   | 1                | 0                             | 0   |
|                           | RMPA               | 17                  | 12               | 4                             | 5   |
| Undetermined <sup>c</sup> | RMPA               | 4                   | -                | 4                             | 3   |
|                           | CN                 | 100                 | 102              | 105                           | 105 |
|                           | SL                 | 203                 | 210              | 210                           | 210 |
|                           | NH                 | 81                  | 81               | 82                            | 82  |
|                           | RMPA               | 384                 | 393              | 397                           | 397 |

TR DPP® (Fiocruz/Biomanguinhos): immunochromatographic assay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis

ELISA EIE® (Fiocruz/Biomanguinhos): enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

SNAP 4DXPlus® (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA): qualitative enzyme immunoassay for detection of *Dirofilaria immitis* antigens and antibodies *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia*.

<sup>a</sup>Local: CN=Canoas; SL = São Leopoldo; NH = Novo Hamburgo.

<sup>b</sup> Number of samples tested and distributed according to serological tests and matrices used

<sup>c</sup> All samples refers to São Leopoldo.

<sup>d</sup> All reactive tests refers to *Anaplasma* spp. (not differentiating between *A. phagocytophilum* and *A. platys*).

Table 3. Characterization of cases in Metropolitan area of Porto Alegre (MAPA) with reactive serology for canine visceral leishmaniasis (CVL) in at least one of the tests

| Characteristics   | Municipalities studied the metropolitan area of Porto Alegre |                | RMPA           |
|-------------------|--|----------------|----------------|
|                   | Canoaas  | São Leopoldo   |                |
|                   | n= 07  | n= 09          | n= 17          |
|                   | Prevalence (%)   | Prevalence (%) | Prevalence (%) |
| Female            | -  | 05             | 06             |
| Male              | 07   | 04             | 11             |
| Sterilized        | 07   | 06             | 13             |
| Short-length coat | 04   | 09             | 14             |
| Long coat         | 03   | -              | 03             |
| Symptomatic*      | 01   | -              | 01             |
| Asymptomatic      | 06   | 09             | 16             |
|                   | 100,00   | 55,55          | 35,30          |
|                   | 100,00   | 44,45          | 64,70          |
|                   | 100,00   | 53,84          | 61,90          |
|                   | 57,15  | 100,00         | 82,35          |
|                   | 42,85  | -              | 17,65          |
|                   | 14,29  | -              | 5,88           |
|                   | 85,71  | 100%           | 94,12          |

\* Clinical signs presented by dogs (clinical evaluation).

Table 4 – Distribution of reactive samples in differential test SNAP 4Dx Plus® related to the serological test for canine visceral leishmaniasis (CVL) diagnosis in dog samples from metropolitan area of Porto Alegre (MAPA)

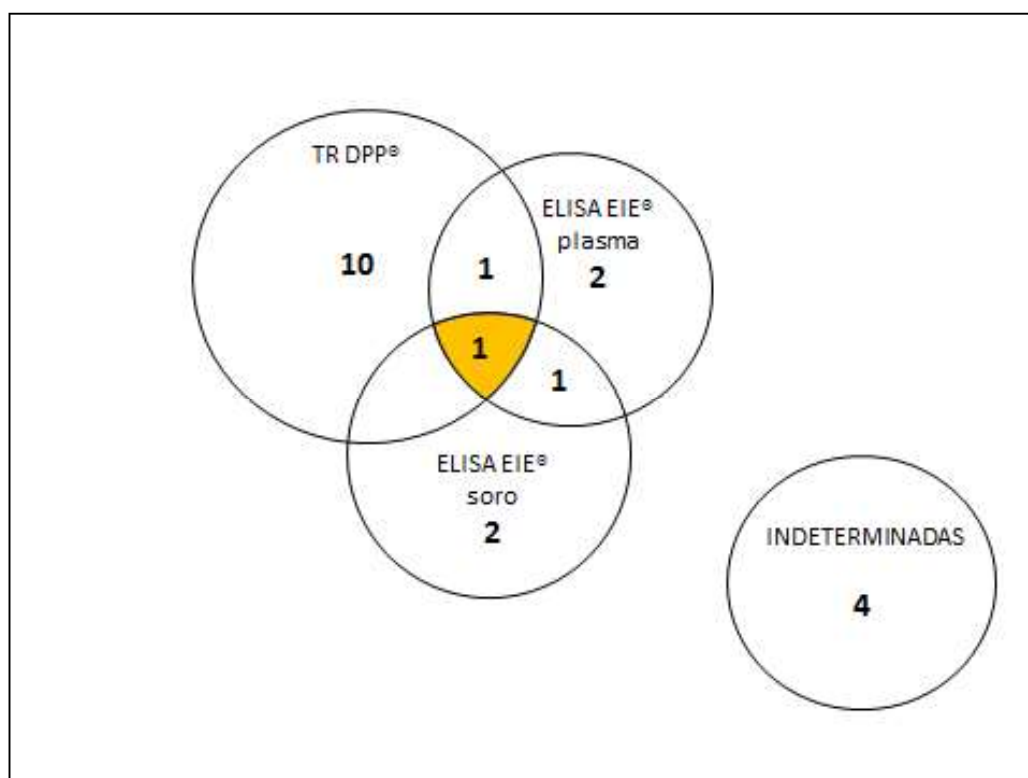
| SAMPLE | SNAP 4Dx Plus®        | TR DPP®      | ELISA EIE® (retesting) |              |
|--------|-----------------------|--------------|------------------------|--------------|
|        | plasma                | plasma       | soro                   | plasma       |
| CN027  | <i>Anaplasma</i> spp. | reactive     | non reactive           | reactive     |
| CN065  | <i>Anaplasma</i> spp. | non reactive | reactive               | reactive     |
| SL016  | <i>Anaplasma</i> spp. | non reactive | non reactive           | undetermined |
| SL087  | <i>Anaplasma</i> spp. | reactive     | non reactive           | undetermined |
| SL154  | <i>Anaplasma</i> spp. | non reactive | reactive               | undetermined |

SNAP 4DxPlus® (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA): qualitative enzyme immunoassay for detection of *Dirofilaria immitis* antigens and antibodies *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* e *Ehrlichia*.

TR DPP® (Fiocruz/Biomanguinhos): immunochromatographic assay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis

ELISA EIE® (Fiocruz/Biomanguinhos): enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine visceral leishmaniasis.

Figure 1. Distribution of reactivos and undetermined samples in serum and / or plasma from dogs from metropolitan region of Porto Alegre (MAPA) accordance to the TR DPP® and ELISA EIE® tests performed.



## 4 Tabelas

Tabela 1 – Municípios integrantes da região metropolitana de Porto Alegre e informações de acordo com o último censo

| Municípios                | Ano de inclusão na RMPA | População (hab)  |                |                  | 2010            |                  | Área (km <sup>2</sup> ) | Densidade (hab/km <sup>2</sup> ) | Taxa de Crescimento (2000-2010) (% aa) |
|---------------------------|-------------------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------------|----------------------------------|--|
|                           |                         | Urbana           | Rural          | Total            | Taxa de         | Crescimento      |                         |                                  |  |
|                           |                         |                  |                |                  | Urbanização (%) |                  |                         |                                  |  |
| <b>Total RMPA</b>         |                         | <b>3.890.525</b> | <b>119.605</b> | <b>4.010.130</b> | <b>97,02</b>    | <b>10.234,57</b> | <b>391,82</b>           | <b>—</b>                         |  |
| Alvorada                  | 1973                    | 195.673          | 0              | 195.673          | 100,00          | 71,31            | 2.743,94                | 0,62                             |  |
| Aranta                    | 1998                    | 3.996            | 868            | 4.864            | 82,15           | 35,29            | 137,83                  | 1,89                             |  |
| Arroio dos Ratos          | 2000                    | 12.056           | 650            | 13.606           | 95,22           | 425,93           | 31,94                   | 0,20                             |  |
| Cachoeirinha              | 1973                    | 118.278          | 0              | 118.278          | 100,00          | 44,02            | 2.687,04                | 0,95                             |  |
| Campe Bom                 | 1973                    | 57.338           | 2.736          | 60.074           | 95,45           | 60,51            | 992,79                  | 1,07                             |  |
| Canoas                    | 1973                    | 323.827          | 0              | 323.827          | 100,00          | 131,10           | 2.470,15                | 0,56                             |  |
| Capela de Santana         | 2001                    | 6.915            | 4.897          | 11.812           | 59,55           | 183,76           | 63,19                   | 1,47                             |  |
| Charqueadas               | 1994                    | 34.490           | 830            | 35.320           | 97,65           | 218,51           | 163,13                  | 1,66                             |  |
| Dois Irmãos               | 1989                    | 27.276           | 296            | 27.572           | 98,93           | 65,16            | 423,17                  | 2,08                             |  |
| Eldorado do Sul           | 1989                    | 30.800           | 3.543          | 34.343           | 89,68           | 509,73           | 67,38                   | 2,33                             |  |
| Estância Velha            | 1973                    | 41.484           | 1.090          | 42.574           | 97,44           | 52,15            | 816,42                  | 1,94                             |  |
| Esteio                    | 1973                    | 80.643           | 112            | 80.755           | 99,86           | 27,68            | 2.917,67                | 0,09                             |  |
| Glorinha                  | 1989                    | 2.057            | 4.824          | 6.891            | 30,00           | 323,64           | 21,29                   | 1,94                             |  |
| Gravatá                   | 1973                    | 243.497          | 12.183         | 255.680          | 95,24           | 463,50           | 551,59                  | 0,95                             |  |
| Guatiba                   | 1973                    | 93.064           | 2.140          | 95.204           | 97,75           | 376,96           | 252,67                  | 0,09                             |  |
| Igrejinha                 | 2011                    | 30.190           | 1.470          | 31.660           | 95,36           | 135,86           | 233,03                  | 1,69                             |  |
| Ivolí                     | 1989                    | 18.062           | 1.812          | 19.874           | 90,88           | 63,15            | 314,71                  | 2,64                             |  |
| Montenegro                | 1999                    | 53.629           | 5.766          | 59.415           | 90,26           | 424,01           | 140,13                  | 0,91                             |  |
| Nova Hartz                | 1989                    | 15.269           | 3.077          | 18.346           | 83,23           | 62,56            | 293,26                  | 1,99                             |  |
| Nova Santa Rita           | 1998                    | 19.475           | 3.241          | 22.716           | 85,73           | 217,87           | 104,26                  | 3,73                             |  |
| Novo Hamburgo             | 1973                    | 234.798          | 4.142          | 238.940          | 98,27           | 223,82           | 1.067,55                | 0,12                             |  |
| Parobé                    | 1989                    | 48.633           | 2.869          | 51.502           | 94,43           | 108,65           | 474,03                  | 1,41                             |  |
| Porto                     | 1989                    | 25.276           | 5.644          | 30.920           | 81,75           | 159,89           | 193,38                  | 2,29                             |  |
| Porto Alegre              | 1973                    | 1.409.351        | 0              | 1.409.351        | 100,00          | 496,68           | 2.837,53                | 0,35                             |  |
| Rolante                   | 2010                    | 15.310           | 4.175          | 19.485           | 78,57           | 295,64           | 65,91                   | 0,88                             |  |
| Santo Antônio da Patrulha | 2000                    | 28.114           | 11.571         | 39.685           | 70,84           | 1.049,81         | 37,80                   | 0,69                             |  |
| São Jerônimo              | 1999                    | 17.055           | 5.079          | 22.134           | 77,05           | 936,38           | 23,64                   | 0,88                             |  |
| São Leopoldo              | 1973                    | 213.238          | 849            | 214.087          | 99,60           | 102,74           | 2.083,82                | 1,01                             |  |
| Sapiranga                 | 1973                    | 72.286           | 2.699          | 74.985           | 96,40           | 138,31           | 542,14                  | 0,81                             |  |
| Sapucaia do Sul           | 1973                    | 130.469          | 488            | 130.957          | 99,63           | 68,31            | 2.245,91                | 0,65                             |  |
| Taquara                   | 1999                    | 45.266           | 9.377          | 54.643           | 82,84           | 457,86           | 119,35                  | 0,34                             |  |
| Triunfo                   | 1989                    | 16.857           | 8.936          | 25.793           | 65,35           | 818,80           | 31,50                   | 1,53                             |  |
| Urussatuba                | 1973                    | 224.943          | 14.441         | 239.384          | 93,97           | 1.497,02         | 159,91                  | 0,51                             |  |

Fonte: Metroplan (2013)

Tabela 2 – Caracterização dos cães por município estudado

| <b>Características</b> | <b>Canoas<br/>(n=107)</b> | <b>São Leopoldo<br/>(n=216)</b> | <b>Novo Hamburgo<br/>(n=82)</b> | <b>Prevalência<br/>(%)</b> |
|------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| fêmea                  | 32                        | 125                             | 49                              | 50,86%                     |
| macho                  | 75                        | 91                              | 33                              | 49,14%                     |
| esterilizado (a)       | 107                       | 139                             | 73                              | 78,76%                     |
| pelagem curta          | 90                        | 187                             | 58                              | 82,71%                     |
| pelagem longa          | 17                        | 29                              | 24                              | 17,29%                     |

Tabela 3 – Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina por município e região avaliada de cães da região metropolitana de Porto Alegre no teste imunocromatográfico

| <b>Município</b>     | <b>Total (n)</b> | <b>TR DPP® (n)</b> | <b>Prevalência (%)</b> |
|----------------------|------------------|--------------------|------------------------|
| <b>Canoas</b>        | 107              | 5                  | 4,67%                  |
| <b>São Leopoldo</b>  | 216              | 6                  | 2,77%                  |
| <b>Novo Hamburgo</b> | 82               | 1                  | 1,21%                  |
| <b>Total (N)</b>     | 405              | 12                 | 2,96%                  |

Tabela 4 – Distribuição das amostras nos testes imunocromatográfico e imunoenzimático (testadas e retestadas) de cães da região metropolitana de Porto Alegre

CN = Canoas; SL = São Leopoldo; NH = Novo Hamburgo.

| AMOSTRA | TR DPP®      | ELISA EIE®    | ELISA EIE® (retestagem) |               |
|---------|--------------|---------------|-------------------------|---------------|
|         | plasma       | soro          | soro                    | plasma        |
| CN004   | reagente     | indeterminada | não reagente            | não reagente  |
| CN010   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |
| CN016   | não reagente | reagente      | não reagente            | indeterminada |
| CN027   | reagente     | indeterminada | não reagente            | reagente      |
| CN059   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |
| CN065   | não reagente | indeterminada | reagente                | reagente      |
| CN082   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |
| SL016   | não reagente | indeterminada | não reagente            | indeterminada |
| SL052   | não reagente | indeterminada | não reagente            | indeterminada |
| SL059   | não reagente | indeterminada | não reagente            | reagente      |
| SL087   | reagente     | não reagente  | não reagente            | indeterminada |
| SL119   | reagente     | indeterminada | reagente                | reagente      |
| SL146   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |
| SL152   | não reagente | indeterminada | indeterminada           | reagente      |
| SL154   | não reagente | reagente      | reagente                | indeterminada |
| SL158   | não reagente | indeterminada | indeterminada           | não reagente  |
| SL166   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |
| SL172   | reagente     | não reagente  | indeterminada           | não reagente  |
| SL185   | não reagente | indeterminada | indeterminada           | indeterminada |
| SL210   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |
| NH072   | reagente     | não reagente  | não reagente            | não reagente  |

Tabela 5 – Soroprevalência da Leishmaniose Visceral Canina na região e por município de acordo com o teste imunoenzimático avaliados em diferentes matrizes de cães da região metropolitana de Porto Alegre

| Município        | Total (n)  | ELISA EIE® (n)   |                    |                       |                         | Prevalência (%)  |                    |                       |                         |
|------------------|------------|------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|
|                  |            | reagente<br>soro | reagente<br>plasma | indeterminada<br>soro | indeterminada<br>plasma | reagente<br>soro | reagente<br>plasma | indeterminada<br>soro | indeterminada<br>plasma |
| Canoas           | 107        | 2                | 2                  | 0                     | 1                       | 1,86%            | 1,86%              | 0                     | 0,93%                   |
| São Leopoldo     | 216        | 2                | 3                  | 4                     | 5                       | 0,92%            | 1,38%              | 1,85%                 | 2,31%                   |
| Novo<br>Hamburgo | 82         | 0                | 0                  | 0                     | 0                       | 0                | 0                  | 0                     | 0                       |
| <b>Total (N)</b> | <b>405</b> | <b>4</b>         | <b>5</b>           | <b>4</b>              | <b>6</b>                | <b>0,98%</b>     | <b>1,23%</b>       | <b>0,98%</b>          | <b>1,48%</b>            |

Tabela 6 – Distribuição de amostras reagentes no teste diferencial SNAP 4Dx Plus® em relação aos testes sorológicos de amostras de cães da região metropolitana de Porto Alegre

| <b>AMOSTRA</b> | <b>SNAP 4Dx Plus®</b> | <b>TR DPP®</b> | <b>ELISA EIE® (retestagem)</b> |               |
|----------------|-----------------------|----------------|--------------------------------|---------------|
|                | <b>plasma</b>         | <b>plasma</b>  | <b>soro</b>                    | <b>plasma</b> |
| CN027          | <i>Anaplasma</i> spp. | reagente       | não reagente                   | positivo      |
| CN065          | <i>Anaplasma</i> spp. | não reagente   | reagente                       | positivo      |
| SL016          | <i>Anaplasma</i> spp. | não reagente   | não reagente                   | indeterminada |
| SL087          | <i>Anaplasma</i> spp. | reagente       | não reagente                   | indeterminada |
| SL154          | <i>Anaplasma</i> spp. | não reagente   | reagente                       | indeterminada |

Tabela 7 – Comparação entre os resultados dos testes sorológicos de amostras de cães da região metropolitana de Porto Alegre

|         |              | ELISA EIE® (padrão) |                  |           |
|---------|--------------|---------------------|------------------|-----------|
|         |              | positivo            | negativo         | Total     |
| TR DPP® | positivo     | 2 <sup>VP</sup>     | 10 <sup>FP</sup> | 12        |
|         | não reagente | 5 <sup>FN</sup>     | 4 <sup>VN</sup>  | 9         |
|         | <b>Total</b> | <b>7</b>            | <b>14</b>        | <b>21</b> |

VP= verdadeiro-positivo; FP= falso-positivo;  
 FN= falso-negativo; VN= verdadeiro-negativo;

Tabela 8 – Comparação entre os resultados dos testes sorológicos nas matrizes soro e plasma de amostras de cães da região metropolitana de Porto Alegre

|                   |              | ELISA EIE® (plasma) (padrão) |                 | Total     |
|-------------------|--------------|------------------------------|-----------------|-----------|
|                   |              | positivo                     | negativo        |           |
| ELISA EIE® (soro) | positivo     | 2 <sup>VP</sup>              | 0 <sup>FP</sup> | 2         |
|                   | não reagente | 2 <sup>FN</sup>              | 8 <sup>VN</sup> | 10        |
|                   | <b>Total</b> | <b>4</b>                     | <b>8</b>        | <b>12</b> |

VP= verdadeiro-positivo; FP= falso-positivo;  
 FN= falso-negativo; VN= verdadeiro-negativo;

## 5 Considerações finais

De acordo com o estudo, encontrou-se uma baixa prevalência da LVC na RMPA, em especial quando comparada com a capital e principalmente em relação a regiões endêmicas brasileiras. Deve-se levar em consideração a acurácia dos testes diagnósticos e, sobretudo, o fato dos indivíduos testados serem classificados como assintomáticos.

Os métodos diagnósticos devem ser progressivamente revisados e utilizados com cautela, especialmente naqueles indivíduos classificados como assintomáticos. Não existem ainda testes verdadeiramente acurados de modo a diagnosticar com exatidão esses indivíduos, os quais são considerados disseminadores em potencial e atuam na expansão silenciosa da doença. Consoante a isso, deve-se atentar à possíveis reações cruzadas ou mesmo coinfeção com outros parasitos.

Nesse mesmo sentido, levando em consideração os resultados do estudo, indica-se confirmar o resultado de todas as amostras caninas, independente do resultado no teste de triagem, uma vez os testes imunológicos foram discordantes entre si em área não endêmica e numa população clinicamente assintomática.

Além disso, aquelas amostras reagentes em um ou ambos os testes imunológicos, bem como aquelas indeterminadas e também reagentes para *Anaplasma* spp., devem ser reavaliadas através de metodologia molecular de modo a assegurar e validar os resultados encontrados e também definir a escolha da melhor matriz (plasma ou soro), embora tenha havido uma concordância moderada entre elas de acordo com o coeficiente Kappa.

Segundo a prevalência encontrada e pelo fato da doença ser uma zoonose em expansão, é necessário agir de forma profilática, principalmente no que diz respeito à educação da população e à adoção de medidas preventivas para barrar o avanço e a reprodução do vetor, bem como controlar os reservatórios, evitando a disseminação da doença no Estado. Para esse fim, é fundamental ampliar a vigilância epidemiológica para demais municípios gaúchos – principalmente aqueles fronteiriços a países endêmicos.

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

**UFCSPA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você a permitir a participação do(s) cão (cães), que se encontra(m) sob sua responsabilidade legal, da pesquisa “Perfil da leishmaniose visceral canina em Porto Alegre e região metropolitana”.

O presente projeto tem como objetivo definir o perfil da LV em cães de Porto Alegre e região metropolitana através de teste rápido imunocromatográfico e sorologia.

A Leishmaniose visceral é uma doença grave que afeta tanto humanos quanto cães, sendo de suma importância o diagnóstico precoce, para que medidas de controle sejam mais efetivas. Atualmente, há vários testes para diagnosticar a doença, entretanto, alguns necessitam de equipamentos específicos ou possuem custos elevados.

Mediante autorização (assinatura deste termo), serão realizadas (por veterinário) coletas de saliva e sangue, para utilização no teste rápido e, posteriormente, encaminhamento para o laboratório realizar a análise confirmatória por técnica de referência. Parte das amostras serão guardadas para estudos futuros, quando pertinente, permitindo a padronização de novos métodos diagnósticos e/ou marcadores da infecção. Também serão solicitadas informações para preenchimento do questionário (inquérito epidemiológico) e permissão para realização de exame clínico. Caso a análise seja positiva, os responsáveis serão notificados e será solicitada a coleta aspirativa de linfonodo para avaliação citológica (também mediante consentimento dos responsáveis pelos cães). Importante mencionar que todos os procedimentos serão realizados por médicos veterinários, sendo as possíveis intercorrências relacionadas à coleta de amostras de sangue ou punção, adequadamente conduzidas pelos profissionais.

Os responsáveis serão informados sobre todos os resultados das análises dos cães, podendo estes, retirar os cães da pesquisa a qualquer momento.

As informações sobre os cães serão mantidas sob sigilo, sendo somente conhecidas pelos pesquisadores envolvidos no estudo ou autoridades sanitárias, quando pertinente. Os dados da pesquisa serão guardados por um período de cinco anos e, após, destruídos. Todos os custos da pesquisa serão absorvidos pelos pesquisadores.

Como responsável técnica do projeto, estou disposta a esclarecer qualquer dúvida que exista ou que apareça durante ou após o período das atividades. Para este fim, estes são meus dados pessoais:

Nome: Eliane Dallegrave

Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Telefone: (51)3303-8819

e-mail: [elianedal@ufcspa.edu.br](mailto:elianedal@ufcspa.edu.br)

Eu, \_\_\_\_\_,  
responsável pelo(s) canino(s) \_\_\_\_\_, declaro que  
fui informado dos objetivos da pesquisa acima de forma clara e detalhada. Entendi como a pesquisa será  
realizada e estou ciente de que poderei esclarecer qualquer dúvida a qualquer momento, assim como desistir de  
participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para mim ou meu(s) cão(cães). O pesquisador certificou-  
me de que todas as informações referentes a meu(s) cão(cães) serão mantidas sob sigilo. Estou ciente de que  
todos os custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos  
como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso contatar o  
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA).

CEUA-UFCSPA – fone: 51 3303-8804 - Dr. Kátya Vianna Rigatto, e-mail: [kvr@ufcspa.edu.br](mailto:kvr@ufcspa.edu.br), fone: 51 3303-8752.

Declaro que recebi uma via do presente Termo de Consentimento:

\_\_\_\_\_  
Assinatura responsável legal pelo(s) canino(s)

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Eliane Dallegrave  
Veterinária responsável

## APÊNDICE B – Ficha de inquérito epidemiológico

|  |   |
|--|---|
| Data: ____/____/2013   | Mucosas: normocradas ( ) hipocradas ( ) congestas ( )                                   |
| Identificação do animal: _____                                   | Hidratação: 55% ( ) 5% a 8% ( ) ≥ 8% ( )  |
| Município: Porto Alegre ( ) Outro? _____                         | Temperatura retal (°C): _____   |
| Raça: _____  | Palpação abdominal: _____   |
| Pelagem: _____   | Ausculta cardíaca: _____ Ausculta respiratória: _____                                   |
| Idade: _____   | Presença de ectoparasitas? Não ( ) Pulga ( ) Carrapato ( ) Outro? _____                 |
| Sexo: Macho ( ) Fêmea ( ) Castrado(a)? ( )                       | Controle de ectoparasitas no animal? Não ( ) Sim ( )                                    |
| Domicílio ( ) Errante ( ) Abrigo ( ) Quai? _____                 | Princípio ativo? _____  |
| Município de origem do cão: _____                                | Frequências? _____  |
| Estado: _____  | Controle de ectoparasitas no ambiente? Não ( ) Sim ( )                                  |
| Tempo de domicílio atual? _____                                  | Princípio ativo? _____  |
| Área<br>Urbana ( ) Rururbana ( ) Rural ( ) Mata ( )              | Frequência? _____   |
| Viaja para outra cidade e/ou Estado? Não ( ) Sim ( ) Quai? _____ | Vacinação<br>Artirábica ( ) Data? _____ Marca? _____                                    |
| O animal convive com outros cães? Não ( ) Sim ( ) Quantos? _____ | Poli valente ( ) Data? _____ Marca? _____   |
| Condições dos outros cães: sadio ( ) suspeito ( )                | Traqueobronquite infecciosa ( ) Data? _____ Marca? _____                                |
| Sintomas dos animais suspeitos: _____                            | Giárdia ( ) Data? _____ Marca? _____  |
| _____  | Leishmaniose ( ) Data? _____ Marca? _____   |
| _____  | Linfonodos  |
| _____  | Aumento de volume? Não ( ) Sim ( )  |
| _____  | Submandibular ( ) Pré-escapular ( ) Axilar ( ) Inguinal ( ) Poplíteo ( )                |
| _____  | OBSERVAÇÃO: _____   |
| _____  | Faz uso de medicação de uso contínuo? Não ( ) Sim ( ) Quai? _____                       |
| _____  | OUTROS SINAIS:  |
| _____  | Dermite ( ) Conjuntivite ( ) Caquexia ( ) Perda de peso ( ) Onicogribose ( )            |
| _____  | Problema locomotor ( ) Urinadenopatia ( ) Edema de membros ( ) Hepatoesplenomegalia ( ) |
| _____  | OBSERVAÇÕES: _____  |
| _____  | _____   |
| _____  | _____   |

**APÊNDICE C – Protocolos diagnósticos utilizados para a detecção da Leishmaniose Visceral Canina de cães da região metropolitana de Porto Alegre.**

