

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA E BEM ESTAR
ANIMAL

Letícia Maria Molla

DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* spp. EM CÃES PROVENIENTES
DA ZONA SUL DE SÃO PAULO, SP

São Paulo

2017

Letícia Maria Molla

**DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* spp. EM CÃES PROVENIENTES DA
ZONA SUL DE SÃO PAULO, SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Santo Amaro – Unisa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Milton Soldani Afonso da Universidade de Santo Amaro)

Molla, Letícia Maria

Detecção de *Leishmania* spp. em cães provenientes da zona sul de São Paulo, SP. / Letícia Maria Molla – 2017.

72 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Medicina e Bem Estar Animal) – Universidade de Santo Amaro, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Moraes Filho.

1. Leishmaniose Visceral Canina; 2. DPP®; 3. Elisa; 4. R.I.F.I. e 5. PCR.

Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

PARECER N.05 /2016

Projeto de Pesquisa: "Avaliação Diagnostica de Leishmaniose canina em animais provinientes da zona sul de são Paulo"

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Jonas Moraes Filho
Leticia Maria Molla

Curso: Mestrado em Bem Estar animal

Prezado Pesquisador:

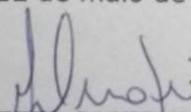
Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Aprovado** do Projeto **Avaliação Diagnostica de Leishmaniose canina em animais provinientes da zona sul de são Paulo"**

*** Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- **Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.**
- **Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.**

São Paulo, 12 de maio de 2016


PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONÓFRIO
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Valeria Castilho Onofrio
Coord. do Comitê de Ética
no Uso de Animais - CEUA
Universidade Santo Amaro - UNISA

Letícia Maria Molla

**DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* spp. EM CÃES PROVENIENTES DA
ZONA SUL DE SÃO PAULO, SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da
Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem Estar Animal.

São Paulo, de de 20.....

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Conceito Final

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e meus familiares que me auxiliaram nessa conquista.

Ao Professor e Orientador Dr. Jonas M. Filho, parceiro nessa caminhada ao longo do Curso de Pós-graduação Strictu Senso de Medicina e Bem Estar Animal.

A todos os professores do curso.

A todos os professores, profissionais e alunos colaboradores na execução desse projeto, que muito me ensinaram e auxiliaram no decorrer de todo o curso.

A todos os profissionais que atuam com a doença tema dessa dissertação e aos amigos que já trabalharam comigo em projetos importantes sobre o tema.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode ter.

À Universidade Santo Amaro, pela oportunidade de fazer o curso.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados, os quais terão os meus eternos agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Moraes Filho, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções, atividades e incentivos.

Aos professores e alunos colaboradores desse projeto: Prof. Rafael Agopiran; Prof. Msc. Márcio Antônio Batistela Moreira; Prof. Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto, Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa; alunas Amanda O. de Sousa, Bruna C. Rodrigues e Adrielle D. Nogueira o meu muito obrigada pelo suporte, parceria e auxílio na execução das atividades.

Aos meus pais, irmã e sobrinha pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Nos meus momentos ausência, dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que, o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao Valdir Avino que me proporcionou a oportunidade de trabalhar em dois grandes projetos, com os quais pude conhecer sobre a doença tema dessa dissertação e conhecer algumas pessoas maravilhosas que se tornaram amigos e parceiros desse projeto.

Meus agradecimentos aos amigos que me ensinaram a gostar e a buscar mais ensinamentos a respeito do tema dessa dissertação: Ingrid Menz, André Cutolo, Fábio Nogueira, Simone Beneti, Roberto Hiramoto, Márcio Moreira, Fredy Galvis, Eunice Galatti, Maria de Fátima Araújo, Vera Pereira-Chioccola, Cristina Meira e Helena Taniguchi.

Aos amigos "irmãos" Karin Botteon, Pascoal Milito e Gabriela Dias que sempre me incentivaram e animaram em todos os momentos, adoro todos vocês!

*** Chegará o tempo em que o homem
conhecerá o íntimo de um animal e nesse dia
todo crime contra um animal será um crime
contra a humanidade – Leonardo da Vinci ***

RESUMO

Molla, Letícia Maria. **Detecção de *Leishmania* spp. em cães provenientes da zona sul de São Paulo, SP. [Detection of *Leishmania* spp. in dogs from the south of São Paulo, SP.]** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, São Paulo, 2017.

A Leishmaniose Visceral é uma doença sistêmica, de curso crônico e grave. É uma zoonose de grande importância em diversos países do mundo, causada nas Américas por um protozoário (*Leishmania infantum chagasi*) parasita intracelular obrigatório e transmitido ao homem e aos animais pela picada de flebotomíneos, sendo no Brasil *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetora. Com o objetivo de detectar a presença de *Leishmania* spp. em regiões não endêmicas da cidade de São Paulo, foram coletadas e analisadas 153 amostras de sangue de cães de ambos os sexos, com idade a partir de 3 meses, com ou sem de raça definida e com ou sem sintomatologia clínica sugestiva da doença, animais estes participantes de campanha de esterilização cirúrgica eletiva promovida pelas subprefeituras regionais dos bairros do Grajaú e Ilha do Bororé em parceria com ONG (Organização Não Governamental). Foi realizada sorologia empregando-se os métodos DPP[®] (ensaio imunocromatográfico) e Elisa (teste imunoenzimático), que atualmente são utilizados como triagem diagnóstica por órgãos governamentais brasileiros; a R.I.F.I. (Reação de Imunofluorescência Indireta) também foi realizada como teste sorológico complementar na investigação sorológica. Também foi realizado o teste bioquímico de relação A:G (Albumina/Globulina) para verificação de alteração das proteínas séricas. Como diagnóstico molecular foi realizada a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de sangue, com o uso dos primers LITSR e L5.8S do gene ITS. No exame físico realizado encontraram-se alterações dermatológicas em 13 dos 153 animais. Nos exames sorológicos foi encontrado resultado positivo em um animal, para R.I.F.I. e no exame molecular um animal foi positivo na PCR, esses dois animais são provenientes da mesma região (Grajaú). Os resultados bioquímicos demonstraram alteração da relação A:G em 8 dos animais avaliados. Os resultados demonstraram que 2 animais apresentaram exames positivos, porém não se pôde concluir com qual espécie de *Leishmania* eles podem estar acometidos e que os animais que apresentaram qualquer alteração devem ter monitoramento médico periódico.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina. DPP[®]. Elisa. R.I.F.I. PCR.

ABSTRACT

Molla, Letícia Maria. **Detecção de *Leishmania* spp. em cães provenientes da zona sul de São Paulo, SP. [Detection of *Leishmania* spp. in dogs from the south of São Paulo, SP.]** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, São Paulo, 2017.

Visceral leishmaniasis is a chronic and severe systemic disease. It is a zoonosis of great importance in several countries of the world caused, in the Americas by a protozoan (*Leishmania infantum chagasi*) obligatory intracellular parasite transmitted to man and animals by the bite of sand flies, and *Lutzomyia longipalpis* is a main vector species in Brazil. In order to detect the presence of *Leishmania* spp. were analyzed 153 blood samples from dogs of both sexes, aged 3 months and up, with or without a breed set and with or without clinical symptoms suggestive of the disease, all the animals were patients of the elective surgical sterilization campaign promoted by city hall of the districts of “Grajaú” and “Ilha do Bororé” in partnership with NGO (Non-Governmental Organization). The tests used in this paper were DPP® (immunochromatographic assay) and Elisa (enzyme immunoassay), are known as diagnostic screening by Brazilian governmental agencies; R.I.F.I. (Indirect Immunofluorescence Reaction) was also performed as a complementary serological test in the serological investigation. A biochemical test of A:G ratio (Albumin / Globulin) for the selection of serum proteins was also carried out. As a molecular diagnosis a PCR (Polymerase Chain Reaction) was performed using the LITSR and L5.8S primers of the ITS gene. Were detected dermatological findings in 13 of the 153 animals; in the serological tests were found positive in one animal, for R.I.F.I. and one animal molecular tests were positive in the PCR, both animals belonged to the same region (“Grajaú”). The biochemical results showed a change in the A:G ratio in 8 of the animals. The results showed that 2 animals had positive tests, but it was not possible to conclude on which species of *Leishmania* they may be affected and that animals who presented any kind of sign should have periodic medical monitoring.

Keywords Canine Visceral Leishmaniasis. DPP®. Elisa. IFI. PCR.

Lista de Figuras

Figura 1 – Foto dos Kits DPP com as amostras do estudo.....	39
Figura 2 – Animal de identificação no 69, atendido na Ilha do Bororé em 09/04/2016.....	42
Figura 3 - Animal de identificação no 69, atendido na Ilha do Bororé em 09/04/2016.....	42
Figura 4 - Animal de identificação no 69, atendido no Grajaú, R. Gaivotas do Céu em 18/06/2016.....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Amostragem dos animais, segundo sexo, raça e idade.....	41
Tabela 2 – Resultados dos Exames Físicos.....	42
Tabela 3 – Resultados dos Exames Laboratoriais.....	44
Tabela 4 – Exame DPP [®] e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Ilha do Bororé na data 09/04/2016.....	60
Tabela 5 – Exame DPP [®] e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na R. Gaivotas do Céu na data 18/06/2016.....	62
Tabela 6 – Exame DPP [®] e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Travessa Acácia na data 13/08/2016.....	64
Tabela 7 – Exame R.I.F.I. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.....	66
Tabela 8 – Exame Proteínas Plasmáticas. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.....	68
Tabela 9 – Exame PCR ITS. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.....	70

Lista de Apêndices

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	56
Apêndice B – Ficha de Avaliação Clínica.....	58
Apêndice C – Tabelas 4, 5 e 6 - Resultados dos exames de DPP [®] e Elisa.....	60
Apêndice D – Tabela 7 – Resultados dos exames de R.I.F.I.....	66
Apêndice E – Tabela 8 – Resultados dos exames de Proteínas Plasmáticas.....	68
Apêndice F – Tabela 9 – Resultados dos exames de PCR-ITS.....	70

Lista de Abreviaturas

A:G	Relação Albumina Globulina
Ac	Anticorpos
ALB	Albumina
Apa	Área de Proteção Ambiental
BA	Bahia
°C	Graus <i>Celsius</i>
CE	Ceará
Ceua	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	Exame Imunocromatográfico (<i>Dual Path Platform</i>)
Elisa	Teste Imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
g/dl	Grama por decilitro
GLO	Globulina
kDNA	DNA do cinetoplasto
Km²	Quilômetros quadrados
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>Lu. longipalpis</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MA	Maranhão
Mapa	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais
MI	Mililitros
MS*	Mato Grosso do Sul
MS	Ministério da Saúde
OMS (WHO)	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
PA	Pará
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PI	Piauí
R.I.F.I.	Reação de imunofluorescência indireta
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
Sc	Subcutâneo
SP	São Paulo
SRD	Sem raça definida
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TO	Tocantins
µg/dl	Micrograma por decilitro
Unisa	Universidade de Santo Amaro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. HISTÓRIA DA LEISHMANIOSE.....	17
2.2. EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	17
2.3. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....	22
2.3.1 Distribuição do vetor.....	22
2.3.2 Vetor.....	22
2.3.3 Protozoários	25
2.3.4 Sinais Clínicos.....	26
2.3.5 Testes Diagnósticos	27
2.4 LEGISLAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E EUTANÁSIA NO BRASIL	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. JUSTIFICATIVA	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 LOCAL DO ESTUDO	36
5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	36
5.2.1 Amostras coletadas.....	36
5.2.2 Exame Físico dos animais.....	37
5.3 PROCEDIMENTO DE COLHEITA	37
5.4 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS.....	38
5.4.1 Proteínas Plasmáticas.....	38
5.4.2 Sorodiagnóstico.....	38
5.4.3 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)	40

6. RESULTADOS.....	41
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÃO	49
9. REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE A – TCLE (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO).....	56
APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	58
APÊNDICE C – TABELAS DE RESULTADOS DOS EXAMES DPP® E ELISA	60
APÊNDICE D – TABELA DE RESULTADOS DO EXAME R.I.F.I.	66
APÊNDICE E – TABELA DE RESULTADOS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	68
APÊNDICE F – TABELA DE RESULTADOS DE PCR	70

1 Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de caráter zoonótico e considerada uma doença negligenciada no Brasil e em diversos países do mundo, a qual faz milhares de vítimas anualmente. É uma doença em expansão e em urbanização, sendo que há alguns anos atrás era considerada doença de caráter rural. Têm maior incidência em países em desenvolvimento, indivíduos de áreas mais carentes (baixa renda, locais sem saneamento básico, baixo acesso à assistência à saúde, etc.), crianças e pessoas imunossuprimidas, por exemplo: HIV (vírus da imunodeficiência humana) positivo¹⁻².

No presente estudo fora realizado um levantamento da possível ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em alguns bairros da região Sul da cidade de São Paulo. Os bairros escolhidos estão localizados no extremo da Zona Sul da cidade, sendo eles: Grajaú e Ilha do Bororé, onde há alta densidade de mata nativa, inclusive Área de Proteção Ambiental (APA), alta taxa de população de baixa renda e alta densidade de animais. A coleta de material biológico, dos animais envolvidos no estudo, foi realizada em parceria com a equipe do professor Rafael Agopiran, que promove, de forma conjunta entre Prefeitura e ONG (Organização Não Governamental), campanhas de castração eletiva cirúrgica de cães e gatos em diversos bairros da cidade de São Paulo.

Os animais participantes foram submetidos a exames de sangue para verificação da possível ocorrência de positividade para *Leishmania* spp. em cães residentes da região, sendo eles pertencentes a tutores ou animais errantes e/ou resgatados por protetores animais.

2 Revisão de Literatura

2.1. História da Leishmaniose

A Leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas no mundo e, afeta milhares de pessoas ao redor do mundo. Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, independentemente, no século XIX identificaram os parasitas que causam Leishmanioses, a cada, Ronald Ross deu o nome genérico de *Leishmania*. Em 1904, Cathoire e Laveran encontraram *Leishmania* em crianças com anemia esplênica. Nicolle nomeou o parasita de *L. infantum* e identificou cães como reservatórios em Tunis em 1908. Carini identificou *Leishmania* em lesões mucosas de pacientes no Brasil em 1912. No início dos anos 40, Swaminath, Shortt e Anderson na Índia e, Adler e Ber na Palestina demonstraram a transmissão de *L. donovani* e *L. tropica* (provavelmente *L. major*) por flebotomíneos³.

Características clínicas e geográficas da doença em humanos vêm sendo suplementadas pelos estudos em animais reservatórios e vetores, o comportamento da *Leishmania* em animais e a ecologia natural dos ciclos da *Leishmania* fortalece as bases de classificação das espécies e o conhecimento sobre a transmissão e a doença. A partir da década de 70 foram introduzidas as análises de iso-enzimas e na década de 80 os estudos do DNA³.

Técnicas parasitológicas diretas, como: aspirados de linfonodo, de baço e de lesões de pele ainda são métodos diagnósticos de referência. A partir de 1990 introduziu-se o diagnóstico por PCR (reação em cadeia de polimerase) o qual identifica o kDNA do parasita, o qual aumentou a possibilidade de diagnósticos a partir de diversas amostras de tecidos e até mesmo o sangue. O diagnóstico laboratorial complementar também é usado como auxiliar, pois apresenta, geralmente, anemia e hiperglobulinemia^{1,3}.

2.2. Epidemiologia das Leishmanioses

As Leishmanioses são doenças de alto potencial zoonótico, que acometem homens e animais. Inicialmente tinha caráter eminentemente rural, porém têm-se

expandindo para áreas urbanas. Encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. O registro do primeiro caso no Brasil ocorreu em 1913, quando foi descrito um caso de necropsia em um paciente oriundo do Mato Grosso. Nessa mesma época foi realizado um estudo para diagnóstico da febre amarela, que resultou no encontro de 41 casos positivos para Leishmanioses em indivíduos das regiões Norte e Nordeste, nesta ocasião o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como vetor e foram descobertos os primeiros casos em cães¹.

Essas doenças são consideradas problemas de saúde pública devido a sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Afeta principalmente regiões mais pobres e países em desenvolvimento, o que corrobora para que seja realizado um esforço coletivo entre países, organizações, governos, instituições e as sociedades para o controle⁴. As doenças afetam as pessoas em maior estado de pobreza e está associada à má nutrição, população em deslocamento, habitações humildes, baixos recursos financeiros e baixo sistema imunológico das pessoas. Estão relacionadas às mudanças do meio ambiente (como: desmatamento, construção de barragens, esquemas de irrigação e urbanização)².

As Leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, o qual há mais de 30 espécies catalogadas e sua transmissão se dá através da picada da fêmea de flebotomíneo contaminada, há mais de 90 espécies de flebotomíneos conhecidas como potenciais transmissores de Leishmanioses. Existem três principais formas de Leishmaniose, sendo elas²:

2.2.1 Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea

- Leishmaniose Cutânea – é a forma mais comum entre as Leishmanioses, causando lesões cutâneas, principalmente ulcerações em áreas do corpo expostas. Caracteriza-se por grandes cicatrizes. Estima-se que ocorram entre 0,6-1 milhão de novos casos ao ano no mundo. Em média de 95% dos casos ocorre nas Américas, bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Central da Ásia. Mais de 2/3 dos novos casos ocorrem em seis países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Iran e República Árabe da Síria^{2,4}.

- Leishmaniose Mucocutânea – é a forma que causa total ou parcial destruição das membranas mucosas no nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos ocorre na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru^{2,4}.

Nas Américas, a Leishmaniose cutânea e mucosa ocorre em 20 países, sendo endêmica em 18 deles, com diferentes intensidades de transmissão. Entre os anos de 2001 a 2015 foram reportados à Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 840 mil novos casos, com uma média anual de mais de 56 mil casos distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. Nos últimos cinco anos observou-se uma diminuição no número de casos e em 2015, 17 dos 18 países endêmicos, reportaram uma média de 46 mil casos. Do total de casos da região das Américas, 70% foram reportados no Brasil, Colômbia e Peru. A taxa de incidência das Américas foi de 18.35 casos por 100 mil habitantes e, as maiores incidências foram registradas no Suriname e Nicarágua^{2,4}.

2.2.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) – também conhecida como Calazar (Kala-azar) é a forma clínica mais grave, devido às complicações associadas, pode evoluir para a morte em até 95% dos casos não tratados corretamente. É caracterizada por picos febris irregulares, perda de peso, aumento considerável do baço e fígado e, anemia. É altamente endêmica na área subcontinental da Índia e Leste da África. Estima-se que ocorram cerca de 50-90 mil novos casos ao ano no mundo. Em 2015 mais de 90% dos casos reportados pela OMS ocorreram em 7 países, sendo eles: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão^{2,4}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou que em 2012 a leishmaniose visceral distribuía-se por 102 países, áreas ou territórios pelo mundo. Na maioria dos países o estudo refere-se a um número de casos reportados até 2010 (desde 2008), a OMS estimou que 90% dos casos de leishmaniose visceral humana (LV) ocorreu em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sul do Sudão e Sudão.⁵ Já, em outro levantamento feito, estimou-se que em 2012 houve 300 mil casos de LV, com mais de 20 mil casos de morte no mundo, esse senso demonstrou que o Brasil reportou mais de 1.000 novos casos de LV em 2012⁵.

Nas Américas os casos de Leishmaniose Visceral estão presentes em 12 países, no entanto 96% dos casos ocorrem no Brasil. No período de 2001 a 2015 foram reportados mais de 52 mil casos nas Américas e, observou-se que entre 2004 e 2011 houve uma tendência estável no número de casos, com média anual de cerca de 3.800 casos. Em 2012 houve redução de 1.000 casos no número anual e, a partir de 2013 houve incremento de casos atingindo um número de quase 3.500 no ano. Em 2015 reportou-se uma taxa de 2,27 casos por 100 mil habitantes, o que resultou em 3.456 casos de Leishmaniose Visceral nas Américas. Esses casos ocorreram em oito países e dos casos reportados, 95% ocorreram no Brasil⁴.

Com relação à distribuição populacional e etária dos casos de LV reportados em 2015; 64% dos casos atingiu pessoas do sexo masculino, 35% pessoas com idade entre 20 e 50 anos, 31% crianças menores de 5 anos de idade e 14% em adultos acima de 50 anos de idade. Observou-se um total de 257 casos de coinfeção de LV com HIV (vírus da imunodeficiência humana), no mesmo ano e, 244 destes ocorreram no Brasil. A proporção de cura foi de 68% e os óbitos ocorreram em 268 casos, sendo 251 deles no Brasil⁴.

No Brasil é uma doença de notificação compulsória, conhecida como Calazar, barriga d'água, esplenomegalia tropical, dentre outras denominações, segundo o Ministério da Saúde entre os anos de 1984 a 2002 foram notificados 48.455 casos de LV, sendo que 66% destes estavam localizados nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos 10 anos desse levantamento a média anual de casos foi de 3.156, concluindo que a incidência foi de dois casos para cada 100 mil habitantes. A doença demonstrou-se mais frequente em crianças de até 10 anos, sendo que 41% (dos 54,4% casos de crianças) ocorreram em menores de 5 anos de idade, isso se dá pela maior susceptibilidade relativa à imaturidade imunológica desses indivíduos, agravado pelos casos de desnutrição que são comuns nessas áreas de maior ocorrência da LV¹.

Apesar de ser conhecida como doença de caráter eminentemente rural, os desmatamentos e os processos migratórios somados ao crescimento urbano desordenado, têm sido apontados como os principais determinantes para a expansão e alteração do perfil epidemiológico da LV no Brasil, o que facilitou a urbanização do vetor em municípios de médio e grande porte. Na década de 90, em

média 89% dos casos se concentravam na região Nordeste e estavam distribuídos em quatro regiões brasileiras. Em meados da década de 2000, a média dos casos registrados no Nordeste, caiu para 53% e, a partir de 2009 a doença passou a ocorrer em todas as regiões do país, demonstrando a urbanização da LV. No ano de 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos no país. Dados dos últimos 10 anos demonstram surtos de LV no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS*), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e epidemias ocorridas em Três Lagoas (MS*), Campo Grande (MS*) e Palmas (TO). É importante ressaltar que a principal condição de transmissibilidade nesses novos ambientes está relacionada à adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* ao peridomicílio, favorecida por diversos fatores e pela presença de animais domésticos⁶⁻⁷⁻⁸.

Em estudo realizado no estado de São Paulo entre 1999 e 2011 detectou-se que 73 municípios têm potencial transmissão da doença para humanos, as primeiras ocorrências foram em locais de maiores temperaturas e menos úmidas, mas as ocorrências conseguintes também se deram em regiões menos quentes e mais úmidas. A expansão da LV humana demonstrou eixo de disseminação do noroeste para o sudeste e eixo secundário de norte a sul do estado, possíveis fatores determinantes para essa expansão foram a rodovia Marechal Rondon e a construção do gasoduto Brasil-Bolívia. Os municípios detectados com maior taxa de incidência e mortalidade incluíram Araçatuba, Presidente Prudente e Marília⁹. Outro estudo conduzido na mesorregião de Presidente Prudente (SP) e publicado em 2017, também concluiu que o gasoduto Bolívia-Brasil, a rodovia Marechal Rondon, as altas temperaturas anuais e fatores econômicos são os principais fatores de risco na dispersão da LV no estado de SP¹⁰.

Na edição de 2015 do Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)¹¹ foram publicados os dados analisados durante o ano de 2014 que revelaram 132 municípios do estado de São Paulo com transmissão de LV, sendo que destes, 76 municípios apresentaram casos humanos e animais autóctones, 47 municípios apresentaram casos caninos não autóctones e 9 apresentaram casos autóctones somente em humanos. No estado de São Paulo, durante o período de 1999 – 2014 foram notificados 5.798 casos suspeitos de LV, sendo 2.467 casos autóctones,

distribuídos em 85 municípios, e com índice de mortalidade de 8,7%. O ano de maior incidência foi o ano de 2008 (294 casos) e o ano com maior taxa de letalidade foi 2003 (14%)¹¹.

2.3. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

2.3.1 Distribuição do vetor

Um estudo realizado em Panorama (SP) capturou e analisou a população de flebotomíneos durante o período de 24 meses (entre 2012 e 2014); apresentando uma amostra total de 4.120 flebotomíneos capturados, no qual houve a predominância de *Lu. longipalpis* em 97,2% das espécies capturadas, sendo 74,8% de machos e 25,2% de fêmeas e, a mais alta prevalência de captura ocorreu entre os meses de novembro a março (estação chuvosa no estado de São Paulo)¹².

Em outro estudo publicado em 2015, foi feito um levantamento da mesorregião de Presidente Prudente e Montalvão (SP), o Estado de São Paulo possui uma distribuição espacial de *Lu. longipalpis* e LVC em 148 municípios, onde o vetor foi encontrado em 32 dos 45 municípios da mesorregião de Presidente Prudente e, LVC foi encontrada 15 dos 45 municípios desta mesma mesorregião¹³.

2.3.2 Vetor

Os vetores da doença são insetos voadores conhecidos como flebotomíneos e são de grande importância médica, pois são vetores de diversos patógenos, incluindo os responsáveis pela Leishmaniose. Apesar de não haver um consenso universal sobre a classificação genérica dos flebotomíneos, o posicionamento das espécies no Velho Mundo é, geralmente, mais aceito do que a classificação dada no Novo Mundo. Durante muitos anos somente 3 gêneros têm sido reconhecidos: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*³. No caso dos flebotomíneos neotropicais, há diversos conceitos e divergências entre autores, uma classificação publicada por Galati, et al.¹⁴, apresentam 464 espécies em 22 gêneros, 20 subgêneros, 3 grupos de espécies e 28 séries.

Shimabukuro, et al.¹⁵, em um estudo de dados de distribuição geográfica demonstrou a ocorrência de 69 espécies diferentes de flebotomíneos no estado de São Paulo, entre as datas de 1943 a 2010, sendo que 36 espécies já haviam sido catalogadas nos anos de 1947 e 1978 e, foi incluso o registro de 33 espécies adicionais de flebotomíneos. Este estudo atualizou os dados e reclassificou as espécies catalogadas em 1947 e 1978, em acordo com a classificação filogenética apresentada por Galati, *et.al.* (2003), o qual reagrupou as espécies de flebotomíneos americanos em 22 gêneros, sendo que 14 destes foram registrados no estado de SP.

O principal vetor envolvido na transmissão da Leishmaniose, ao cão e ao homem, é da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O cão é o principal reservatório doméstico do protozoário *Leishmania*^{1,14}. Entretanto após a ocorrência de casos de LVC em uma cidade da grande São Paulo, onde as espécies de flebotomíneos predominantes são *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*, Galvis-Ovallos et al.¹⁶ fizeram um estudo experimental com essas três espécies de flebotomíneos, onde foram avaliados: hábito alimentar, atratividade ao cão, expectativa de vida após repasto sanguíneo e a susceptibilidade ao *L. infantum*. Com os resultados obtidos nesse estudo pôde-se concluir que as duas espécies tem atratividade pelo cão, porém varia conforme a intensidade de ocorrência de cada espécie na região. O hábito alimentar das três espécies demonstrou que o *Lu. longipalpis* têm, significativamente, maior proporção de alimentação por sangue canino. A frequência de repasto sanguíneo do *Lu. longipalpis* é maior do que das outras duas espécies estudadas; quanto à sobrevivência após repasto sanguíneo, as três espécies, mesmo em baixa densidade, são passíveis de manter o ciclo de transmissão, pois têm longa vida infectiva. E no experimento da susceptibilidade ao *L. infantum* concluiu-se que, após contaminação experimental, o *Pi. Fischeri* teve susceptibilidade no desenvolvimento do *L. infantum* em seu organismo, porém, o *Pi. Fischeri* tem eficiência mais baixa na transmissão da *L. infantum* do que o *Lu. longipalpis*, entretanto na ausência da principal espécie de vetor, o *Pi. fischeri* apresenta potencial para ser vetor da *Leishmania*¹⁶.

No ciclo de vida do flebotomíneo as fases de ovo, larva e pupa desenvolvem-se em microambientes úmidos e ricos em matéria orgânica. Os tempos precisos de desenvolvimento de cada fase não são fixos, pois a temperatura ambiente influencia

nesse tempo, sendo que baixas temperaturas aumentam o tempo de desenvolvimento e altas temperaturas encurtam esse tempo. Em condições laboratoriais os ovos desenvolveram-se em média de 7 – 10 dias, larvas demoram, pelo menos 3 semanas para transformarem-se em pupas e o adulto emerge da pupa depois 10 dias, sendo que os machos emergem mais rápido que as fêmeas; os estágios imaturos são difíceis de encontrar na natureza e os locais de alimentação da maioria dos vetores são desconhecidos^{1,3,17}.

Como comportamento reprodutivo, os machos de algumas espécies, como: *Lu. longipalpis*, *Lu. migonei* e *P. argentipes*, esperam no hospedeiro pela fêmea e nesse momento de alimentação da fêmea os machos a cortejam para reproduzir, esse comportamento é conhecido como *lekking*¹.

O aparelho bucal dos machos é pouco desenvolvido para perfurar a pele de um hospedeiro, sendo assim, ocasionalmente pode ser encontrado sangue no estômago dos machos, nesses casos se supõe que a alimentação se deu através de alguma lesão da pele, mesmo assim os machos não têm importância na transmissão de doenças. As fêmeas de praticamente todas as espécies se alimentam de sangue do hospedeiro para ter o desenvolvimento dos ovos. Durante o dia os flebotomíneos ficam alojados e protegidos em locais frescos e úmidos, como: vegetação densa, buracos em paredes, latrinas, celeiros, estábulos, dentre outros. A atividade alimentar dos flebotomíneos é crepuscular e noturna^{3,17}.

No Brasil os flebotomíneos são popularmente conhecidos como: mosquito palha, tatuquiras e birigui, dependendo da região do país. Na década de 2.000 duas espécies foram relacionadas com a transmissão da doença, sendo elas: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo que a *Lu. longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora do protozoário *Leishmania infantum chagasi*. A distribuição do *Lu. longipalpis* no Brasil é ampla e em expansão, sendo encontrada em quatro das cinco regiões brasileiras: nordeste, norte, sudeste e centro-oeste¹.

Nas regiões norte e nordeste o vetor encontra-se, originalmente, em áreas de mata, porém com a expansão demográfica esses insetos adaptaram-se a área rural e sua adaptação deu-se, principalmente, pela presença de animais sinantrópicos e silvestres. Na região sudeste verificou-se, no final da década de 80, uma adaptação desse inseto aos ambientes urbanos, em periferias de grandes

centros, podendo assim ser encontrado em peri domicílio, galinheiros, chiqueiro, canil, paiol e ambiente intra domicílio. O *Lu. longipalpis* adapta-se facilmente ao peri domicílio e a variações de temperatura, podendo ser encontrado no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos, há indícios de que o maior período de transmissão ocorra durante a estação chuvosa, quando há aumento populacional do inseto¹.

2.3.3 Protozoários

As Leishmanias são organismos que pertencem ao Reino: Protozoa (Goldfuss, 1818 *apud* Lainson, 2010), Filo: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1998 *apud* Lainson, 2010), Classe: Kinetoplastea (Honigberg, 1963 *apud* Lainson, 2010), Ordem: Trypanosomatida (Kent, 1880 *apud* Lainson, 2010), Família: Trypanosomidae (Doflein, 1901 *apud* Lainson, 2010), Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903 *apud* Lainson, 2010) e Subgênero: *Leishmania* (Ross, 1903 *apud* Lainson, 2010).

Lainson e Shaw (2005 [*apud* Lainson, 2010])¹⁸ propuseram uma importante mudança na classificação do subgênero *Leishmania*, essa mudança consistia em dividir a espécie *L. infantum* em duas subespécies: *L. infantum* (Velho Mundo) e *L. infantum chagasi* (Novo Mundo); além disso, a nova classificação incluiria a *L. forattinii*, espécie encontrada em gambá (*Didelphis marsupialis*) e roedor (*Proechimys iheringi denigratus*) no Brasil. A distribuição geográfica da *L. infantum chagasi* ocorre na maior parte do continente latino-americano, incluindo: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Martinica, México, Nicarágua, Paraguai, Suriname e Venezuela¹⁸. O principal vetor conhecido é o *Lu. longipalpis*, porém o *Lu. evansi* também foi incriminado na Colômbia e Venezuela¹⁹⁻²⁰. O *Lu. cruzi* tornou-se fortemente suspeito de ser um vetor alternativo no Brasil (MS*) após o isolamento de *L. infantum chagasi* em 14 espécimes²¹.

As espécies *L.(V) braziliensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) guyanensis* e *L. infantum chagasi* também são as espécies responsáveis pelas doenças, cutânea / mucocutânea e visceral respectivamente, em animais domésticos, mais

frequentemente nos cães; porém recentes estudos apontam diversos casos de LV em gatos domésticos²²⁻²³⁻²⁴⁻²⁵⁻²⁵⁻²⁶.

As Leishmanias são protozoários que possuem ciclo biológico heteroxênico, ou seja, necessitam de 2 hospedeiros diferentes para conseguir cumprir sua evolução. Sua forma promastigota (flagelada) desenvolve-se no sistema intestinal do vetor (flebotomíneo), já no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigotas (sem flagelo), na classe de hospedeiros vertebrados enquadram-se os canídeos silvestres e domésticos, roedores e humanos. São parasitas intracelulares obrigatórios, penetrando e se multiplicando em células do sistema mononuclear fagocitário^{1,23,28}.

2.3.4 Sinais Clínicos

A LVC é uma doença sistêmica, crônica e grave, de evolução lenta e início insidioso, pode levar o cão à morte em caso de falha diagnóstica ou tratamento não adequado^{1,23,29}. Acomete diversos órgãos e sistemas, aparentemente, exceto o sistema nervoso central, sua manifestação clínica tem um amplo espectro de sinais que variam de assintomáticos e sinais brandos a sinais severos. A idade é um fator importante demonstrando que a maior prevalência encontrada é em cães de até 3 anos de idade ou acima de 8 anos^{23,29}.

Devido à alta taxa de cães assintomáticos, o diagnóstico clínico da LVC é muito complexo e nos casos sintomáticos a apresentação clínica da doença se assemelha a diversas outras enfermidades^{1,23-24}.

A doença renal pode ser a única manifestação clínica da doença e há alta prevalência desse tipo de lesão em cães acometidos com LV, essas lesões podem progredir de leve proteinúria até síndrome nefrótica ou estágio final de falência renal. A falência renal crônica é o resultado da progressão da doença e a principal causa de morte de cães infectados²³.

Para auxiliar no diagnóstico clínico da LVC, alguns autores sugeriram uma classificação em estágios, conforme abaixo:

Estágio I (doença leve): exames citológicos, histológicos, parasitológicos e molecular são geralmente negativos, pode haver baixos títulos de anticorpos (Ac) anti-Leishmania; os animais podem ser clinicamente saudáveis ou apresentar leves

sinais como dermatite e/ou linfadenomegalia generalizada, que podem estar associadas a outras doenças. Os exames laboratoriais hematológicos, bioquímicos e perfil renal encontram-se normais nesse estágio^{22-23,30}.

Estágio II (doença moderada): os animais apresentam resultados confirmatórios de parasitose por exames como: parasitológico direto, cultura parasitológica ou PCR, mesmo quem tenha apresentado baixos títulos de Ac. Esses animais podem apresentar-se saudáveis ou com sinais clínicos sugestivos da doença, como: lesões esfoliativas, dermatite, onicogribose, úlceras (plano nasal, patas, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxis. Os exames hematológicos e bioquímicos podem apresentar leve anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e, o perfil renal pode estar normal ou com proteinúria^{22-23,30}.

Estágio III (doença severa): os animais nesse caso apresentam citologia positiva e, de médios a altos títulos de Ac. Os sinais clínicos como: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite podem estar somados aos sinais clínicos citados nos estágios anteriores. Exames laboratoriais como os estágios citados anteriormente associados à doença renal crônica em estágio I ou II^{22-23,30}.

Estágio IV (doença muito severa): parasitológico direto positivo e de médio a altos títulos de Ac. Além dos sinais clínicos mencionados nos estágios anteriores, também há evidência de proteinúria severa, síndrome nefrótica, doença renal crônica em estágio III ou IV ou, até mesmo falência renal, concomitantemente, tromboembolismo pulmonar, problemas oculares severos, doenças articulares que dificultam a mobilidade e, a presença de doenças concomitantes e/ou co-infecções também são comuns nesse estágio^{22-23,30}.

2.3.5 Testes Diagnósticos

O diagnóstico da LVC é complexo, assim como o diagnóstico por sinais clínicos tem amplo espectro, os exames sanguíneos hematológicos e bioquímicos também abrangem uma ampla faixa de alterações não específicas para a Leishmaniose²²⁻²³.

2.3.5.1 Exame Bioquímico

No exame bioquímico pode ser realizada a análise das proteínas plasmáticas, que vão auxiliar no diagnóstico de algumas doenças de caráter infeccioso. As proteínas plasmáticas totais (PPT) são sintetizadas principalmente no fígado e são constituídas de aminoácidos obtidos após quebra e absorção intestinal. Os dois principais tipos de proteínas plasmáticas são a albumina e a globulina³¹⁻³².

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, é sintetizada no fígado, contribui para o equilíbrio da pressão osmótica e participa do transporte de diversas substâncias (por exemplo: hormônios, ácidos graxos, bilirrubina não conjugada), sendo que uma diminuição do seu valor sérico pode ser decorrente de doença hepática (devido a menor produção), má nutrição ou absorção e/ou doença glomerular, o que leva a uma maior perda desta proteína³¹⁻³².

As globulinas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) são proteínas sintetizadas no fígado, atuam na fase aguda de doenças, são inibidoras de protease, impedem a perda de ferro e hemoglobina pela urina, auxiliam no transporte de moléculas (Interleucinas, insulina, etc.). As β -globulinas também sintetizadas pelo fígado e também importantes na fase aguda de afecções, têm como funções o transporte de ferro, impedem a perda e a deposição de ferro em tecidos, auxiliam na resposta imune, dentre outras. Já as γ -globulinas (imunoglobulinas) são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B e têm importante função na resposta imunológica do organismo frente vários tipos de afecções, doenças, microrganismos, dentre outros³²⁻³³. A hipoglobulinemia está associada a problemas hepáticos. Já a hiperglobulinemia é caracterizada pelo aumento das globulinas beta e gama. O aumento de globulinas da classe α pode ser decorrente de uso de hormônios, gravidez ou processos inflamatórios³².

Na LVC as alterações hepáticas estão associadas à evolução da doença em função da multiplicação das formas amastigotas nos macrófagos, assim a LVC pode levar à hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. O aumento das concentrações séricas de proteínas totais é consideravelmente importante em

cães com LVC, podendo alcançar valores acima de 10 g/dl, e esse aumento exacerbado se dá, principalmente, pela hiperglobulinemia³⁴.

As alterações encontradas nos exames hematológicos e bioquímicos auxiliam no diagnóstico da leishmaniose, pois, dependendo do grau de evolução da doença podem apresentar as seguintes características:

- Hematológica - leve à severa anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia e hemostase ou fibrinólise secundária²²⁻²³.

- Bioquímica - diminuição na relação albumina: globulina (A:G), leve à moderada proteinúria, azotemia renal e aumento nas atividades das enzimas hepáticas²²⁻²³.

2.3.5.2 Sorodiagnóstico

Exames sorológicos são utilizados no diagnóstico da leishmaniose, estes determinam o nível de anticorpos anti-Leishmania. Há testes rápidos que podem ser realizados na clínica e testes que podem ser realizados em laboratórios especializados. Esses testes emitem resultados positivos ou negativos e não detectam a presença do protozoário, ou seja, são testes indiretos qualitativos. Dois desses testes são preconizados como oficiais no Brasil, pelo Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa)¹.

Pensando em um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade e com o intuito de evitar o uso de métodos invasivos, o MS preconizou um protocolo de diagnóstico por métodos sorológicos; assim, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos para o diagnóstico canino. Mesmo com a alta diversidade de testes sorológicos disponíveis, o Brasil no ano de 2006, optou por trabalhar com os testes de Elisa (do inglês: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) e R.I.F.I. (reação de imunofluorescência indireta), disponíveis em kits específicos produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e autorizados pelo Mapa¹.

Em 2011, por meio de uma Nota Técnica Conjunta 01/2011, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, sendo que, a partir de então, seria utilizado o teste DPP[®] (do inglês: *Dual Path*

Platform) como triagem e o Elisa como confirmatório nos casos positivos da triagem, porém falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um alto e desconhecido número de animais não infectados e, em contrapartida, não detectar precisamente cães positivos; com isso pode-se observar que, apesar de diversos tipos de métodos diagnósticos disponíveis, o Brasil ainda não possui um método de diagnóstico sensível, específico e de fácil execução para a LVC³⁵.

2.3.5.2.1 DPP

O DPP[®] é uma tecnologia inovadora de ensaio imunocromatográfico para diagnósticos rápidos, foi desenvolvido pela empresa norte americana *Chembio Diagnostic System* em parceria com a empresa brasileira Bio-Manguinhos[®] - Rio de Janeiro/ RJ³⁶⁻³⁷. Esse teste rápido para diagnóstico da LVC oferece resultados em um período de \pm 15 minutos, sem a necessidade de estruturas e equipamentos laboratoriais, o que facilita seu uso a campo. Possui tecnologia de alta sensibilidade, o que traz precisão ao diagnóstico de LVC em sangue ou plasma sérico³⁷.

O DPP[®] trata-se de um teste imunocromatográfico qualitativo para a detecção de antígenos anti-Leishmania. Esse teste utiliza a proteína recombinante rK39 como antígeno, essa proteína é uma sequência de 39 aminoácidos clonados da região quinase específica da *L. chagasi*, e tem sido amplamente avaliada no diagnóstico da LV³⁸⁻³⁹.

2.3.5.2.2 Elisa

O ensaio sorológico imunoenzimático Elisa possibilita a análise de uma grande quantidade de amostras em pouco tempo, sendo muito útil para um diagnóstico mais rápido e de fácil execução, quando comparado ao R.I.F.I.³⁹.

A técnica Elisa permite a detecção de baixos títulos de Ac, inclusive em casos assintomáticos de LVC. Os resultados são expressos como: reagente e não reagente, o antígeno utilizado (bruto ou recombinante) é um dos fatores que influencia na variabilidade da sensibilidade e especificidade³⁹⁻⁴⁰.

2.3.5.2.3 R.I.F.I.

A R.I.F.I. é utilizada para a detecção de anticorpos contra *Leishmania* (IgG anti-*Leishmania*) em soros de cães e consiste na reação de soros com parasitas fixados em lâminas de microscopia, na etapa seguinte utiliza-se conjugado fluorescente para evidenciação da reação⁴¹.

A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerados reagentes os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina. Amostras nas quais apresentam fluorescência verde homogênea, são consideradas positivas enquanto que, àquelas de coloração vermelho mate podem ser consideradas negativas⁴¹.

2.3.5.3 PCR

A PCR é um método de diagnóstico molecular que, apresentou desenvolvimento de novas técnicas de identificação e detecção de material genético de parasitas do gênero *Leishmania*, após a década de 80. Uma das vantagens dessa técnica é a identificação gênica do parasita sem a necessidade de isolamento do mesmo em culturas. A PCR é baseado na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência genética conhecida do parasita, é uma técnica versátil que pode ser aplicada em diversas amostras biológicas, tais como: aspirados de medula óssea, aspirados de linfonodos, sangue, urina e biópsias de pele; o que o torna um método diagnóstico menos invasivo. A sensibilidade da PCR é bastante variável e depende da amostra utilizada e do marcador empregado⁴².

Nas últimas décadas a PCR tem se mostrado um exame com alta sensibilidade e uma importante ferramenta no diagnóstico da LVC. Para atingir essa sensibilidade, diversos testes de diferentes genes foram realizados por vários autores sendo possível a identificação do gênero *Leishmania* e de algumas espécies selecionadas⁴³.

No estudo publicado por Schönian et al.⁴³, foi descrito o método universal de PCR para o diagnóstico direto de diferentes estágios de manifestação clínica.

O método foi aplicado em áreas não endêmicas e em regiões com importância epidemiológica. A sensibilidade e especificidade foram comparadas com duas diferentes combinações de amplificação de *primers*: 1- parte variável do gene ssu rRNA e, 2- o espaçador transcrito interno ribossômico (ITS1-PCR). Usando a combinação 1 (ssu rRNA) foram identificados somente os complexos *L. donovani* e *L. braziliensis*. Contudo, as espécies de maior importância médica puderam ser distinguidas pela análise de enzimas de restrição da região ITS1 que se situam entre os genes que codificam o ssu e o 5.8S do rRNA. Os dois ensaios de PCR feitos usaram diferentes partes ribossômicas da *Leishmania* para as amplificações: 1- parte do gene de ssu rRNA utilizando *primers* R221 e R332 (técnica descrita em 1992 por Van Eys, *et.al.*) e, 2- espaçador transcrito interno ribossômico 1 (ITS1) separando os genes que codificam para ssu rRNA e 5.8S rRNA utilizando os *primers* LITSR e L5.8S.

A região ITS1 que separa os genes ssu rRNA e 5.8S rRNA variam entre espécies de *Leishmania* pelo tamanho e sequência de nucleotídeos; a maior vantagem desse método é que a identificação das espécies pode ser conseguida através da digestão do produto PCR com a enzima de restrição *HaeIII*⁴³.

2.3.5.4 Exame Parasitológico

Os exames parasitológicos diretos detectam a presença do parasita na amostra, porém devem ser realizados por pessoas muito experientes para que não haja resultados falsos ou falhas na interpretação.

A cultura laboratorial também é um teste parasitológico, que pode ser realizado na detecção e identificação da *Leishmania* em meios de cultura específicos²²⁻²³.

2.4 Legislações sobre Tratamento e Eutanásia no Brasil

A Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008 proíbe o tratamento de Leishmaniose Visceral Canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O tratamento não autorizado

incidiria em infrações com penalidades previstas em Lei e pelo Código de Ética do Médico Veterinário⁴⁴.

Em Setembro de 2013 foi deferido parcialmente o pedido de suspensão da decisão recorrida, permitindo a utilização da Portaria 1.426/2008, desde que a eventual eutanásia canina a ser praticada seja precedida da realização de dois testes laboratoriais comprobatórios da infectividade do cão: R.I.F.I. ou DPP[®] e Elisa; e também da criteriosa avaliação do Médico Veterinário, pertencente aos quadros públicos³⁵.

Em 2016 por meio de Nota Técnica Conjunta entre o Mapa e MS foi autorizado o registro e comercialização de um produto à base de Miltefosina de propriedade da Virbac Saúde Animal, para o tratamento da LVC. O registro do produto foi concedido respeitando a Lei Interministerial n° 1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento de cães com produtos de uso humano ou não registrados no Mapa. A miltefosina, por não ser um medicamento de escolha para o tratamento humano da LV, foi aprovada mediante análise das evidências científicas apresentadas pela empresa, para o tratamento de cães⁴⁵.

3. Objetivos

Este estudo propõe atender ao objetivo geral e aos objetivos específicos a seguir.

3.1 Objetivo geral

Detecção de *Leishmania* spp. em cães provenientes da zona sul do município de São Paulo, SP.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação físico-clínica e de proteínas plasmáticas dos cães provenientes da zona sul do município de São Paulo, SP;

- Detecção sorológica para *Leishmania* spp. em cães provenientes da zona sul do município de São Paulo, SP;

- Detecção molecular para *Leishmania* spp. em cães provenientes da zona sul do município de São Paulo, SP.

4. Justificativa

Devido à alta incidência já verificada em diversos estudos, na população humana e animal, no Brasil e em diversos outros países, o diagnóstico preciso é a chave para a escolha do melhor procedimento de tratamento, controle e prevenção, tanto para os animais quanto para os seres humanos e, para a notificação de doenças de caráter zoonótico e criação de banco de dados epidemiológicos nas regiões. Os locais escolhidos para a realização do estudo não são identificados como região endêmica, portanto sem importância para os inquéritos epidemiológicos atuais dessa doença; porém são áreas com uma grande população de cães, inclusive cães errantes e, extensa área de preservação ambiental.

5. Materiais e Métodos

5.1 Local do estudo

Os animais participantes do estudo foram selecionados aleatoriamente nos bairros do Grajaú, em duas localidades: Rua Gaivotas do Céu em 18/06/2016 e Travessa Acácia-Mimosa em 13/08/2016 (essas duas com distância média de 3,5 km entre elas) e, na Ilha do Bororé em 09/04/2016. Esses animais compareceram, com seus devidos responsáveis, as escolas municipais dessas localizações para realização da esterilização cirúrgica eletiva.

5.2 População do Estudo

O acesso aos animais participantes do estudo foi possível pela parceria firmada com o prof. Dr. Rafael Garabel Agopian, docente da UNISA, quem disponibilizou nosso acesso aos locais de campanha e nos permitiu a colheita do material biológico dos pacientes.

Neste estudo foram coletadas amostras de sangue de 153 cães, residentes nas regiões de Grajaú e Ilha do Bororé. Os cães foram selecionados aleatoriamente, conforme autorização de seu tutor para a colheita de amostra e execução dos estudos, mediante explicação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - Apêndice A.

Foram utilizados cães acima de 3 meses de idade, machos e fêmeas, com e sem sinais clínicos de doenças pré-existentes, de variadas raças e sem raça definida (SRD).

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santo Amaro, protocolo de aprovação nº 05/2016.

5.2.1 Amostras coletadas

As amostras foram coletadas em três datas das campanhas de castração, ocorridas nos meses de Abril, Junho e Agosto do ano de 2016. Foram armazenadas

em congelamento, após a centrifugação e separação do soro e concentrado de hemácias em *eppendorfes* identificados com o número de registro do animal na campanha e a data de coleta.

O processamento das amostras foi realizado em parceria com o Prof. Msc. Márcio Antônio Batistela Moreira da Universidade Anhembi Morumbi – *Campus Mooca*; com o professor Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto do Instituto Adolf; com a Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa da Universidade Estadual do Maranhão, com o Prof. Dr. Arlei Marcili da Universidade Santo Amaro, e com o Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna da Universidade São Paulo.

5.2.2 Exame Físico dos animais

Ao exame físico, foi avaliada a mucosa oral delimitada em escore **N** – normal, ou seja, normocorada (róseo-clara, brilhante e ligeiramente úmida) ou **P** – pálida, ou seja, hipocorada; a condição corporal dos animais, também delimitada em escores, como: *Caquético, Magro, Ideal, Gordo e Obeso*; avaliada a pele para verificação de ocorrência de lesões dermatológicas, sendo anotadas: a localização e o tipo de lesão no mapa dermatológico e na tabela de sinais, presentes na ficha clínica (Apêndice B); os linfonodos pré-escapulares e poplíteos foram palpados para verificação do tamanho, consistência, temperatura, formação do nodo e aderência aos tecidos circundantes, resultado delimitado em escore **N** – normal, **A** – alterado, informação também constante na tabela de sinais da ficha clínica.

5.3 Procedimento de colheita

A amostra de sangue foi obtida através da punção da veia safena lateral, cefálica ou jugular, utilizando-se para isso agulhas descartáveis hipodérmicas. Foi coletada uma quantidade de 4 mL \pm 1 mL de cada animal. Após a colheita, o sangue foi transferido, cuidadosamente, para frascos *vacutainer*[®] sem aditivos ou anticoagulantes e armazenados em caixa isotérmica, para transporte até o Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

(FMVZ-USP) para a centrifugação e separação do plasma e concentrado de hemácias.

Cada material biológico foi colocado em tubos *ependorfes* de 1 mL, sendo 2 tubos destinados ao plasma e 1 tubo destinado ao concentrado de hemácias. Cada tubo foi identificado com o número de identificação do animal e data de colheita.

5.4 Avaliações laboratoriais

5.4.1 Proteínas Plasmáticas

Para o perfil bioquímico desta dissertação, foram analisados: albumina (ALB) e globulina (GLO). Os valores de referência em cães para Albumina é considerado fisiológico entre 2,5 a 4,0 g/dL e para Globulina o limite de referência é entre 2,5 e 5,4 g/dl; como valor de referência para a relação A:G foi utilizado o intervalo entre 0,59 – 1,1 µg/dl^{34,46}.

5.4.2 Sorodiagnóstico

Na presente dissertação foram escolhidos os três testes sorológicos, os dois atualmente usados como oficiais para inquéritos epidemiológicos realizados pelos órgãos brasileiros, DPP[®] (triagem) e Elisa (confirmatório) e o R.I.F.I., que era utilizado, antes da introdução do DPP[®], como confirmatório.

5.4.2.1 DPP[®] e TR DPP[®] (Teste Rápido *Dual Path Platform*)

Esse dispositivo é um teste rápido que pode ser aplicado facilmente à campo e sua reação é baseada na reatividade de partículas de ouro coloidais acompanhadas de proteínas com antígenos ligados à anticorpos, os quais podem ser visualizados através da coloração de uma banda do teste⁴⁷.

Para a realização do teste DPP[®] foi feita a adição de 5 µl de sangue total (amostra) ao poço #1 (amostra + tampão) e em seguida adicionou-se o tampão. Após 5 minutos as duas linhas de coloração azul, controle (C) e teste (T), desapareceram e então, se colocou a solução tampão no poço #2 (tampão); após

± 15 minutos foi possível fazer a leitura visual das linhas vermelhas que apareceram. Se tiver somente 1 linha – resultado negativo; se aparecerem 2 linhas – resultado positivo³⁹.

No presente estudo foi realizada a leitura visual conforme orientações de bula sobre o procedimento, já citadas acima.

Figura 1 - Foto dos Kits DPP[®] com as amostras do estudo.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.2.2. Teste Elisa

O teste Elisa consiste na reação de anticorpos presentes no soro ou plasma, com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse Ag é adsorvido em microplacas (fase sólida), faz-se a adição dos soros controle positivo e negativo e das amostras previamente diluídas. Na próxima etapa é adicionado o substrato, anti-imunoglobulina, que, na presença de Ac específicos ocorre a ligação entre conjugado-anticorpo, o qual poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena; essa junção formará um composto colorido, o que indica que é um resultado “reagente”. As cavidades que não tiverem Ac específicos, não haverá a ligação, portanto, a reação não produz coloração, sendo assim considerada “não-reagente”⁴⁸.

O resultado considerado reagente é aquele que apresenta o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvios-padrão do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo¹.

5.4.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (R.I.F.I.)

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada nesse estudo de acordo com o procedimento descrito por Oliveira, et al.⁴⁹ e da Costa, et al.⁴⁷. No presente estudo a R.I.F.I. foi executada considerando a diluição $\geq 1:80$ como resultado positivo para LVC. Os resultados obtidos com diluição 1:40 são resultados duvidosos e que devem ser repetidos com outras técnicas diagnósticas²³.

5.4.3 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

As amostras de concentrado de hemácias foram processadas pelo procedimento de extração de DNA de forma individual, utilizando o kit de extração “*Dneasy Tissue Kit*” (Qiagen, Chatswoth, CA), conforme as instruções do fabricante e, preparadas para a realização da PCR.

O diagnóstico molecular utilizado nesta dissertação foi através do gene ITS (Espaçador intergênico transcrito), utilizando os primers LITSR e L5.8S. Os ensaios foram realizados conforme Schönian, et al.⁴³.

6. Resultados

Os animais participantes do estudo foram selecionados em acordo com a concordância do tutor ou responsável que o acompanhava nas campanhas de castração. A tabela 1 apresenta a população utilizada no estudo, separada por sexo, raça e idade.

Tabela 1 - Amostragem dos animais do estudo, segundo sexo, raça e idade

	Sexo		Raça		Idade		
	<i>Fêmea</i>	<i>Macho</i>	<i>SRD</i>	<i>Raça</i>	<i>< 1 ano</i>	<i>≥ 1 ano</i>	<i>Não definido</i>
Quantidade	116	37	125	28	34	117	2
Total	153						

Fonte: Arquivo pessoal.

No exame físico realizado, não foram observadas alterações no tamanho dos linfonodos axilares ou poplíteos em nenhum dos animais. Um animal apresentou caquexia e um animal com magreza, seis animais apresentaram mucosas hipocoradas e, 13 dos 153 animais apresentaram algumas lesões de pele, sendo elas localizadas ou generalizadas e as mais comuns encontradas foram alopecia, dermatite nodular e crostas; dentre as lesões dermatológicas, as regiões de maior prevalência foram membros, tórax e orelhas. Destes 13 animais, sete são pertencentes ao Grajaú (Gaivotas do Céu) e a principal lesão encontrada foi dermatite nodular localizada com alopecia, dois desses animais apresentaram também palidez de mucosa oral e um apresentou magreza. Os demais 6 animais foram atendidos na Ilha do Bororé e a principal lesão encontrada também foi dermatite, com maior incidência de alopecia generalizada, 4 animais com palidez de mucosa oral e 1 animal em estado de caquexia, com atrofia muscular em região de membros e tórax (tabela 2).

Tabela 2 - Resultados dos exames físicos

Local	Lesão dermatológica localizada	Lesão dermatológica generalizada	Escore corporal Magro / Caquético	Palidez de mucosas
Ilha do Bororé	3	3	1	4
Gaivotas do Céu	7	0	1	2
Travessa Acácia	0	0	0	0
Total	10	3	2	6

Fonte: Arquivo pessoal.

Nas figuras 1, 2 e 3 podem ser visualizadas as principais lesões encontradas na pele dos animais atendidos nesse projeto. Não fora realizado registro fotográfico dos animais atendidos na data 13/08/2016, localidade Grajaú – Travessa Acácia-Mimosa, pois em nenhum deles foi encontrada qualquer lesão que pudesse ser compatível com sinais de LVC.

FIGURAS 2 E 3 – Animal de identificação número 69, atendido na Ilha do Bororé em 09/04/2016.



Fonte: Arquivo pessoal.

FIGURA 4 – Animal de identificação número 123, atendido no Grajaú, R. Gaivotas do Céu em 18/06/2016.



Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto aos resultados sorológicos, estes demonstram que no exame DPP[®] nenhum dos animais estudados apresentou resultado reagente à leitura visual. No teste Elisa nenhum dos animais apresentou resultado reagente, desta forma, podemos dizer que 100% das amostras analisadas pelos testes oficiais preconizados pelo MS em inquéritos sorológicos, resultaram como **não reagente**. Os resultados de todos os animais e suas devidas concentrações encontram-se nas tabelas 4, 5 e 6 no Apêndice C desta dissertação.

No teste R.I.F.I. um animal apresentou resultado **positivo**, com titulação 80, as demais amostras avaliadas resultaram negativas. Esse animal positivo foi atendido no Grajaú (Travessa Acácia). Os resultados do R.I.F.I. de todos os animais do estudo, encontram-se na tabela 8, Apêndice D dessa dissertação.

Na avaliação proteica do soro dos animais obtiveram-se os seguintes resultados: na região da Ilha do Bororé 12 dos animais apresentaram hipoalbuminemia e 1 animal com hiperglobulinemia (este é um dos animais dentre os 12 citados acima); na região do Grajaú (Gaivota do Céu) verificou-se 4 animais com hipoalbuminemia e um animal com hiperglobulinemia (este animal é um dos 4 animais citados acima) e, no Grajaú (Travessa Acácia) um animal apresentou hipoalbuminemia e nenhum com hiperglobulinemia. Já na análise da relação A:G, pôde ser observado que 8 dos 153 animais apresentaram valor abaixo de 0,59 g/dl (limite mínimo do intervalo de referência usado). Destes 8 animais com queda na

relação A:G, 6 são pertencentes à Ilha do Bororé e 2 pertencentes ao Grajaú (Gaivotas do Céu), os resultados completos de todos os animais, encontram-se na tabela 8 no final dessa dissertação, Apêndice E.

Na PCR ITS um animal apresentou resultado **positivo**, as demais amostras avaliadas resultaram-se negativas. Esse animal positivo foi atendido no Grajaú (Travessa Acácia) e a tabela 9 com todos os resultados da PCR encontra-se no Apêndice F.

A tabela 3, abaixo, demonstra a quantidade de animais, por local, que apresentaram resultados: Reagente (R) e Não Reagente (NR) nos exames DPP[®] e Elisa; positivo (+) e negativo (-) nos exames R.I.F.I. e PCR; e valores abaixo do mínimo da referência (0,59 µg/l) para a relação Albumina:globulina (A:G).

Tabela 3 - Resultados dos exames laboratoriais

Local	DPP		Elisa		R.I.F.I.		PCR		A:G
	R	NR	R	NR	+	-	+	-	
Ilha do Bororé	0	53	0	53	0	53	0	53	6
Gaivotas do Céu	0	54	0	54	0	54	0	54	2
Travessa Acácia	0	46	0	46	1	45	1	45	0
Total	0	153	0	153	1	152	1	152	8

Fonte: Arquivo pessoal.

7. Discussão

Dentre os animais que apresentaram sinais dermatológicos nesse estudo, os sinais mais evidentes foram alopecia e dermatite nodular ou crostosa, apresentando-se de forma generalizada ou localizada. Segundo Solano-Gallego et al.²³, descrevem na tabela de manifestações clínicas, as dermatites esfoliativas associadas ou não a alopecia e as dermatites nodulares como sinais relacionados à LVC. Baneth, et al.²⁴ e Paltrinieri, et al.²² também apontam que as alterações dermatológicas são as manifestações mais frequentes dentre as alterações generalizadas possíveis de se encontrar em cães com Leishmaniose Visceral e, podem ser vistas em conjunto com demais anomalias causadas por essa doença.

Alguns dos animais avaliados apresentaram estado nutricional comprometido, com emagrecimento severo e palidez de mucosas. Dentre as manifestações clínicas mais comuns da Leishmaniose a perda de peso e palidez de mucosas, além das dermatológicas, também são manifestações descritas por diversos autores, como Silva²⁸, Paltrinieri, et al.²² e Solano-Gallego, et al.²³.

Na avaliação das proteínas plasmáticas puderam ser observadas, em oito animais, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia o que causou alteração da relação dessas proteínas, resultando em valores abaixo do limite de referência utilizado (A:G 0,59 – 1,1 µg/dl). A inversão da relação A:G revela uma diminuição na concentração sérica de albumina e aumento na concentração de globulina, que pode ser devido ao aumento de Ac anti-*Leishmania*, o que está relacionado com a sintomatologia da doença, havendo então, uma relação importante entre o agravamento dos sinais clínicos e o aumento da globulina sérica³⁴. A hipoalbuminemia também pode ser secundária a um comprometimento hepático, no qual pode ocorrer devido à proteinúria ou desnutrição em casos de animais nefropatas e/ou anoréxicos³⁴. E a hiperproteinemia, na LVC, pode ser decorrente da ativação dos linfócitos B e consequente produção elevada de anticorpos (γ globulina)⁴⁶. Os sinais clínicos verificados, em dois dos animais do estudo, puderam ser relacionados com a alteração na relação das proteínas Albumina e Globulina (A:G ≤ 0,59 µg/dl), desta forma, esses resultados podem ser relativos à

Leishmaniose porém, também, à outra doença de caráter infeccioso ou mesmo lesões hepáticas que comprometam a fração proteica.

Em um estudo realizado por Castro, et al.³⁴ onde se avaliou 40 cães sorologicamente reagentes para Leishmaniose, no estado de MG, observou-se que, a queda na relação A:G foi estatisticamente significativa em cães com sintomatologia de LVC, porém os três grupos de estudo (animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) apresentaram relação A:G abaixo dos valores de referência, entretanto algumas enzimas avaliadoras da função hepática mantiveram-se dentro dos parâmetros fisiológicos, sendo assim, os resultados deste estudo, demonstraram que a LVC pode levar a alterações nos parâmetros proteicos independentemente da sintomatologia apresentada pelos cães. Já em um estudo publicado por Medeiros, et.al.⁵⁰ foi realizada a avaliação do perfil hematológico de cães sorologicamente reagentes e não reagentes no exame R.I.F.I., neste, analisaram 290 amostras biológicas, sendo 145 reagentes e 145 não reagentes para R.I.F.I. e, na avaliação da proteína plasmática total foi observado que hiperproteinemia ocorreu em cães sorologicamente reagentes.

Na avaliação sorológica dessa dissertação, não houve nenhum resultado positivo nos testes DPP[®] e Elisa. O teste R.I.F.I. apresentou um animal positivo, porém o mesmo não apresentou demais resultados positivos ou sinais clínicos que pudessem ser correlacionados a esse exame, sendo assim, esse resultado pode ser indicativo de infecção por *Leishmania* spp. ou um resultado falso positivo (por reação cruzada com outro agente etiológico ou contaminação da reação), o que somente poderá ser confirmado através de exames parasitológicos e acompanhamento clínico deste animal.

Um estudo realizado por Lima, et al.⁵¹ demonstrou resultados do DPP em 52 animais sintomáticos, dos quais 91,5% apresentaram positividade, porém em relação aos animais assintomáticos, também 52, a porcentagem de animais positivos foi menor, 52,9%⁵³. Bisugo, et.al.⁵² avaliaram 1199 soros caninos de municípios do Estado de São Paulo, com transmissão de LCV, apresentaram os seguintes resultados: teste rápido anti-rK39 – 31,3% de positividade, R.I.F.I. e Elisa com anticorpos anti-*Leishmania* – 25,1% e 27,2% de positividade, respectivamente e todos os 134 soros do grupo controle apresentaram-se

negativos. Laurenti & Leandro Jr., et.al.⁵³ realizaram um estudo com 85 amostras sorológicas de cães sintomáticos e assintomáticos, provenientes de regiões endêmicas e 18 animais controle e obtiveram os seguintes resultados: 77/85 amostras positivas no DPP e Elisa e 82/85 amostras reagentes no R.I.F.I., as amostras controle resultaram negativas nos exames.

No estudo realizado por da Costa, et al.⁴⁷ foram coletadas amostras de 960 cães de seis municípios, com seis diferentes ecossistemas no estado do Maranhão, Brasil, este estudo resultou com positividade para LVC em 59,1% dos animais no Elisa; 14,5% no DPP[®] e 13,1% no R.I.F.I., sendo o ecossistema Amazônia o de maior incidência de animais positivos. De Lima, et al.⁵⁴ coletaram soro sanguíneo de 327 cães residentes dos vilarejos de Urubu Branco e Tapirapé Karajá (tribos indígenas da região Amazônica), áreas não endêmicas e, de todas as amostras analisadas, 13 animais apresentaram positividade no Elisa, dois animais positivos no R.I.F.I. e nenhum positivo no DPP[®].

A despeito da abordagem sobre a associação diagnóstica, entre os exames clínicos e laboratoriais que são realizados para detecção da LVC, Assis, et al.⁵⁵ avaliaram 34 cães da região de Ilha Solteira – SP, com relação à sintomatologia e exames laboratoriais, nesse estudo os cães foram separados em 3 grupos, sendo eles, assintomáticos (apresentavam aparência saudável), oligossintomáticos (até 3 sinais clínicos) e polissintomáticos (cl clinicamente comprometidos) e, foram realizados testes sorológicos, molecular e parasitológico. Dos animais assintomáticos 100% apresentaram resultado positivo na PCR; dos cães oligossintomáticos 50% apresentaram resultado positivo nos exames Elisa e R.I.F.I., 21% apresentaram resultado negativo nos exames e, 29% apresentaram discordância entre esses exames; no grupo polissintomático 91% dos animais apresentaram resultado positivo nos exames sorológicos e demonstraram diversas lesões dermatológicas.

Os resultados da PCR indicaram positividade em 1 (um) animal, entretanto, este não apresentou outros exames reagentes, tampouco alterações nas proteínas plasmáticas. Os resultados do estudo realizado por Escobar, et al.⁵⁶ apresentaram eficiência no diagnóstico molecular por PCR, na detecção da presença de DNA do parasita em sangue periférico, com o uso de marcadores moleculares das espécies de *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*, no qual concluíram que o uso da PCR pode

ser uma ferramenta auxiliar no aumento da especificidade dos diagnósticos sorológicos de Leishmaniose. Já em um estudo publicado por Schönian, et al.⁴³ verificaram a sensibilidade de duas técnicas diferentes de PCR; neste estudo, foram utilizados amostras sangue humano e canino semeados com promastigotas de *Leishmania*. Apesar de um dos genes estudados ter sido mais sensível do que o outro, não foi possível a identificação das espécies de *Leishmania*. Contudo quando um dos genes foi testado de forma aninhada, houve aumento da sensibilidade e com a adição de uma enzima de restrição foi possível selecionar espécies de importância médica.

Na avaliação de todos os exames realizados nessa dissertação, não houve correlação de animais com mais de um resultado positivo, entretanto os dois animais com resultados positivos, sendo um sorológico - R.I.F.I. e um molecular - PCR; foram provenientes da mesma região (Grajaú – Travessa Acácia), isso indica que possa se tornar necessária uma investigação mais elaborada neste local. Abordando, além da ocorrência de outros animais com algum resultado positivo, também a ocorrência de flebotomíneos do gênero *Lu. longipalpis* nas áreas de maior incidência de matas e/ou de falta de saneamento básico e de população de baixa renda.

8. Conclusão

Nos resultados obtidos neste estudo foram encontrados dois animais positivos (R.I.F.I. e PCR) para *Leishmania* spp., mas não se pôde concluir que estes estão acometidos por Leishmaniose Visceral Canina ou Tegumentar.

Conclui-se também que, os animais que obtiveram alterações nos exames físicos e proteicos, devem ser monitorados clinicamente e laboratorialmente, pois não se pôde concluir que essas alterações sejam provenientes da Leishmaniose Visceral Canina ou Tegumentar. O monitoramento periódico destes animais proporcionaria um diagnóstico preciso de doença(s) que pode(m) ser a causa das alterações encontradas.

9. Referências

1. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
2. Leishmaniasis Fact Sheet [Internet]. World Health Organization, Inc. 2017 – [acesso em 01 jul 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
3. World Health Organization (United States of America), Committee on the Control of Leishmaniasis. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting. Geneva: WHO, 2010.
4. Informe de Leishmanioses [Internet]. Washington: 2017, Inc. 2017 – [acesso em 25 jun 2017]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.
5. Leishmaniasis [Internet]. World Health Organization, Inc. 2017 – [acesso em 03 jun 17]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
6. Brasil. Prefeitura de Goiânia. Nota Técnica n°. 013/2011/CIEVS/DE/DVS/SMS. Leishmaniose Visceral [Internet]. Secretaria Municipal de Saúde, Centro de Informações Estratégicas e Resposta em Vigilância em Saúde. 2011 [acesso em 03 jun 2017]. Disponível em: http://www.saude.goiania.go.gov.br/ev_docs/nota_tecnica_leishmaniose.pdf.
7. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
8. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. 1ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
9. Cardim MFM, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti F Neto. Introdução e expansão da Leishmaniose Visceral Americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. Rev. Sau. Pública. 2013; 47(4): 691-700.
10. Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Lima JMT, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLOS Negl Trop Dis. 2017 Feb; 11(2).
11. Ciaravolo RMC, Oliveira SS, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Viviani A Jr, et al. Classificação Epidemiológica dos Municípios Segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo, dezembro de 2014. BEPA. 2015; 12(143): 9-22.
12. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Sevá AP, Galati EAB. Ecological parameters of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis*

- complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. *Parasites & Vectors*. 2017; 10:269.
13. D'Andrea LAZ, Fonseca ES, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN, et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its special dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11:273.
 14. Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF & Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p.179-82.
 15. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo State, Brazil, with notes on their geographical distribution. *Biota Neotrop*. 2011 Jan-Dez; 11(1).
 16. Galvis-Ovallos F, Silva MD, Bispo GBS, Oliveira AG, Neto JRG, Malafronte RS et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan área of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*. 2017; 24(2).
 17. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and Geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west Indies, central and south America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Amer. Ent. Inst.* 1994; 54.
 18. Lainson R. The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev. Pan-Amaz Saúde*. 2010; 1(2):13-32.
 19. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternative vector of *Leishmania chagasi* in Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990 Sep-Oct; 84(5): 676-7.
 20. Feliciangeli MD, Rodriguez N, De Guglielmo Z, Rodriguez A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. *Parasite*. 1999; 6: 113-120.
 21. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*. 1988; 12: 315-317.
 22. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*. 2010 Jun; 236(11): 1184-1191.
 23. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite & Vectors*. 2011; 4(86): 1-16.
 24. Baneth G. Canine Leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*. 2008; 24(7).

25. Santaella J, Ocampo CB, Saravia NG, Mendez F, Góngora R, Gomez MA, et al. *Leishmania* (Viannia) Infection in Domestic Dog in Chaparral, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84(5): 674-680.
26. Sasani F, Javanbakht J, Samani R, Shirani D. Canine cutaneous leishmaniasis. *J.Parasit. Dis.* 2014 [acesso em 28 nov 2015]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815869/>.
27. Metzdorf IP, Lima Jr MSC, Matos MFC, Souza Filho AF, Tsujisaki RAS, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica.* 2016 [acesso em 15 jun 2017]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.013>.
28. Silva FS. Patologia e Patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev. Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas.* 2007; 1(1): 20-31.
29. Noli C. Canine leishmaniasis. *Waltham Focus.* 1999; 9(2): 16-24.
30. 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. *Veterinary Parasitology.* 2009; 165: 1-18.
31. Thrall MA. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In: Seção 1 – Princípios Gerais sobre Exames e Diagnósticos Laboratoriais. 1 ed. São Paulo: Roca; 2007. p.3-51.
32. Kataoka A, Santana AE, Seki MC. Alterações do proteinograma sérico em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. *ARS Veterinária.* 2006; 22(2): 98-102.
33. Ettinger Sj, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do cão e do gato. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004. 2256p.
34. Castro IP, Sousa MVC, Magalhães GM, Mundim AV, Noleto PG, Paula MBC, et al. Perfil hepático e proteico em cães com leishmaniose visceral. *Biosci. J.* 2012; 28(5): 799-804.
35. Brasil. Governo do Distrito Federal. Nota Técnica nº. 01/2011. Trata da identificação do inseto, vetor da Leishmaniose visceral/ calazar, no Plano Piloto de Brasília [Internet]. Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal. 2011 [acesso em 03 jun 2017]. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/nota_tecnica/NOTA_TECNICA_2011_Leishmaniose_visceral.pdf.
36. Dual Path Platform [Internet]. Estados Unidos da América: Chembio Diagnostic System, Inc. 2006 – [acesso em 05 jun 2017]. Disponível em: <http://chembio.com/innovation/platforms/dual-path-platform/>.
37. DPP® Leishmaniose Canina [Internet]. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2014 – [acesso em 10 jun 2017]. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>.

38. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993 Jan; 90: 775-779
39. Queiróz EM Jr. Validação do teste imunocromatográfico rápido *Dual Path Platform* para o diagnóstico da Leishmaníase visceral canina [dissertação]. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária; 2011. 53p.
40. Leishmaniose Canina [Internet]. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2014 – [acesso em 10 jun 2017]. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reativos/ensaios-sorologicos/imunoenzimatico/leishmaniose-canina>.
41. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Leal GGA, Moreira ND, Oliveira LAM, 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):e91009.
42. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina: grandes avanços tecnológicos e de baixa aplicação prática. Rev. Pan-Amz. Saúde. 2012; 3(2): 47-57.
43. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; 47: 349-358.
44. Brasil. Portaria Interministerial nº 1.426, de 14 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008 jul 14 [acesso em 15 nov 2015]. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1485867168>.
45. Brasil. Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, de 01 de setembro de 2016. Autoriza o registro do produto Milteforan de propriedade da empresa Virbac Saúde Animal [Internet]. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016 set 01 [acesso em 05 jun 2017]. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>.
46. Bush BM. Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2004.
47. Da Costa AP, Costa FB, Soares HS, Ramirez DG, Araújo AC, Ferreira JIGS, et al. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral

- Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015; 15(12): 765-773.
48. Leishmaniose EIE – Leishmaniose Visceral Canina / Ensaio Imunoenzimático (EIE). Adenauer Cruz Teixeira. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos; 2008. Bula de Kit Diagnóstico.
 49. Oliveira TMFS, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbente assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2008; 17(1): 7-11.
 50. Medeiros CMO, Melo AGC, Lima AKF, Silva ING, Oliveira LC, Silva MC. Perfil hematológico de cães com Leishmaniose Visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal*. 2008; 18(1): 43-50.
 51. Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Silveira L Neto, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2010; 173: 330-333.
 52. Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Spessoto M Jr, et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2007; 66(2): 185-193.
 53. Laurenti MD, Santana L Jr, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP[®] CVL rapid test for canine serodiagnosis in área of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2014; 205:444-450.
 54. De Lima JTR, Gennari SM, Soares HS, Minervino AHH, Malheiros AF, Marques FS, et al. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017 Jan-Feb; 50(1): 61-66.
 55. Assis J, Queiroz NMGP, Silveira RCV, Nunes CM, Oliveira TMFS, Noronha ACF Jr, et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010; 19(1): 17-25.
 56. Escobar TA, Porcela F, Noro M, Picolli J, Lübeck I, Manfredini V. Utilização de marcadores moleculares da região ITS2 na identificação de leishmaniose visceral canina. In: *Anais do 8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2016; Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Pampa; 2016.
 57. Curi NHA, Paschoal AMO, Massara RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani M, et al. Factors Associated with the Seroprevalence of Leishmaniasis in Dogs Living around Atlantic Forest Fragments. *Plos One*. 2014 Aug; 9(8): e104003.

58. Ghasemloo H, Rasti S, Delavari M, Doroodgar A. Molecular Diagnosis of Clinical Isolates of Cutaneous Leishmaniasis Using ITS1 and kDNA genes and Genetic Polymorphism of Leishmania in Kashan, Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 2016; 19(3): 136-142.
59. Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on the Dual-Path Platform technology (DPP[®] CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2012; 106: 54-59.
60. IFI Leishmaniose Visceral Canina – Imunofluorescência indireta (IFI). Adenauer Cruz Teixeira. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos; 2008. Bula de Kit Diagnóstico.
61. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. *Bepa.* 2009; 6(67): 13-23.
62. Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC Raychaudhuria S, et al. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica.* 2008; 107: 205-207.
63. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC, et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology.* 2006; 137: 11-16.
64. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and imuno response to infection. *Veterinary Parasitology.* 2008; 158: 274-287.
65. Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasite & Vectors.* 2011; 4(57).
66. Oliveira AP, Freire MP, Hiramoto RM, Tolezano JE, Castellão KG, Taniguchi HH, et al. Análise comparativa de três diferentes testes sorológicos empregados na detecção da leishmaniose visceral em cães. *Revista Saúde.* 2010; 4.
67. Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM, Nascimento LFM, Mendes-Sousa AF, Pinho FA, et al. Scoring clinical can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic área in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2017; 112(1): 53-62.

APÊNDICE A – TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do projeto: Avaliação diagnóstica de Leishmaniose canina em animais provenientes da zona Sul de São Paulo.

Nome do pesquisador principal: Leticia Maria Molla

Instituição (CIAEP) da CEUA que aprovou: CEUA-UNISA

Objetivos do estudo: Identificar possíveis cães portadores da Leishmaniose visceral ou tegumentar; avaliar a possível taxa de incidência de cães positivos sintomáticos e não sintomáticos em uma área não endêmica; comparar os resultados obtidos nos exames e verificar a compatibilidade entre eles.

Procedimentos a serem realizados com os animais: os animais terão o sangue coletado no momento após a cirurgia de castração, ainda anestesiados, e serão avaliados clinicamente quando a lesões de pele. Após o retorno anestésico, os animais serão devolvidos a seus devidos tutores.

Potenciais riscos para os animais: a coleta de sangue não acarreta risco de morte aos animais, pois é coletada uma quantidade pequena, porém o suficiente para a realização dos exames necessários ao estudo.

Cronograma: os animais serão manipulados somente no momento pós-cirúrgico. Não haverá outras datas de manipulação ou coleta de materiais nos animais participantes.

Benefícios: Os animais participantes poderão contribuir para a saúde pública da população da região, pois farão parte de um modelo de diagnóstico que poderá auxiliar na identificação de doenças graves e negligenciadas pelos órgãos públicos do país.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto: Sua autorização para a inclusão do seu animal nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá ser retirado do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele. A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. A Médica Veterinária responsável pelo seu animal(is) será a Dra. **Leticia Maria Molla**, inscrita no CRMV sob o nº **16.936**. Além dela, a equipe do Pesquisador Principal, Prof. Dr. Jonas Moraes Filhos, também se responsabilizará pelo bem estar do animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: Dr.(a) Leticia Maria Molla

Equipe: UNISA Programa de Pós-Graduação

Endereço: Av. Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 – Santo Amaro.

Telefone: (11) 9.4197-9771

Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(s) pelo qual sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu animal do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do meu(s) animal(is), identificado(s) a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

_____, ____/____/____

Pesquisador: _____ Responsável: _____
 Nome: _____ Nome: _____
 Documento de identidade: _____ Documento de Identidade: _____
 Telefone: _____

Identificação do animal

Nome: _____
 Microchip: _____
 Espécie: canina _____
 Raça: _____
 Idade: _____
 Macho () Fêmea ()

Identificação do animal

Nome: _____
 Microchip: _____
 Espécie: canina _____
 Raça: _____
 Idade: _____
 Macho () Fêmea ()

Identificação do animal

Nome: _____
 Microchip: _____
 Espécie: canina _____
 Raça: _____
 Idade: _____
 Macho () Fêmea ()

Identificação do animal

Nome: _____
 Microchip: _____
 Espécie: canina _____
 Raça: _____
 Idade: _____
 Macho () Fêmea ()

APÊNCIDE B – Ficha de avaliação clínica

MAPA DERMATOLÓGICO DE AVALIAÇÃO DE LESÕES EM CÃES

PROJETO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE

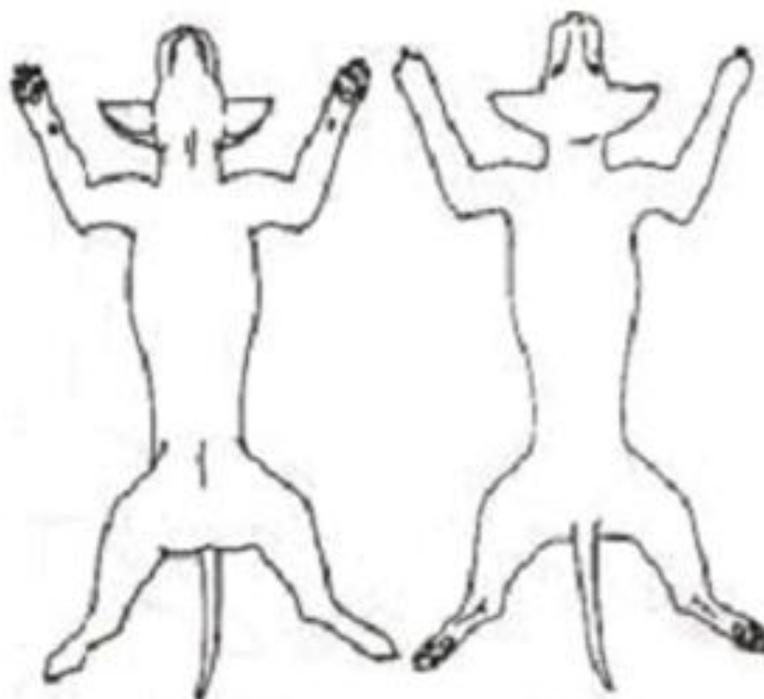
NOME DO ANIMAL: _____ IDADE: _____ RAÇA: _____

SEXO - () M / () F NOME DO PROPRIETÁRIO: _____

TEL. _____

Data do atendimento: ____/____/____

Local de lesões ou prurido



Avaliação de lesões nos animais:

Alopecia	Onicogribose	Dermatite exfoliativa	Dermatite ulcerativa	Dermatite nodular	Dermatite papular	Dermatite pustular

Blefarite	Ceratoconjuntivite	Uveíte	Atrofia muscular	Linfadenomegalia	Lesões mucosas	Palidez mucosas

*N = Não / S = Sim / L = Localizada / G = Generalizada

Avaliação do escore corporal:



APÊNDICE C – Tabelas de resultados dos exames DPP® e Elisa

Tabela 4 - Exame DPP e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Ilha do Bororé na data de 09/04/2016.

Ilha do Bororé				
09/04/16				
Amostra	DPP® (cut-off 5,000000)			Elisa
	Visual	Reader	Concentração	Resultado
1	NR	NR	0,739690	NR
2	NR	NR	0,207460	NR
3	NR	NR	0,882048	NR
4	NR	NR	1,229439	NR
5	NR	NR	1,919551	NR
6	NR	NR	0,493815	NR
7	NR	NR	0,140048	NR
9	NR	NR	0,227736	NR
10	NR	NR	0,869775	NR
13	NR	NR	3,015076	NR
14	NR	NR	0,102175	NR
15	NR	NR	0,870965	NR
16	NR	NR	2,647798	NR
17	NR	NR	1,402372	NR
18	NR	NR	0,321360	NR
19	NR	NR	0,471382	NR
21	NR	NR	0,642754	NR
22	NR	NR	0,599823	NR
23	NR	NR	0,379060	NR
24	NR	NR	0,057840	NR
25	NR	NR	0,190820	NR
27	NR	NR	0,790927	NR
30	NR	NR	0,768617	NR
31	NR	NR	0,792471	NR
32	NR	NR	1,627583	NR
33	NR	NR	0,208419	NR
34	NR	NR	2,109430	NR
35	NR	NR	0,502908	NR
36	NR	NR	0,005112	NR
37	NR	NR	0,683833	NR
38	NR	NR	0,744601	NR
39	NR	NR	1,286200	NR
41	NR	NR	1,753609	NR
42	NR	NR	0,228064	NR
43	NR	NR	0,501827	NR
51	NR	NR	0,871806	NR

52	NR	NR	0,733962	NR
57	NR	NR	1,155256	NR
58	NR	NR	2,020854	NR
59	NR	NR	2,072182	NR
60	NR	NR	1,152559	NR
64	NR	NR	0,955807	NR
65	NR	NR	0,388553	NR
68	NR	NR	0,898736	NR
69	NR	NR	1,293408	NR
70	NR	NR	0,282482	NR
72	NR	NR	1,221056	NR
73	NR	NR	0,288561	NR
74	NR	NR	0,560502	NR
75	NR	NR	0,832927	NR
114	NR	NR	0,996429	NR
122	NR	NR	0,052243	NR
125	NR	NR	0,734803	NR

NR = Não Reagente

Tabela 5 - Exame DPP e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Rua Gaivotas do Céu (Grajaú) na data de 18/06/2016.

R. Gaivotas do Céu - Grajaú				
18/06/16				
Amostra	DPP® (cut-off 5,000000)			Elisa
	Visual	Reader	Concentração	Resultado
2	NR	NR	0,476002	NR
3	NR	NR	0,614081	NR
4	NR	NR	0,387994	NR
12	NR	NR	0,584334	NR
18	NR	NR	0,349411	NR
22	NR	NR	0,022523	NR
26	NR	NR	0,103496	NR
27	NR	NR	0,049252	NR
28	NR	NR	0,203444	NR
36	NR	NR	0,962785	NR
42	NR	NR	0,699456	NR
43	NR	NR	0,014524	NR
46	NR	NR	1,521582	NR
47	NR	NR	0,874375	NR
48	NR	NR	0,854435	NR
49	NR	NR	0,241655	NR
50	NR	NR	3,710754	NR
51	NR	NR	0,627839	NR
56	NR	NR	1,280124	NR
58	NR	NR	0,669339	NR
76	NR	NR	0,668795	NR
77	NR	NR	0,373172	NR
78	NR	NR	0,012109	NR
79	NR	NR	0,214523	NR
80	NR	NR	0,925250	NR
81	NR	NR	0,563994	NR
83	NR	NR	1,115938	NR
84	NR	NR	0,687286	NR
89	NR	NR	0,337682	NR
93	NR	NR	0,094322	NR
94	NR	NR	1,803771	NR
95	NR	NR	0,268285	NR
97	NR	NR	0,293357	NR
105	NR	NR	0,376572	NR
106	NR	NR	0,753374	NR
107	NR	NR	0,910162	NR
108	NR	NR	0,484153	NR
110	NR	NR	0,924850	NR

111	NR	NR	0,310706	NR
114	NR	NR	0,965914	NR
115	NR	NR	0,357969	NR
116	NR	NR	0,224352	NR
118	NR	NR	0,716077	NR
119	NR	NR	0,221173	NR
122	NR	NR	1,880618	NR
123	NR	NR	0,375452	NR
127	NR	NR	1,005416	NR
128	NR	NR	0,053534	NR
129	NR	NR	0,570490	NR
130	NR	NR	0,433946	NR
131	NR	NR	1,295316	NR
132	NR	NR	0,027034	NR
139	NR	NR	0,461518	NR
Bel	NR	NR	1,764989	NR

NR = Não Reagente

Tabela 6 - Exame DPP e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Travessa Acácia-Mimosa (Grajá) na data de 13/08/2016.

Travessa Acácia-Mimosa - Grajá				
13/08/16				
Amostra	DPP® (cut-off 5,000000)			Elisa
	Visual	Reader	Concentração	Resultado
3	NR	NR	2,105784	NR
5	NR	NR	0,987533	NR
6	NR	NR	0,029287	NR
16	NR	NR	0,494864	NR
21	NR	NR	0,923537	NR
22	NR	NR	0,724284	NR
23	NR	NR	0,571880	NR
24	NR	NR	0,330066	NR
26	NR	NR	0,280591	NR
27	NR	NR	0,737014	NR
30	NR	NR	1,030487	NR
31	NR	NR	3,828748	NR
34	NR	NR	2,443824	NR
35	NR	NR	0,265541	NR
37	NR	NR	1,004817	NR
41	NR	NR	0,103892	NR
46	NR	NR	0,146546	NR
47	NR	NR	0,734217	NR
48	NR	NR	0,318301	NR
50	NR	NR	0,093496	NR
53	NR	NR	0,484091	NR
58	NR	NR	0,686163	NR
59	NR	NR	0,097900	NR
60	NR	NR	0,372617	NR
61	NR	NR	0,612225	NR
62	NR	NR	0,946415	NR
64	NR	NR	0,769690	NR
68	NR	NR	0,343124	NR
70	NR	NR	0,044781	NR
71	NR	NR	0,702715	NR
73	NR	NR	0,356137	NR
75	NR	NR	0,220691	NR
82	NR	NR	0,516984	NR
85	NR	NR	0,827934	NR
92	NR	NR	0,198462	NR
95	NR	NR	0,033254	NR
96	NR	NR	0,098687	NR
98	NR	NR	0,552112	NR

100	NR	NR	0,475401	NR
112	NR	NR	0,129731	NR
113	NR	NR	0,916654	NR
117	NR	NR	0,464550	NR
143	NR	NR	0,392267	NR
144	NR	NR	0,31554	NR
145	NR	NR	0,197653	NR
146	NR	NR	1,050267	NR

APÊNDICE D – Tabela de resultados do exame R.I.F.I.

Tabela 7 - Exame R.I.F.I. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.

Ilha do Bororé 09/04/16		R. Gaivotas do Céu 18/06/16		Travessa Acácia-Mimosa 13/08/16	
Am	Resultado	Am	Resultado	Am	Resultado
1	Negativo	2	Negativo	3	Negativo
2	Negativo	3	Negativo	5	Negativo
3	Negativo	4	Negativo	6	Negativo
4	Negativo	12	Negativo	16	Negativo
5	Negativo	18	Negativo	21	Negativo
6	Negativo	22	Negativo	22	Negativo
7	Negativo	26	Negativo	23	Negativo
9	Negativo	27	Negativo	24	Negativo
10	Negativo	28	Negativo	26	Negativo
13	Negativo	36	Negativo	27	Negativo
14	Negativo	42	Negativo	30	Negativo
15	Negativo	43	Negativo	31	Negativo
16	Negativo	46	Negativo	34	Negativo
17	Negativo	47	Negativo	35	Negativo
18	Negativo	48	Negativo	37	Negativo
19	Negativo	49	Negativo	41	Negativo
21	Negativo	50	Negativo	46	Negativo
22	Negativo	51	Negativo	47	Negativo
23	Negativo	56	Negativo	48	Negativo
24	Negativo	58	Negativo	50	Negativo
25	Negativo	76	Negativo	53	Negativo
27	Negativo	77	Negativo	58	Negativo
30	Negativo	78	Negativo	59	Negativo
31	Negativo	79	Negativo	60	Negativo
32	Negativo	80	Negativo	61	Negativo
33	Negativo	81	Negativo	62	Negativo
34	Negativo	83	Negativo	64	Negativo
35	Negativo	84	Negativo	68	Negativo
36	Negativo	89	Negativo	70	Negativo
37	Negativo	93	Negativo	71	Positivo
38	Negativo	94	Negativo	73	Negativo
39	Negativo	95	Negativo	75	Negativo
41	Negativo	97	Negativo	82	Negativo
42	Negativo	105	Negativo	85	Negativo
43	Negativo	106	Negativo	92	Negativo
51	Negativo	107	Negativo	95	Negativo
52	Negativo	108	Negativo	96	Negativo

57	Negativo	110	Negativo	98	Negativo
58	Negativo	111	Negativo	100	Negativo
59	Negativo	114	Negativo	112	Negativo
60	Negativo	115	Negativo	113	Negativo
64	Negativo	116	Negativo	117	Negativo
65	Negativo	118	Negativo	143	Negativo
68	Negativo	119	Negativo	144	Negativo
69	Negativo	122	Negativo	145	Negativo
70	Negativo	123	Negativo	146	Negativo
72	Negativo	127	Negativo		
73	Negativo	128	Negativo		
74	Negativo	129	Negativo		
75	Negativo	130	Negativo		
114	Negativo	131	Negativo		
122	Negativo	132	Negativo		
125	Negativo	139	Negativo		
		Bel	Negativo		

Am = Amostra

APÊNDICE E – Tabela de resultados de Proteínas Plasmáticas

Tabela 8 - Exame de Proteínas Plasmáticas. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.

Ilha do Bororé (09/04/16)				R. Gaivotas do Céu (18/06/16)				Travessa Acácia-Mimosa (13/08/16)			
Am	A	G	A:G	Am	A	G	A:G	Am	A	G	A:G
1	1,87	2,93	0,63	2	3,26	3,14	1,03	3	3,13	2,47	1,26
2	3,44	2,96	1,16	3	4,03	0,77	5,23	5	3,78	2,22	1,70
3	3,50	2,50	1,40	4	3,32	4,08	0,81	6	4,29	1,91	2,24
4	2,94	3,86	0,76	12	3,19	1,41	2,26	16	2,70	4,10	0,65
5	3,18	2,42	1,31	18	3,18	3,42	0,93	21	3,80	2,40	1,58
6	3,28	2,32	1,41	22	3,10	1,90	1,63	22	5,18	1,62	3,19
7	2,30	3,10	0,74	26	3,41	1,19	2,86	23	3,44	3,16	1,08
9	2,49	4,11	0,60	27	2,78	1,82	1,52	24	4,25	1,35	3,14
10	2,32	3,48	0,66	28	3,44	2,36	1,45	26	2,78	3,02	0,92
13	3,58	2,22	1,61	36	3,52	2,48	1,41	27	4,17	2,03	2,05
14	1,90	3,70	0,51	42	2,87	4,13	0,69	30	3,47	1,73	2,00
15	2,21	1,59	1,39	43	3,66	3,14	1,16	31	3,44	2,36	1,45
16	3,67	1,13	3,24	46	4,29	1,71	2,50	34	3,94	0,26	15,15
17	2,88	1,92	1,50	47	3,77	0,23	16,39	35	3,48	2,12	1,64
18	3,29	2,31	1,42	48	3,60	1,20	3,00	37	3,28	1,72	1,90
19	2,97	2,23	1,33	49	4,61	1,39	3,31	41	3,87	1,73	2,23
21	2,42	4,18	0,57	50	3,68	1,32	2,78	46	2,97	2,83	1,04
22	4,12	2,68	1,53	51	2,98	3,02	0,98	47	3,98	1,82	2,18
23	2,53	2,47	1,02	56	2,78	1,02	2,72	48	5,81	0,59	9,84
24	3,35	2,45	1,36	58	4,08	1,92	2,12	50	3,39	2,41	1,40
25	1,47	4,93	0,29	76	4,54	0,26	17,46	53	4,62	2,98	1,55
27	2,55	2,65	0,96	77	3,29	2,51	1,31	58	3,69	2,31	1,59
30	3,50	2,30	1,52	78	4,51	0,85	5,30	59	3,58	2,22	1,61
31	2,95	4,45	0,66	79	3,95	2,05	1,92	60	4,52	0,08	56,50
32	2,27	2,53	0,89	80	3,37	2,63	1,28	61	4,31	1,69	2,55
33	3,94	1,66	2,37	81	2,43	3,37	0,72	62	3,93	2,57	1,52
34	2,96	2,24	1,31	83	3,36	2,64	1,27	64	2,99	2,61	1,14
35	3,22	3,98	0,80	84	4,32	1,28	3,37	68	4,00	0,60	6,66
36	2,68	4,12	0,65	89	3,87	1,93	2,00	70	2,55	2,25	1,13
37	2,47	2,33	1,06	93	1,91	5,49	0,34	71	3,03	3,17	0,95
38	3,11	2,09	1,48	94	2,24	1,96	1,14	73	4,07	0,93	4,37
39	3,89	1,91	2,03	95	3,03	2,77	1,09	75	3,76	1,84	2,04
41	1,95	2,85	0,68	97	2,13	1,67	1,27	82	2,60	1,40	1,85
42	3,28	2,12	1,54	105	4,20	4,40	0,95	85	3,77	2,03	1,85
43	2,72	2,28	1,19	106	3,73	2,47	1,51	92	4,39	0,21	20,90
51	2,66	4,74	0,56	107	2,86	3,54	0,80	95	2,97	2,63	1,12
52	2,16	4,64	0,46	108	5,08	2,28	2,22	96	4,41	0,39	11,30

57	2,82	3,98	0,70	110	2,80	4,80	0,58	98	2,16	3,24	0,66
58	2,86	3,94	0,72	111	3,67	0,33	11,12	100	4,37	0,43	10,16
59	3,63	0,57	6,36	114	2,65	4,15	0,63	112	2,59	3,01	0,86
60	2,71	3,89	0,69	115	3,43	2,97	1,15	113	3,46	2,14	1,61
64	3,11	2,89	1,07	116	4,38	4,42	0,99	117	2,83	2,97	0,95
65	3,46	2,54	1,36	118	3,84	1,16	3,31	143	4,19	1,21	3,46
68	2,98	2,02	1,47	119	3,79	2,41	1,57	144	5,02	0,18	27,88
69	3,37	2,63	1,28	122	3,18	4,22	0,75	145	4,20	2,40	1,75
70	3,10	1,90	1,63	123	2,72	1,88	1,44	146	4,65	1,15	4,04
72	3,34	2,66	1,25	127	3,64	3,16	1,15				
73	2,94	2,66	1,10	128	3,48	2,72	1,27				
74	3,45	2,95	1,16	129	3,56	2,64	1,34				
75	3,08	1,72	1,79	130	4,68	1,12	4,17				
114	2,09	6,71	0,31	131	3,20	2,00	1,60				
122	3,10	1,70	1,82	132	3,51	3,29	1,06				
125	3,39	3,41	0,99	139	2,93	2,87	1,02				
				Bel	4,21	1,79	2,35				

Am = Amostra / A = Albumina / G = Globulina / A:G = Relação Albumina-Globulina

APÊNDICE F – Tabela de resultados de PCR

Tabela 9 - Exame PCR ITS. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.

Ilha do Bororé 09/04/16		R. Gaivotas do Céu 18/06/16		Travessa Acácia-Mimosa 13/08/16	
Am	PCR ITS	Am	PCR ITS	Am	PCR ITS
1	Negativo	2	Negativo	3	Negativo
2	Negativo	3	Negativo	5	Negativo
3	Negativo	4	Negativo	6	Negativo
4	Negativo	12	Negativo	16	Negativo
5	Negativo	18	Negativo	21	Negativo
6	Negativo	22	Negativo	22	Negativo
7	Negativo	26	Negativo	23	Negativo
9	Negativo	27	Negativo	24	Negativo
10	Negativo	28	Negativo	26	Negativo
13	Negativo	36	Negativo	27	Negativo
14	Negativo	42	Negativo	30	Negativo
15	Negativo	43	Negativo	31	Negativo
16	Negativo	46	Negativo	34	Negativo
17	Negativo	47	Negativo	35	Negativo
18	Negativo	48	Negativo	37	Negativo
19	Negativo	49	Negativo	41	Negativo
21	Negativo	50	Negativo	46	Negativo
22	Negativo	51	Negativo	47	Negativo
23	Negativo	56	Negativo	48	Negativo
24	Negativo	58	Negativo	50	Negativo
25	Negativo	76	Negativo	53	Negativo
27	Negativo	77	Negativo	58	Negativo
30	Negativo	78	Negativo	59	Negativo
31	Negativo	79	Negativo	60	Negativo
32	Negativo	80	Negativo	61	Negativo
33	Negativo	81	Negativo	62	Negativo
34	Negativo	83	Negativo	64	Negativo
35	Negativo	84	Negativo	68	Negativo
36	Negativo	89	Negativo	70	Negativo
37	Negativo	93	Negativo	71	Negativo
38	Negativo	94	Negativo	73	Negativo
39	Negativo	95	Negativo	75	Negativo
41	Negativo	97	Negativo	82	Negativo
42	Negativo	105	Negativo	85	Negativo
43	Negativo	106	Negativo	92	Positivo
51	Negativo	107	Negativo	95	Negativo
52	Negativo	108	Negativo	96	Negativo

57	Negativo	110	Negativo	98	Negativo
58	Negativo	111	Negativo	100	Negativo
59	Negativo	114	Negativo	112	Negativo
60	Negativo	115	Negativo	113	Negativo
64	Negativo	116	Negativo	117	Negativo
65	Negativo	118	Negativo	143	Negativo
68	Negativo	119	Negativo	144	Negativo
69	Negativo	122	Negativo	145	Negativo
70	Negativo	123	Negativo	146	Negativo
72	Negativo	127	Negativo		
73	Negativo	128	Negativo		
74	Negativo	129	Negativo		
75	Negativo	130	Negativo		
114	Negativo	131	Negativo		
122	Negativo	132	Negativo		
125	Negativo	139	Negativo		
		Bel	Negativo		

Am = Am⁹ostra