

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração
Saúde Brasileira

José Geraldo de Castro Júnior

ESTUDO CLÍNICO E SOROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA EM JUIZ DE FORA, MG

JUIZ DE FORA
2013

JOSÉ GERALDO DE CASTRO JÚNIOR

**ESTUDO CLÍNICO E SOROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA EM JUIZ DE FORA, MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Área de Concentração: Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra

JUIZ DE FORA

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Castro Júnior, José Geraldo.

Estudo Clínico e Soroepidemiológico da Leishmaniose Visceral Canina em Juiz de Fora-MG / José Geraldo de Castro Júnior. -- 2013.

155 p. : il.

Orientador: Elaine Soares Coimbra

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2013.

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Diagnóstico Sorológico. 3. Imunocromatográfico DPP. 4. ELISA. 5. Brasil. I. Soares Coimbra, Elaine , orient. II. Título.

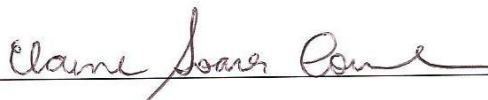
JOSÉ GERALDO DE CASTRO JÚNIOR

**ESTUDO CLÍNICO E SOROEPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA EM JUIZ DE FORA, MG**

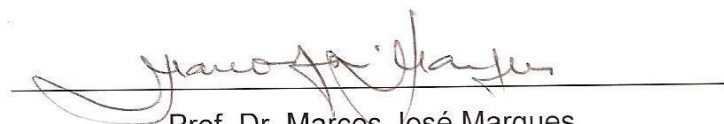
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Saúde.

Aprovado em 04 de dezembro de 2013.

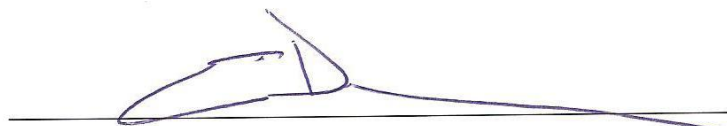
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dra. Elaine Soares Coimbra - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Marcos José Marques
Universidade Federal de Alfenas



Prof. Dr. Erik Daemon de Souza Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida, saúde, força, coragem, oportunidades e direcionamento em todos os momentos. É a fé que nos renova;

Aos meus pais, José Geraldo e Marisa, pela criação, dedicação, oportunidades, ensinamentos, conselhos, amor e exemplos de caráter e dignidade. Devo tudo aos senhores;

Aos meus irmãos Mônica, Lucas e toda a família, pela amizade, lealdade, incentivo, apoio e força em todos os momentos da vida; irmãos de sangue e coração;

À Cris, meu amor, pelo carinho, compreensão, incentivo e grande ajuda dada no trabalho. Saiba o quanto é importante para mim;

À Dra. Elaine Soares Coimbra, minha orientadora, pela confiança, oportunidade, ensinamentos e paciência; ficam a minha admiração e gratidão;

Ao Dr. Renato Porrozi do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses da FIOCRUZ, pela cessão dos Kits para diagnóstico DPP e ELISA da Bio-Manguinhos, em parceria com o Sr. Edmilson Domingos da Silva, do mesmo laboratório, além das boas sugestões dadas ao projeto e pela disponibilidade em vir a Juiz de Fora;

Ao Dr. Marcos José Marques, professor e pesquisador da Universidade Federal de Alfenas pelas boas sugestões dadas ao trabalho, participando da minha Banca da Qualificação e pela disponibilidade em vir a Juiz de Fora;

Ao grupo do Dr. Alexandre Reis, professor e pesquisador da Universidade Federal de Ouro Preto pelo fornecimento de antígenos para a realização do ELISA UFOP;

Ao Dr. Márcio Roberto Silva, pesquisador da EMBRAPA pela boa vontade em colaborar, especialmente na realização dos cálculos estatísticos;

À Dra. Kézia Scopel, professora da Universidade Federal de Juiz de Fora pela colaboração no trabalho, especialmente na padronização do ELISA UFOP e pelas orientações dadas na Banca de Qualificação;

Às bolsistas do Laboratório de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da UFJF, Mariana, Samara e Samantha, pelos ensinamentos, apoio e desenvolvimento nas técnicas sorológicas;

Ao Sr. Secretário Municipal de Saúde, Dr. José Laerte, Dra. Glênia Campos, Sub-Secretária de Vigilância em Saúde e Dra. Mônica Santana, Chefe do Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental pela compreensão da necessidade de ausentar-me do trabalho para a conclusão do projeto;

À Bióloga Cláudia Tassara do Laboratório da Superintendência Regional de Saúde pela boa vontade em sempre colaborar;

Aos companheiros do setor de zoonoses, André Gonçalves, André Silva, Alan, Antônio Márcio, Anderson, Amanda, Bethânea, Carol, Cláudio, Daniela, Evander, Elisângela, Elisa, Graça, Giana, Gabriela, João Carlos, Jorge Luiz, Lucélia, Manuela, Murilo, Marcelo, Márcia, Paula, Roberto Domingos, Roberto das Neves, Raíssa, Sebastião, Vanderli e Wagner, pela colaboração nos trabalhos de campo e atividades da repartição; aqueles que ainda estão conosco e os que seguiram outros rumos na vida. Todos vocês foram importantes nesta empreitada;

Ao corpo técnico do canil municipal, Dra. Lisa, Expedito, Elias, Silmar e demais funcionários, pelo apoio;

Aos Companheiros de projeto da Superintendência Regional de Saúde, Dra. Isabela, Dra. Glênia, Milton e colaboradores, que atuaram na pesquisa de flebotomíneos;

Aos responsáveis pelas ONGs que permitiram a realização dos trabalhos com seus animais;

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto;

A todos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma zoonose, de transmissão vetorial, causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*. Esta doença, anteriormente descrita como rural vem passando por um processo de urbanização. Em 2008, foram diagnosticados no município de Juiz de Fora, os primeiros casos considerados autóctones de leishmaniose visceral canina (LVC) e estudos sobre epidemias urbanas da LV têm indicado que a LVC vem precedendo a infecção humana, visto que os cães são os principais reservatórios domésticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a infecção de LVC no município de Juiz de Fora, bem como avaliar os fatores de risco associados à doença. O trabalho foi realizado com animais do canil municipal e ONGs e a partir do soro destes foram realizadas três técnicas sorológicas: o imunocromatográfico “TR DPP[®]” e ELISA (“EIE-Leishmaniose visceral canina[®]”), ambos fornecidos pela FIOCRUZ/Bio-Manguinhos e ELISA *in house*. A amostra totalizou 781 animais e a prevalência da LVC variou de acordo com a técnica empregada: o teste DPP apresentou soropositividade de 4,87% (IC 95% de 3,5-6,7%); o ELISA Bio-Manguinhos de 2,18% (IC 95% de 1,3-3,5%) e ELISA *in house* de 13,73% (IC 10,8-17,3%). Em relação à variabilidade observada entre as técnicas, vale a pena destacar que as mesmas apresentam antígenos diferentes e isto pode refletir nos resultados. A amostra foi composta, em sua maioria por fêmeas adultas, sem raça definida, porte médio e pelo curto. Na análise univariada, utilizando-se o ELISA Bio-Manguinhos como confirmatório para a LVC, foi observada associação estatística ($p < 0,05$; IC 95%) com sintomatologia clínica segundo Quinnell *et al.* 2003, origem dos animais (canil municipal) e grupo racial; além disto, houve sugestão de associação com sexo masculino e porte médio/grande dos animais. Na análise multivariada, o fato de ser procedente do canil e sintomatologia clínica mantiveram associadas ao desfecho, sendo também sugestiva o sexo masculino. Este foi o primeiro inquérito da LVC no município de Juiz de Fora e a presença da doença relatada neste trabalho, reforça a idéia de que a leishmaniose está em

processo de expansão e urbanização no Brasil, apontando a necessidade de vigilância epidemiológica ativa.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose visceral canina. Diagnóstico sorológico. Imunocromatográfico DPP. ELISA. Brasil.

ABSTRACT

In Brazil, the visceral leishmaniasis (LV), also known as calazar, is a zoonotic disease, with vector transmission caused by the *Leishmania chagasi* protozoan. This disease, before described as rural is going through a process of urbanization. In 2008, were diagnosed in Juiz de Fora municipality, the first cases considered autochthones of canine visceral leishmaniasis (CVL) and research about urban epidemic of LV has showed that the CVL is preceding the human infection, since that the dogs are the main domestic reservoirs. Then, the present study aimed to investigate the CVL infection in Juiz de Fora, as well as to value the risk factors associated to the disease. This work was done with the animals of the public kennel and ONGs and with the serum were realized three serological techniques: the immunochromatographic "TR DPP® and ELISA (EIE-leishmaniose visceral canine®), both given by FIOCRUZ/BIO-MANGUINHOS and ELISA in house. The samples totalized 781 animals and the prevalence of CVL varied according with the technique used: the test DPP showed soropositivity of 4.87% (IC 95% of 3.5-6.7%); the ELISA Bio-Manguinhos of 2.18% (IC 95% of 1.3-3.5%) and ELISA in house of 13.73% (IC 10.8-17.3%). In relation to variability observed among the techniques, as worth pointing out that same showed different antigens and this can reflect in the results. The samples were compound in majority by adult females, without definite race, medium-sized and short hair. In the univarious analysis using the ELISA Bio-Manguinhos as confirmatory for the CVL, was observed statistic association ($p < 0.05$; IC 95%) with clinic sintomatology according by Quinnell et al. (2003), origin of animals (public kennel) and racial group; and also, there was suggestion of the association with masculine sex and medium/big port animals. In the multivarious analysis, the fact of being precedent from the kennel and clinic sintomatology kept associated to the result, being suggestive the masculine sex. This was the first enquiry of CVL in Juiz de Fora municipality and presence of the disease showed in this research, reinforce the idea that the leishmaniasis is in the process of expansion and urbanization in Brazil, pointing out necessity of an active epidemiologic vigilance.

KEY-WORDS: Canine visceral leishmaniasis. Serological diagnosis. Immunocromatographic DPP. ELISA. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Formas amastigotas de <i>L. chagasi</i> e formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	13
Figura 2 Flebotomíneos realizando repasto sanguíneo em humanos.....	15
Figura 3 Ciclo de vida da <i>Leishmania chagasi</i> - agente etiológico da leishmaniose visceral – ciclo doméstico e silvestre.....	17
Figura 4 Gambá e Raposa, reservatórios silvestres da LV.....	19
Figura 5 Localização espacial do município de Juiz de Fora na região Sudeste... ..	43
Figura 6 Localização espacial do canil municipal e das ONGs em Juiz de Fora.....	44
Figura 7 Fotos ilustrativas do Canil Municipal.....	45
Figura 8 Foto ilustrativa da ONG Paula Lima.....	46
Figura 9 Fotos ilustrativas da ONG Br 040.....	46
Figura 10 Venopunção braquial.....	48
Figura 11 Fotos ilustrativas dos dispositivos utilizados na microchipagem e dos procedimentos adotados.....	50
Figura 12 Foto ilustrativa da coleira artesanal.....	50
Figura 13 Fotos ilustrativas dos exames clínico e semiológico dos animais.....	51

Figura 14 Fotos ilustrativas dos suportes utilizados no teste DPP, destacando resultado negativo e positivos de diferentes intensidades, além do leitor ótico.....	57
Figura 15 Fotos ilustrativas do teste ELISA, mostrando a placa padrão e leitor de placas.....	59
Figura 16 Fotos ilustrativas de sinais clínicos de animais da amostra.....	70
Figura 17 Fotos ilustrativas de sinais clínicos de animais da amostra.....	71

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Exemplos de prevalências da LVC em localidades brasileiras.....	11
Tabela 1 – Procedência da população amostral.....	64
Tabela 2 – Classificação da população amostral quanto às características físicas exteriores	66
Tabela 3 – Sinais clínicos e semiológicos da população amostral	68
Tabela 4 – Classificação clínica dos animais segundo Quinnell <i>et al.</i> , (2003) e Mancianti <i>et al.</i> , (1988).....	72
Tabela 5 – Diagnóstico sorológico pelas técnicas imunocromatográfica DPP, ELISA Bio-Manguinhos e ELISA UFOP.....	74
Tabela 6 – Análise univariada da positividade por ELISA Bio-Manguinhos em relação à procedência dos animais, classificações clínicas por Quinnell <i>et al.</i> , (2003) e Mancianti <i>et al.</i> , (1988) e características físicas exteriores (zootécnicas) ..	78
Tabela 7 – Análise multivariada do diagnóstico por ELISA Bio-Manguinhos com variáveis explicativas.....	81
Tabela 8 – Comparações pareadas entre o diagnóstico pelo ELISA Bio-Manguinhos (“padrão ouro”) e pelo DPP.....	82
Tabela 9 – Comparações pareadas entre o diagnóstico pelo ELISA Bio-Manguinhos (“padrão-ouro”) e o ELISA UFOP.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCLIVEPA	Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais
OMS	Organização Mundial de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FC	Fixação de Complemento
LV	Leishmaniose Visceral
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LEISHTEC®	Vacina contra leishmaniose visceral canina - Laboratório Hertape Callier
LEISHMUNE®	Vacina contra leishmaniose visceral canina - Laboratório Merial
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ELISA	<i>Enzyme linked immunorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
EDTA	<i>Ethylediaminetetraacetic Acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético)
KDNA	Dna do cinetoplasto da <i>Leishmania</i>

K 39	Kinesina de 39 aminoácidos
PBS	<i>Phosphate ruffer saline</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucléico
M	Molar
MS	Ministério da Saúde
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
TR DPP	Teste Imunocromatográfico Rápido de Duplo Percurso
PCLV	Programa de controle da leishmaniose visceral
SRD	Sem raça definida
DO	Densidade Ótica
OR	<i>Odds Ratio</i> (razão de chance)
OPD	<i>Ortho Phenylene Diamine</i> (ortophenilenodiamino)
ONG	Organização-Não-Governamental
DDT	Dicloro-diferil-tricloroetano
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
Q 21	Adjuvante saponina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
FUNDEPE	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
WHO	<i>Organization Health World</i> (Organização Mundial de Saúde)

FML	<i>Fucose-manose-ligand</i> (ligante de fucose manose)
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
TMB	Cromógeno tetrametilbenzidina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
IM	Intramuscular
IC	Intervalo de Confiança
GPS	<i>Global Positioning System</i> (sistema de posicionamento global)
gp 72	Glicoproteína de 72 kilodaltons
gp 70	Glicoproteína de 70 kilodaltons
CUT OFF	Ponto de Corte
A/G	Relação albumina/globulina
SINAN-NET	Sistema de Informação de Agravos de Notificação-Ministério da Saúde
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
NUPEP	Núcleo Pesquisa em Parasitologia

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
<	Menor que
° C	Grau Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
min	Minutos
ml	Mililitros
rpm	Rotação por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
s	Segundos
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetro Quadrado
%	Porcentagem
®	<i>Registered Trademark</i> /Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Histórico e epidemiologia	10
2.2 Agente etiológico e taxonomia.....	12
2.3 Vetor.....	14
2.4 Ciclo biológico e mecanismos de transmissão	16
2.5 Reservatórios da leishmaniose visceral	19
2.6 Sinais clínicos da LVC e achados de patologia clinica	21
2.7 Diagnóstico.....	25
2.8 Tratamento e vacina da leishmaniose visceral canina.....	35
2.9 Controle.....	38
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivos gerais.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Área de estudo	43
4.2 População Amostral.....	47
4.3 Coleta de material biológico	47
4.4 Identificação dos animais	49

4.5 Avaliações epidemiológicas, clínicas e semiológicas dos animais	51
4.6 Parâmetros utilizados na classificação das características físicas exteriores dos animais (zootécnicas).....	53
4.7 Diagnóstico sorológico	55
4.7.1 Teste imunocromatográfico "TR DPP® Kit", (FiOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil).....	55
4.7.2 ELISA (Kit "EIE- leishmaniose visceral canina®", FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil)	58
4.7.3 ELISA "in house", com antígenos provenientes da UFOP (ELISA - UFOP)	60
4.8 Análise Estatística dos dados	62
4.8.1 Delineamento do estudo	62
4.8.2 Variáveis do modelo univariado e multivariado para positividade do ELISA Bio-Manguinhos	62
4.8.3 Análises estatísticas	63
4.9 Considerações éticas	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Características da população amostral	64
5.2 Diagnóstico sorológico da LVC.....	73
5.3 Fatores associados à positividade por ELISA Bio-Manguinhos- Análise univariada.....	74
5.4 Análise estatística Multivariada.....	80
5.5 Concordância entre os testes	81
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	93

REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	116
APÊNDICE A	130
APÊNDICE B	131
APÊNDICE C	132
APÊNDICE D	133
APÊNDICE E	134
APÊNDICE F	135
APÊNDICE G	136

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses apresentam destacada importância na saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem cerca de 12 milhões de indivíduos infectados distribuídos em 98 países de quatro continentes, sendo que 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Estima-se que 1,5–2 milhões de pessoas desenvolvam a doença anualmente (WHO, 2010).

As leishmanioses são doenças causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (BRASIL, 2011; WHO, 2012a). Os transmissores destas doenças são conhecidos por flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia*, em países do Novo Mundo e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (GRIMALDI & TESH, 1993; DESJEUX, 1996).

Estas doenças apresentam manifestações clínicas variadas em função da diversidade e complexidade biológica do protozoário *Leishmania sp.* A OMS classifica as leishmanioses clinicamente nas formas cutânea, mucocutânea e visceral (sinonímia de calazar), sendo esta última considerada a mais grave (WHO, 2010).

Segundo Monteiro *et al.*, 2005, são originários do Brasil 90% dos casos de leishmanioses das Américas. No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é considerada uma zoonose de transmissão vetorial, tendo como agente etiológico o protozoário *L. (L) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937; MS, 2005). Segundo alguns autores, *L. chagasi* é sinonímia da *Leishmania infantum* (DANTAS–TORRES & BRANDÃO–FILHO, 2006; MARZOCHI *et al.*, 2009; ROMERO & BOELAERT, 2010)

Raposas e marsupiais são reservatórios importantes para manutenção do ciclo da LV no ambiente silvestre, porém, no ambiente doméstico e peridoméstico o cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção (DEANE, 1956; MS, 2005). As análises biológicas e moleculares de amostras de *L. infantum* claramente demonstram similaridades entre os

parasitos isolados de cães e humanos (SILVA *et al.*, 2008; MARZOCHI *et al.*, 2009). Segundo Dantas-Torres & Brandão-Filho (2006), os cães preenchem as condições necessárias para serem reservatórios da *L. chagasi*, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem.

No cão, a LV é marcada pelo pleomorfismo de sinais e certamente influenciada por fatores relacionados à resposta imunológica do animal, por fatores intrínsecos do parasito e pela carga parasitária inoculada (MS, 2005; SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2006, SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; PALATINIK-DE-SOUZA, 2012). A leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta evolução lenta e início insidioso. É uma doença sistêmica grave e suas manifestações clínicas dependem do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico varia do aparente estado sadio a um grave estágio final (MS, 2006).

O diagnóstico da LVC representa um problema para os serviços de saúde pública. Isto se deve principalmente a três fatores: (1) grande porcentagem de cães assintomáticos ou oligossintomáticos existentes e a semelhança com outras enfermidades infecto-contagiosas que acometem os cães; (2) existência de alterações histopatológicas inespecíficas; (3) inexistência de um teste 100% específico e sensível. O diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado no exame parasitológico ou sorológico (MS, 2006).

É importante ressaltar que desde o início de 1980, a LV no Brasil, historicamente relatada como uma doença rural tem aparecido em diversos centros urbanos no norte e, mais recentemente no sul, sudeste e oeste do país (GENARO *et al.*, 1990; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; SILVA *et al.*, 2008; ROMERO & BOELAERT, 2010; HARHAY *et al.*, 2011). O Ministério da Saúde relata como um fator responsável pela expansão da doença a incapacidade operacional para a realização de inquéritos censitários a fim de se identificar os municípios silenciosos, ou seja, sem a ocorrência de casos humanos ou caninos da doença (MS, 2005).

No Brasil, apesar da implementação do Programa de Controle da Leishmaniose visceral (PCLV), a incidência e letalidade da doença não foram reduzidas a níveis aceitáveis, tem ocorrido aumento da prevalência e

mudanças no perfil epidemiológico de transmissão (MS, 2005; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

Tendo em vista a expansão da LV e as dificuldades no controle da doença, a metodologia proposta pelo Ministério da Saúde para a vigilância e adoção de medidas do programa de controle da doença, baseia-se em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco (MS, 2005).

O presente trabalho contempla o que preconiza o Ministério da Saúde, no sentido de se estimar a prevalência da LVC no município de Juiz de Fora. O primeiro caso autóctone de LVC na cidade data do ano de 2008; anteriormente, os raros casos diagnosticados no município eram provenientes de animais oriundos de outras cidades. Atualmente, são diagnosticados casos esporádicos de animais nascidos no município, porém não se tem uma estimativa da prevalência da doença nos cães (Secretaria Municipal de Saúde-informação pessoal).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e epidemiologia

Em meados de 1900 a 1903, foi descoberto por Leishman e Donavan um parasito ovalado em macrófago de baço de pacientes da Índia, através de esfregaço sanguíneo corado por Giemsa. Wright, em 1903, descreveu o primeiro caso de infecção por *Leishmania tropica*. Rogers, em 1904, cultivou células de baço de paciente com LV e obteve, pela primeira vez, formas promastigotas de *Leishmania* (CABRERA, 1999).

A suspeição de que os responsáveis pela transmissão da doença no Oriente seriam dípteros do gênero *Phlebotomus* foi feita por Presat, em 1905 (CABRERA, 1999). Logo em seguida, foi realizado o primeiro diagnóstico de um cão infectado por *Leishmania*, ocorrido na Tunísia, em 1908, sendo feito por Nicolle e Comte (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; ASHFORD *et al.*, 1998).

No Brasil, o primeiro caso de LV humana foi descrito por Migone em 1913. Aconteceu com um imigrante italiano que viveu em Santos, adoeceu em viagem ao Mato Grosso e foi diagnosticado no Paraguai (ALENCAR, 1977). Em seguida, Penna, comprova parasitologicamente, em 1934, 41 casos de LV através de amostras de vísceras retiradas de 40000 pacientes para diagnóstico de febre amarela, sendo estes oriundos de vários estados do Brasil.

As primeiras observações feitas no Brasil sobre a LVC foram realizadas em 1937 por Chagas, na região Norte. No entanto, a doença só foi caracterizada em 1956, quando estudada por Deane, em área endêmica do Ceará (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Deane & Mangabeira (1954) apontaram o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* como o vetor de LV e em 1957 propuseram o uso de DDT no controle do inseto (CABRERA, 1999).

O número total de novos casos humanos de LV no mundo é estimado em cerca de 500 mil, ocorrendo 50 mil óbitos a cada ano, sendo que Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão representam aproximadamente 90% de casos estimados da doença. Em Bangladesh, Índia

e Nepal ocorrem 67% dos casos de LV humana (CHAPPUIS *et al.*, 2007; WHO, 2010).

Desde a década de 1980, um número crescente de casos de LVH tem sido relatado em metrópoles brasileiras, com 94% dos casos registrados na região nordeste, sendo este percentual reduzido para 89% nos anos de 90. Na década de 2000, com o avanço da urbanização da doença, as regiões norte e sudeste apresentaram 37% dos casos e a região centro-oeste 7%. Em 2009, foi confirmado o primeiro caso autóctone na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2010).

Baseando-se nos últimos dados do MS disponíveis no SINAN-NET, entre o período de 2007 a 2012, foram confirmados 22.642 casos de LVH no Brasil, apresentando média anual de 3774 casos. No mesmo período, foram registrados 139.436 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), apresentando média anual de 23.239 casos.

Em relação à LVC, a prevalência é bastante variada e alguns exemplos em diferentes localidades brasileiras estão citados no Quadro 1.

Quadro 1- Exemplos de prevalências da LVC em localidades brasileiras.

Localidade/Estado	Número de animais estudados	Prevalência	Referência
Cuiabá/MT	468	3,40%	Almeida (2009)
Belo Horizonte/MG	1443	15,9%	Vital (2011)
Governador Valadares/MG	16.529	30,20%	Barata <i>et al.</i> , (2013)
Araguaína/TO	111	54,95%	Morais <i>et al.</i> , (2013)
Bom Sucesso/MG	734	2,98%	Silva & Santa-Rosa (2005)

Bonito/MS	303	30%	Andrade <i>et al.</i> , (2009)
Montes Claros/MG	46.337	6,3%	Prado <i>et al.</i> , (2009)
Fortaleza/CE	1381	24,04%	London (2007)
Maceió/AL	425	1,9%	Martins (2008)
São Vicente Férrer/PE	41	29,3%	Dantas-Torres (2009)
Camaçari-BA/Lauro de Freitas/BA	381	14,96%	Julião (2004)

2.2 Agente etiológico e taxonomia

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários tripanossomatídeos da Ordem Kinetoplastida, que apresentam uma estrutura de DNA característica associada à mitocôndria, denominada cinetoplasto ou KDNA (BATES & ASFORD, 2006; LAINSON & SHAW, 2006).

O protozoário possui um ciclo heteroxênico, necessitando de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. Em ambos os hospedeiros, o parasito pode apresentar formas evolutivas do tipo amastigota e promastigota (SILVA-LÓPEZ, 2010), ilustradas na figura 1 (A e B). A forma amastigota (Figura A) não apresenta flagelo livre, possuindo dimensões de 2,5 – 5,0 X 1,5 – 2,0 µm, podendo ser ovóide ou fusiforme. Apresenta cinetoplasto adjacente ao núcleo, onde é encontrado o DNA mitocondrial. É encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, dentro de macrófagos ou livres após o rompimento destas células. A forma promastigota (Figura B) apresenta dimensões variadas, possui flagelo longo, núcleo arredondado ou oval, estando presente no tubo digestivo do inseto vetor. Nesta forma, o cinetoplasto fica localizado na região anterior do parasito, próximo ao flagelo (LIRA, 2005; COLOMBO, 2012).

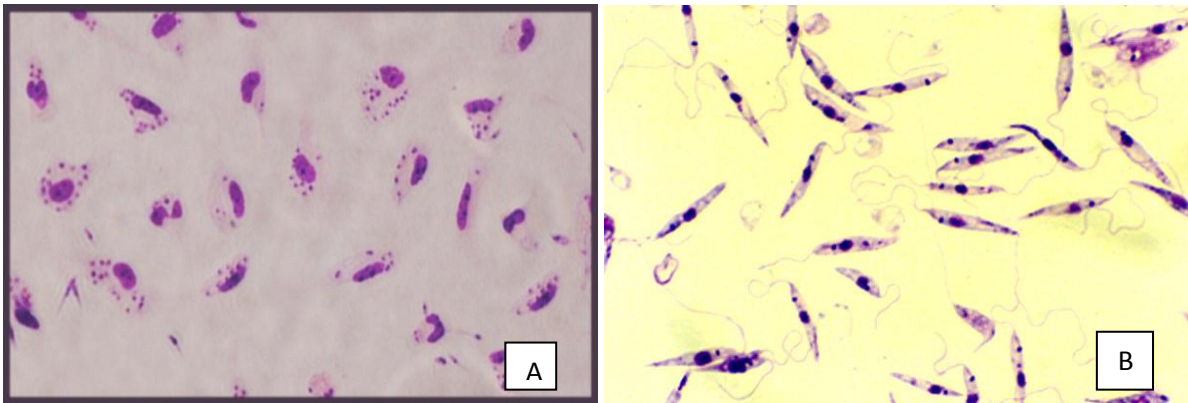


Figura 1 – A: Formas amastigotas de *Leishmania chagasi*. Fonte: NUPEP/ICB/UFJF. B: Formas promastigotas de *Leishmania* spp. Fonte: FIOCRUZ.

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros, de acordo com o desenvolvimento no intestino do vetor: *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON *et al.*, 1979). O subgênero *Leishmania* engloba várias espécies, entre as quais duas que levam à ocorrência da forma visceral da doença: *Leishmania (Leishmania) infantum*, zoonose que ocorre na Europa, no norte da África e na América Latina, e *Leishmania (Leishmania) donovani*, antroponose endêmica no Leste da África e Índia (CHAPPUIS *et al.*, 2006).

No Brasil, a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, considerada similar à *Leishmania (Leishmania) infantum* e apresenta caráter zoonótico (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Segue abaixo posição taxonômica do agente etiológico da LV:
Posição Taxonômica do Agente Etiológico da LV *Leishmania (Leishmania)*
chagasi (CUNHA & CHAGAS, 1937)

Reino: Protista Haeckel, 1866

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817

Filo: Sarcomastigophora Honigberg & Balamurth, 1963

Sub-filo: Mastigophora Deising, 1866

Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-ordem: Trypanosomatina Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Dofein, 1901, emend. Grobben 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Sub-gênero: *Leishmania* Saf'yanova, 1982

Espécie: *chagasi* Cunha & Chagas, 1937

As espécies de *L. chagasi* e *L. infantum* desenvolvem a mesma sintomatologia clínica nos seus hospedeiros, apesar de estarem separadas geograficamente. Porém, estudos comparativos das duas espécies através de métodos enzimáticos e genéticos demonstraram que *L. chagasi* é sinonímia de *L. infantum* (GRIMALDI JR. & TESH, 1993). Segundo Maurício *et al.*, (2000) um estudo com os métodos de amplificação randomizado de DNA polimórfico utilizando a proteína de superfície gp63 e a hibridização da ponta Lmet 9 do DNA demonstrou que as duas espécies não são distintas, então, seriam uma única espécie de *L. infantum*.

2.3 Vetor

Os vetores da LV, genericamente denominados de flebotomíneos (Figura 2), são da Ordem Díptera, família *Psychodidae* e gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, existindo cerca de 30 espécies

responsáveis pela transmissão da doença no mundo (DESJEUX, 1996; STRAUSS-AYLI & BANETH, 2000).

No Brasil, duas espécies até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutz. longipalpis* e *Lutz. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal transmissora da *Leishmania chagasi* em nosso país e, recentemente *Lutz. cruzi* foi incriminado como vetor no estado do Mato Grosso do Sul (MS, 2006). Alguns autores relatam outros flebotomíneos encontrados infectados por *L. infantum*, dentre estes: *Lutz. almerioi*, *Lutz. neivai* e *Lutz. saelesi* (SAVANI *et al.*, 2009; SARAIVA *et al.*, 2009). Estas espécies ainda não são consideradas vetores de *Leishmania spp.*

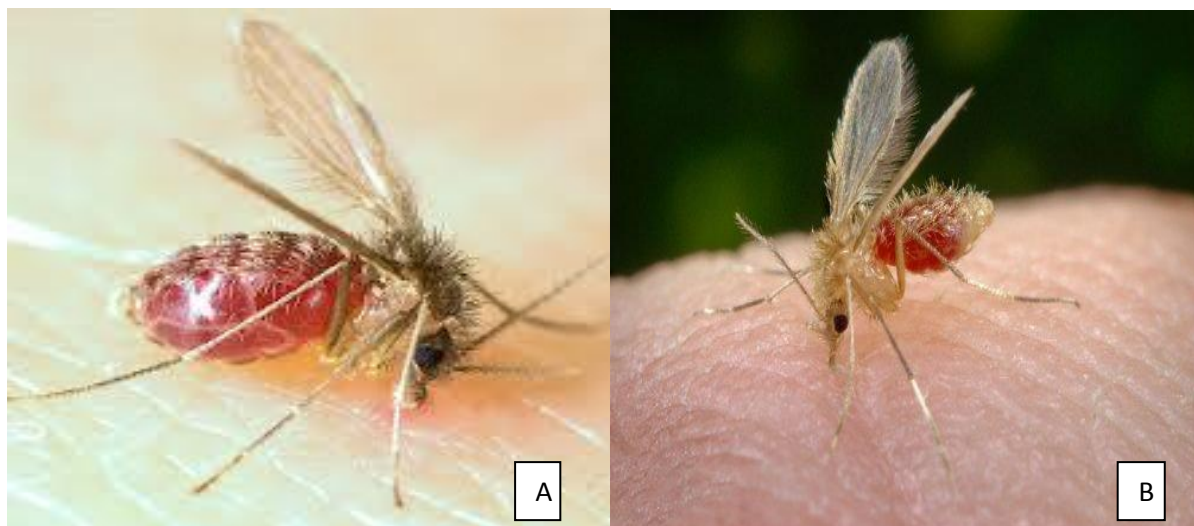


Figura 2- Flebotomíneos realizando repasto sanguíneo em humanos. Fonte A: <<https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis>> Fonte B: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Leishmaniose>>.

Os vetores da LV são conhecidos popularmente como “mosquito palha, tatuquiras, birigui,” entre outros. Esses insetos são pequenos, medem de 1 a 3 mm de comprimento, possuem o corpo revestido por pelos e são de coloração clara (castanho-claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Esses insetos na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa luminosidade. O

desenvolvimento do ovo ao inseto adulto ocorre num período de aproximadamente 30 a 40 dias, variando em função da temperatura. As fêmeas são hematófagas obrigatórias, vivendo 20 dias, em média. A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna, durante o dia repousam em locais sombreados e úmidos, protegidos dos ventos e predadores naturais (MS, 2006).

A distribuição geográfica do *Lutz. longipalpis* é ampla no Brasil e parece estar em expansão. Esta espécie é encontrada em quatro das cinco regiões geográficas: norte, nordeste, sudeste e centro-oeste. Ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos em periferias de grandes centros, principalmente na região sudeste, podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiros, canis e paióis, entre outros ambientes e também no intradomicílio. Em áreas urbanas, o cão parece ser a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico (MS, 2006); porém, vários estudos demonstraram que outros animais, como galinhas, roedores e cavalos, podem ser fonte de alimentação para vetores da LV (MORENO *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2003). Há indícios de que o período de maior transmissão de leishmaniose visceral ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (MS, 2006).

2.4 Ciclo biológico e mecanismos de transmissão

O ciclo biológico (figura 3) é do tipo heteroxênico, envolvendo dois hospedeiros: vertebrados, representados por vários mamíferos, incluindo o homem e, os invertebrados, genericamente denominados de flebotomíneos. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos e a liberação das formas amastigotas. Estas, diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que reproduzem-se por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o

esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes – promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos. No interior destas células, em um vacúolo denominado de parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas, as quais multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação destas formas que são fagocitadas por novos macrófagos, num processo contínuo, ocorrendo então, a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MS, 2006).



Figura 3 – Ciclo de vida da *Leishmania chagasi* - agente etiológico da leishmaniose visceral – ciclo doméstico e silvestre. Fonte: adaptado de STRAUSS-AYAL & BANETH, 2000.

Embora a transmissão natural de *L. chagasi* ocorra principalmente pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutz. longipalpis*, outros mecanismos de transmissão provavelmente estejam envolvidos na epidemiologia da LVC. Este fato se justifica devido à baixa taxa de infecção

natural por *L. infantum* no vetor biológico, não excedendo, em sua maioria, 0,5%, assim como em razão da alta prevalência de cães infectados, encontrados principalmente no Brasil. Além disso, em algumas áreas endêmicas, o *Lutz. longipalpis* não é encontrado (MONTROYA-LERMA *et al.*, 2003; ROMERO & BOELAERT, 2010)

Existem algumas áreas, onde a LVC é endêmica ou tem sido esporadicamente relatada, porém poucos casos humanos são notificados e/ou a presença do vetor primário não tem sido confirmada (DANTAS-TORRES *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2007). Abre-se discussão sobre a participação de outras espécies de flebotomíneos no ciclo da doença ou até mesmo a existência de formas secundárias de transmissão. Vários trabalhos têm sugerido a participação de outros vetores e outras formas de transmissão de LVC: pulgas e carrapatos (COUTINHO *et al.*, 2005; COUTINHO & LINARDI, 2007; COLOMBO, 2012). Entretanto, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides felis felis* dificilmente poderiam ser considerados vetores biológicos pela dificuldade de transmitir o parasito por meio da picada. Contudo, de acordo com estudos realizados até o momento, estes podem estar atuando como vetores mecânicos da doença (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Não existe comprovação de transmissão direta de um animal para outro, de animais para pessoas ou de pessoas para outras (CAMARGO-NEVES *et al.*, 2006). Outras formas de transmissão também são sugeridas: transmissão venérea (SILVA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010), transfusão sanguínea (OWENS *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2006), transmissão transplacentária (SILVA *et al.*, 2009), ingestão de vísceras contaminadas e por mordeduras (SHERLOCK, 1964).

2.5 Reservatórios da leishmaniose visceral

Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV. No ambiente silvestre os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albentris*) (MS, 2006). A figura 4 (A e B) mostra os principais reservatórios da LV no ambiente silvestre.

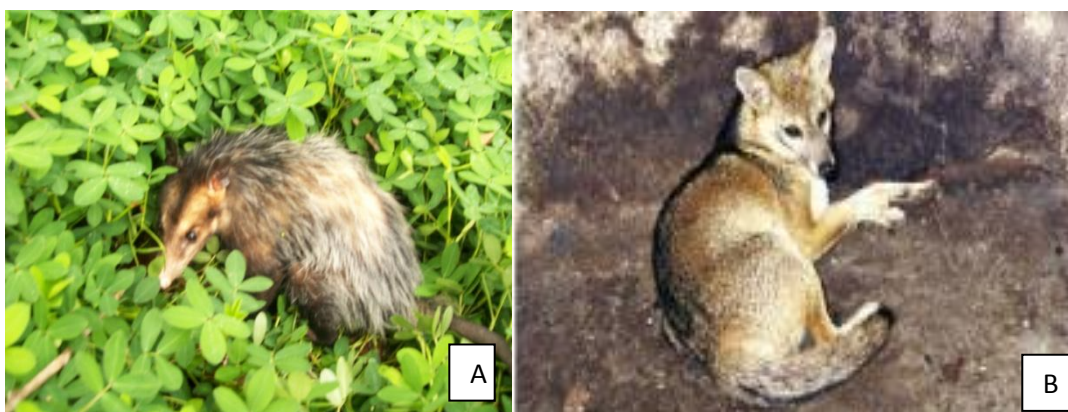


Figura 4 – Gambá e raposa, reservatórios silvestres da LV. Fonte A: do autor, fotografado no Parque do Museu Mariano Procópio–Juiz de Fora. Fonte B:<
<http://leishmaniose.weebly.com/reservatoacuterio.html>>

É interessante também acrescentar que Silva *et al.*, (2010) em Belo Horizonte, relataram o primeiro caso, no Brasil, de infecção do *Lutz. longipalpis* adquirida em um gato com LV. O felino apresentava sinais clínicos compatíveis com a doença. O animal apresentou-se reativo em dois testes sorológicos (ELISA e RIFI) e teve resultado positivo em PCR específico para *L. infantum* em aspirado de medula óssea. A capacidade de infecção do *Lutz. longipalpis* foi confirmada por xenodiagnóstico, sendo encontradas formas promastigotas de *L. infantum* em 13,1% dos insetos dessecados.

Atualmente sabe-se que gatos domésticos podem ser infectados por *L. infantum* em áreas endêmicas para LV e LVC, e que esta infecção pode se traduzir em doença clínica. Além disto, no caso da Leishmaniose Visceral felina, postula-se que estes animais sejam capazes de transmitir o parasito

para o hospedeiro invertebrado natural. Entretanto, em termos epidemiológicos, a literatura não suporta maiores conclusões a respeito da participação destes animais no contexto de transmissão da Leishmaniose visceral zoonótica. Mais estudos precisam ser conduzidos para determinar o real papel dos gatos na epidemiologia da LV (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Gramíccia & Gradoni (2005) afirmam existir relatos de equídeos domésticos infectados por *Leishmania spp* na América Latina e Europa, apresentando formas cutânea e visceral da doença, acrescentando que, características próprias do sistema imunológico destes animais e clínica apresentada demonstram resistência às leishmanioses, sendo portanto, considerados hospedeiros acidentais e não reservatórios.

Outros animais, não associados usualmente com a LV, também foram encontrados infectados. Carvalho (2005), por exemplo, detectou por PCR, DNA de *L. chagasi* em amostra coletada do roedor silvestre *Nectomys squamipes* (“rato da água”), no estado de Pernambuco. Oliveira *et al.*, (2005) pesquisaram roedores sinantrópicos e silvestres em Minas Gerais e encontraram animais infectados por espécies dos complexos *L. donovani*; *L. mexicana* e *L. braziliensis*, sendo pesquisados espécimes de *Thrichomys opereoides*; *Cerradomys subflavus* e *Rattus rattus* (“rato de telhado”). Este último roedor é comumente encontrado em zona urbana e rural, sendo considerado um animal sinantrópico. Em Belo Horizonte- MG foram encontrados roedores infectados simultaneamente por *L. infantum* e *L. braziliensis*. Cabe ressaltar que são espécies comumente encontradas em zona urbana, sendo considerados animais sinantrópicos: *Mus musculus* (Camundongo) e *Rattus rattus* (FERREIRA, 2010).

Mais estudos longitudinais sobre a ecologia de pequenos mamíferos são necessários, assim como a realização de ensaios experimentais para avaliar a infecciosidade de espécies encontradas naturalmente infectadas, para espécies de flebotomíneos que são vetores comprovados de *Leishmania spp*. Tais investigações visam comprovar o papel desses hospedeiros como prováveis reservatórios (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Segundo SILVA *et al.*, (2005), apenas a detecção de DNA de *Leishmania* numa espécie animal não é o suficiente para que o mesmo seja considerado um reservatório da infecção. A certeza de que tal espécie

representa um reservatório de *Leishmania spp.* depende de alguns requisitos que devem ser atendidos:

- 1- O encontro da espécie de Flebotomíneo vetor naturalmente infectado na mesma região em que foi coletado o suposto reservatório;
- 2- A sobrevivência do hospedeiro por tempo suficiente para garantir a transmissão da infecção;
- 3- Prevalência da infecção entre os hospedeiros acima de 20%;
- 4- Manutenção do parasitismo no sangue periférico e/ou lesões de pele em quantidade suficiente para infectar o vetor;
- 5- A presença da mesma espécie de *Leishmania* no reservatório e em humanos.

2.6 Sinais clínicos da LVC e achados de patologia clínica

O período de incubação da LV é bastante variável tanto para o homem como para o cão. No homem, varia entre 10 dias a 24 meses, apresentando média de 2 a 6 meses. No cão, este período é ainda mais variável, sendo considerado a partir de 3 meses a vários anos, apresentando uma média de 3 a 7 meses (MS, 2006). A visceralização da infecção pode iniciar-se em poucos meses ou levar vários anos para ocorrer (GÁLLEGO, 2004).

Classicamente a LVC apresenta lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações, além de pelos opacos. Nas fases mais adiantadas da doença observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além de hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (MS, 2006).

Os primeiros sinais clínicos, e os mais comuns, são alterações dermatológicas, com destaque para dermatite esfoliativa e acentuada perda de pelos ao redor dos olhos. A doença evolui com o surgimento de úlceras, alopecia local ou generalizada e hiperpigmentação da pele (FREITAS *et al.*, 2006). Moreira *et al.*, (2007) encontraram em seus estudos que os sinais clínicos mais frequentes tanto para cães sintomáticos como os oligossintomáticos, são a linfadenomegalia, perda de peso, alterações dermatológicas e onicogribose. Silva *et al.*, (2001a) também observaram, durante seus estudos, lesões cutâneas pequenas e únicas ou múltiplas, com bordas altamente simétricas, sem prurido, que podiam ser vistas em diferentes partes do corpo, inclusive nas orelhas, no focinho, nas patas e nos genitais dos cães com LV.

Com o acometimento visceral, o cão torna-se emaciado, com perda de apetite, perda de peso e comumente apresenta caquexia (FEITOSA *et al.*, 2000).

A maioria dos trabalhos mostra que a situação clínica dos animais interfere na infectividade destes para os flebotomíneos. Segundo Gradoni *et al.*, (1987) cães com maior número de sintomas clínicos infectaram maior número de fêmeas de flebotomíneos. Os trabalhos de Travi *et al.*, (2001) na Colômbia e Costa-Val (2004), sobre tratamento da LVC, mostraram que cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, quando assintomáticos, não infectaram as fêmeas de *L. longipalpis*, os oligossintomáticos infectaram pouco e os sintomáticos infectaram maior número de fêmeas e com carga parasitária maior. Em contrapartida, Molina *et al.*, (1994) não encontraram diferenças na infectividade para os flebotomíneos entre cães com diferentes apresentações clínicas.

Existem diferentes critérios utilizados nas classificações clínicas dos animais, os quais variam entre os autores. Quinnell *et al.*, (2003) por exemplo, consideram alopecia, dermatite, úlcera, onicogribose, conjuntivite e linfadenopatia como alterações importantes e classificam os animais em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Entretanto, Mancianti *et al.*, (1988) incluem em suas classificações a adenopatia linfóide, diminuição do peso, opacidade dos pelos, alopecia, eczema furfuráceo, úlcera, onicogribose, ceratoconjuntivite, e rigidez dos membros posteriores, graduando os animais em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos.

Segundo Solano-Gallego & Baneth (2008), a classificação clínica baseada nos sinais mais comuns da LVC tem sido extremamente válida há muitos anos, porém, esta não leva em consideração as alterações referentes à patologia clínica e as graves alterações sistêmicas dos cães que clinicamente apresentam-se “sadios”, possuindo portanto, um valor limitado. Estes autores classificam os animais em: cães com leishmaniose clínica, aqueles com alterações clínicas de patologia clínica e com infecção confirmada e cães com leishmaniose sub-clínica, aqueles que não apresentam sinais clínicos ou alterações de patologia clínica, porém, tenham a infecção confirmada.

Embora os encontros de hematologia, bioquímica sérica e urinálise possuam limitado valor de diagnóstico da LVC, esses resultados fornecem importante subsídio para avaliação do estado clínico do animal (REIS, 2001 & IKEDA *et al.*, 2003).

Segundo Reis (2001) & Genaro (1993), a disproteinemia é um achado marcante da LVC. É caracterizada por hiperproteinemia, sendo observada na maioria dos cães infectados por *Leishmania* sp. Já Ikeda *et al.*, (2003) relata que em alguns animais, particularmente os com sinais clínicos mais graves da doença, a disproteinemia é caracterizada por hipoproteinemia. Há unanimidade entre autores em relação ao perfil eletroforético das proteínas plasmáticas dos cães doentes: há um aumento geral de gamaglobulinas enquanto a diminuição de albumina seria devido a perdas por nefropatias, doenças hepáticas, subnutrição crônica ou até mesmo combinações de fatores. Assim sendo, a relação albumina/Globulina (A/G) estaria invertida na maioria dos animais doentes, sendo tanto menor quanto mais sintomas o animal apresentasse. Segundo Koutinas *et al.*, (1999) em alguns animais, a hipoalbuminemia poderia agir como mecanismo de equilíbrio à hipergamaglobulinemia, o que resultaria em valores de proteínas plasmáticas totais normais, ressaltando a importância do perfil eletroforético. Além disso, a trombocitopenia tem sido relatada em 29 a 50% dos cães portadores de LV (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Segundo Nieto *et al.*, (1992) o aumento dos níveis de uréia no sangue é mais comum que o aumento dos níveis de creatinina. Segundo Lopes *et al.*, (1996) a hipercreatininemia correlaciona-se de forma positiva com os imunocomplexos (CIC) determinantes das nefropatias na LVC, sugerindo que os níveis de creatinina possam ser usados como indicadores da presença de

CIC (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Amusatogui *et al.*, (2003), descreveram aumento nos níveis de uréia em 40 de 61 cães com LV, enquanto que a creatinina estava elevada em apenas 3 dos 44 cães avaliados. Xavier (2002) observou que cães assintomáticos apresentaram maiores índices de uréia sérica que aqueles oligossintomáticos ou sintomáticos.

Em relação à urinálise, a proteinúria é a alteração mais frequente descrita, sendo encontrada em 71 a 85% ou até mesmo 100% dos animais portadores de LVC, seja em graus discretos ou até mesmo graves. A anemia é um achado frequente para a maioria dos autores, sendo encontrado em cerca de 50 a 70% dos pacientes, tendo como características marcantes a normocitose, normocromia e arregeneração (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Barros (1998) apontou que os cães com LV apresentavam anemia não regenerativa e hipergamaglobulinemia policlonal, ou seja, aumento inespecífico e generalizado de gama globulinas, com concentrações de proteína total que podem passar de 100 g por litro. O valor de referência é de 10 g por litro.

A contagem total e diferencial de leucócitos não obedece qualquer padrão em cães portadores de LV: alguns animais apresentam leucocitose com desvio para a esquerda regenerativo, enquanto outros possuem leucopenia, geralmente por neutropenia ou mesmo perfil leucocitário normal (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Finalizando, a apresentação clínica da LVC é consequência de interações complexas entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (SANTOS-GOMES, 2002).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LVC baseado nos sinais clínicos torna-se bastante dificultado, principalmente pela ocorrência de outras patologias, além do grande número de cães assintomáticos (SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2005; SILVA, 2007). Matos *et al.*, (2004) relata a dificuldade de diagnóstico clínico de LVC pelo fato de não haver sinais patognomônicos da doença e pelo fato de muitos animais serem assintomáticos. Marzochi *et al.*, (1985) observaram que 63,2% dos cães infectados por LV não apresentaram sinais clínicos da doença.

Para o diagnóstico da LVC existem basicamente 3 categorias de provas utilizadas: métodos parasitológicos, sorológicos/imunológicos e moleculares (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

- Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método de certeza. Possui especificidade de 100%, porém a sensibilidade depende do grau de parasitemia, tipo de material coletado e tempo de leitura da lâmina. São métodos invasivos e impraticáveis em programas de saúde pública, nos quais, grande número de animais deve ser avaliado em curto espaço de tempo. Baseia-se na demonstração do parasito em material biológico obtido através de punção hepática, de linfonodos, baço, medula óssea e biópsia ou escarificação da pele. É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas de amastigotas (MS, 2006). Tem sido considerado como padrão ouro nas leishmanioses devido à sua alta especificidade (ROMERO *et al.*, 2009).

Dentre os métodos de detecção direta do parasito, os mais utilizados são a microscopia e a cultura. A microscopia consiste na observação direta da *Leishmania*, na forma amastigota livre ou no interior de células do sistema mononuclear fagocitário, em lâminas coradas com o Giemsa e o Leishman. Na cultura, as formas promastigotas são cultivadas em meios específicos e em condições de temperatura adequadas ao seu desenvolvimento. Nem todas as espécies de *Leishmania* crescem ao mesmo tempo e nem todos os tecidos e órgãos de um mesmo indivíduo possuem semelhante carga parasitária. No intuito de melhorar e aumentar a sensibilidade na detecção do parasito, a

cultura “*in vitro*” deveria ser realizada em diferentes tecidos e a inoculação deveria ser feita em replicata (EVANS, 1989)

Apesar de ser rápida e ter um custo baixo, a principal desvantagem da microscopia é o fato do bom resultado depender de pessoal bem treinado, fazendo com que o método seja de difícil utilização em estudo de campo onde um grande número de amostras precisa ser analisado em um curto período de tempo. Deve-se salientar, a possibilidade de fornecimento de resultados falso negativos, porque sua sensibilidade depende da quantidade de parasitos presentes na amostra, ou resultados falso positivos, já que outros artefatos podem ser visualizados e confundidos com formas amastigotas (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH & AROCH, 2008; GOMES *et al.*, 2008).

O cultivo de promastigotas, considerado 100% específico, apresenta problemas referentes ao longo tempo para liberação dos resultados, à dificuldade em isolar parasitos selvagens no meio de cultura, à dependência do número de parasitos presentes no material e às possíveis contaminações microbianas que inviabilizam a obtenção do resultado. Uma cultura só é considerada negativa, após quatro sucessivas subculturas negativas. Isso torna o método caro e inadequado para o diagnóstico (SINGH,1997; ALVAR *et al.*, 2004; MAIA & CAMPINO, 2008)

Manna *et al.*, (2004) salientaram que o exames microscópicos de fragmentos de pele de amostras de biópsias de lesão, apesar de rápidos e de baixo custo, possuem sensibilidade limitada, particularmente se as lesões forem crônicas. Por outro lado, as técnicas de cultura em *in vitro* são ligeiramente mais sensíveis que os exames microscópicos de esfregaços de biópsia de lesão ou de amostras histológicas, embora também sejam mais trabalhosos e onerosos além de estarem mais susceptíveis à contaminação biológica.

É importante frisar que o método de microscopia não permite a distinção de espécies de *Leishmania* (REALE *et al.*, 1999; ARANSAY *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001a). O isolamento do parasito feito em cultura, combinado com a eletroforese de enzimas *multilocus* permite a identificação da espécie de *Leishmania*, porém, tal procedimento é demorado em função da necessidade de se obter uma grande massa de parasitos e exige grande conhecimento técnico (CUPOLILLO *et al.*,1994). Vale ressaltar que esta técnica permitiu a

confirmação do primeiro caso de co-infecção de um cão naturalmente infectado no Rio de Janeiro. Foram coletadas amostras de lesão cutânea, sangue e linfonodos, sendo identificadas as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. infantum* (MADEIRA *et al.*, 2006).

- Sorológicos/Imunológicos

Devido aos problemas inerentes à pesquisa direta do parasito, foram desenvolvidos alguns métodos indiretos, como a sorologia, a qual tem sido o método de escolha no diagnóstico de rotina e em levantamentos epidemiológicos da LVC (BADARÓ *et al.*, 1996).

A sorologia é uma técnica amplamente utilizada e tem sido relatado que anticorpos anti-*Leishmania* podem ser detectados a partir de 14 a 28 dias após a infecção, com declínio de 45 a 80 dias após tratamento. Baseando nisto, foram desenvolvidas várias técnicas sorológicas, as quais apresentam sensibilidade variável (BADARÓ *et al.*, 1996).

A LV induz altos títulos de anticorpos, o que facilita seu diagnóstico por testes sorológicos, sendo estes utilizados em inquéritos. Os métodos de diagnóstico utilizados são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI); reação de fixação de complemento (RFC); “direct agglutination test” ou teste de aglutinação direta (DAT); hemaglutinação indireta (HAI); imunodifusão (ID); “enzyme lynked immunosorbent assay” ou teste imunoenzimático (ELISA) e o teste imunocromatográfico (COSTA *et al.*, 1991; JADER, 2006).

Segundo Martins (2008), a RIFI é realizada com antígenos fixados em lâminas, onde se aplica inicialmente um anticorpo específico não fluorescente. O segundo anticorpo colocado é o fluorescente com especificidade marcada contra determinantes antigênicos do primeiro anticorpo, utilizado para reagir com o antígeno. Consequentemente, tem-se a vantagem de se obter uma fluorescência mais evidente, pelo fato do anticorpo fluorescente se ligar apenas aos anticorpos primários. Antígenos de promastigotas de *L. chagasi* foram os mais sensíveis e específicos com relação aos outros antígenos, sendo recomendados pelos autores para o diagnóstico da LV pela RIFI (BADARÓ *et al.*, 1983). Entretanto, segundo Costa *et al.*, (1991) a RIFI apresenta altas taxas de sensibilidade, mesmo quando se utiliza antígenos de outras espécies de *Leishmania* a exemplo *L. braziliensis* e *L. mexicana*.

Alguns autores ressaltam características e limitações importantes da RIFI. Gradoni (2002) considera a RIFI a técnica padrão-ouro para o diagnóstico da LV e observa que a especificidade da técnica não é ameaçada nos países do Mediterrâneo por reações cruzadas que existem na América Latina devido à ocorrência de outras parasitoses que acometem os cães. Utilizada desde a década de 1960, a RIFI demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro. A especificidade deste teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos e Leishmaniose Tegumentar Americana (ALVES, BEVILACQUA, 2004). Segundo Alvar *et al.*, (2004) a RIFI, apesar de ser útil do ponto de vista clínico, pode subestimar a prevalência da infecção de *Leishmania* na população de cães de áreas endêmicas. A sensibilidade da RIFI em detectar cães infectados varia de 21,6% (SILVA *et al.*, 2001a) até 100% (CIAMARELLA *et al.*, 1997).

Segundo o MS (2006), o ELISA usualmente utilizado como técnica de diagnóstico no Brasil consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esses antígenos são adsorvidos em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. Estando presentes, anticorpos específicos do soro irão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado é considerado sororeagente quando a densidade ótica for igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (*Cut-off*) do resultado do controle negativo.

O ELISA é amplamente utilizado no diagnóstico da LV canina, sendo a segunda técnica mais utilizada por pesquisadores europeus (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Podem ser citadas como vantagens do ELISA: facilidade para examinar grande número de animais em curto período de tempo e a versatilidade, sendo facilmente adaptável para ser usada com diversos tipos de antígenos, tais como citoplasma total, antígenos purificados, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes (MAIA & CAMPINO, 2008).

O antígeno mais utilizado é o extrato bruto solúvel, mesmo apresentando reação cruzada com outras doenças (SUNDAR & RAÍ, 2002; REITHINGER *et al.*, 2003). Os antígenos utilizados no ELISA são comumente derivados de promastigotas cultivados *in vitro*, geralmente rompidos por ultrassom, expondo cerca de 30 antígenos somáticos e inúmeros componentes de superfície. Este método também tem seus níveis de especificidade comprometidos por reações cruzadas com outras espécies de tripanosomatídeos e até mesmo por espécies filogeneticamente distantes (TAVARES *et al.*, 2003).

A sensibilidade e especificidade do ELISA são bastante influenciadas pelo tipo de antígeno utilizado (SINGH & SIVAKUMAR, 2003). Sundar & Raí (2002), relatam que em relação a técnicas de diagnóstico da LV, a especificidade depende mais do tipo de antígeno usado no teste que do protocolo adotado, sendo a sensibilidade influenciada pela metodologia.

Alguns autores ressaltam vantagens na utilização de antígenos recombinantes na técnica do ELISA, como exemplo: Carvalho *et al.*, (2002) compararam a utilização de antígenos recombinantes (purificados) com antígenos brutos e obtiveram uma maior sensibilidade de antígenos purificados. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados com as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70, específicas do gênero *Leishmania*, tendem a melhorar a especificidade e sensibilidade da técnica do ELISA (COSTA *et al.*, 1991; OZENZOY, 1998). Segundo Badaró *et al.*, (1996) e Scalone *et al.*, (2002) o antígeno recombinante rk39, um epítipo imunodominante repetitivo em uma proteína relacionada de Kinesina, que se caracteriza por ser bastante conservado entre as espécies de *Leishmania* viscero-trópicas, tem sido usado em testes sorológicos de ELISA e tem se apresentado com boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LVC e LVH. Porrozi *et al.*, (2007) realizaram estudos com o antígeno recombinante rk39 utilizando a técnica do ELISA e observaram ser este mais sensível quando pesquisados em cães sintomáticos (100%) em comparação com assintomáticos (66%).

Segundo Gradoni (2002), tem-se buscado a caracterização molecular dos componentes dos antígenos de *Leishmania* para ELISA, no intuito de se obter maior especificidade. Entretanto, o custo de produção de antígenos específicos purificados é geralmente muito alto e, em função disso, antígenos

brutos são muito utilizados, reduzindo a sensibilidade e especificidade dos testes. O uso de antígenos brutos, amastigotas ou promastigotas inteiros, ou extratos solúveis dos mesmos limitam a especificidade dos exames sorológicos. A clonagem de genes que codificam para proteínas antigênicas de *Leishmania* é importante para o desenvolvimento de novos alvos e para se criar métodos de sorodiagnóstico mais específicos, como por exemplo, o antígeno recombinante rk39, o único atualmente comercializado (MAIA & CAMPINO, 2008).

Diversos autores comparam os testes de RIFI e ELISA: a RIFI é passível do cometimento de erros subjetivos de leitura em reações fracamente positivas, fator este compensado pelo ELISA que apresenta sua leitura automatizada (CARRERA *et al.*, 1996; GRADONI, 2002). O ELISA apresenta índices de sensibilidade superiores à RIFI; por esta razão, é a técnica de eleição para diagnóstico da LVH e Leishmaniose Tegumentar Americana canina (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Braga *et al.*, (1998) observaram em seus experimentos que o ELISA utilizando soro de cães, mostrou-se 4,6 vezes mais sensível que a RIFI do eluato de papel filtro, em função da maior detecção de cães precocemente infectados. Segundo Jader (2006), as técnicas sorológicas da RIFI e ELISA oferecem boa sensibilidade e especificidade, mas requerem estruturas e insumos caros, além de recursos humanos especializados. A instabilidade de seus reagentes em temperatura ambiente e o longo período de tempo entre colheita, processamento da amostra e a liberação dos resultados são também fatores limitantes destas técnicas. O autor ressalta outra técnica de exame sorológico, o teste imunocromatográfico rápido, e afirma ser, neste contexto, o instrumento que melhor se adaptaria pela sua facilidade de execução e possibilidade de ser realizada a campo.

Métodos de diagnósticos precisos para LV, com elevada sensibilidade e especificidade, de fácil realização e interpretação, que forneçam resultados rápidos, que independam de infraestrutura laboratorial e profissionais especializados tem sido cada vez mais procurados (DOURADO *et al.*, 2007). Nesta vertente, a Bio-Manguinhos lançou um teste rápido qualitativo imunocromatográfico para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* TR DPP®, o qual utiliza antígenos recombinantes. Uma vantagem deste teste é a possibilidade de ser realizado em campo como triagem, a partir de amostras de

sangue total obtidas por utilização de lancetas e fornecer resultados em 15 minutos. Segundo o manual de instruções, a leitura pode ser realizada de maneira visual ou através de leitor ótico. O mesmo, indica sensibilidade de 98,3% quando comparado ao teste parasitológico e especificidade de 97,4% em relação ao teste ELISA, revelando praticidade e rapidez em diagnóstico de LVC.

Segundo Rosário *et al.*, (2005) antígenos recombinantes não mostraram nenhuma reação cruzada no diagnóstico por ELISA. A principal limitação de antígenos brutos são as reações cruzadas, sendo que os antígenos recombinantes podem ser utilizados em grande escala nos programas de controle da doença. Em contrapartida, Reithinger *et al.*, (2002) concluíram que a especificidade do teste imunocromatográfico ainda é pequena, havendo a necessidade de aprimoramento da técnica para que possa ser utilizada definitivamente a campo. Neste sentido, Jader (2006), avaliando o teste imunocromatográfico, observou que o mesmo apresentou valores de sensibilidade e especificidade que permitem a sua adoção no Brasil, podendo ser utilizado em substituição à RIFI, em amostras sem hemólise, por não apresentar diferenças estatísticas significativas.

O teste sorológico de aglutinação direta (DAT) utiliza antígenos promastigotas inteiros corados, podendo estes estar em suspensão ou liofilizados. É um método simples e barato, sendo indicado por diversos pesquisadores para utilização em estudos de campo. (MEREDITH *et al.*, 1995; NEOGY *et al.*, 1992; SCHALLIG *et al.*, 2002a). Já Harith *et al.*, (1989) relata que, as principais limitações do DAT são o longo tempo de incubação (18 horas) e a utilização de diluições seriadas de sangue ou soro, fazendo com que o teste seja trabalhoso e inapropriado para o exame de grande número de amostras. Cabe salientar que o desenvolvimento de um antígeno liofilizado torna o DAT adequado para o uso em condições extremas, já que permanece estável em altas temperaturas (MEREDITH *et al.*, 1995; SCHALLIG *et al.*, 2002b).

No Brasil, inicialmente, o teste de diagnóstico utilizado em inquéritos era o RFC (Reação de Fixação do Complemento), que foi substituído posteriormente pela RIFI (COSTA *et al.*, 1991). A RIFI e o ELISA foram recomendados pelo Ministério da Saúde para a avaliação da soroprevalência

em inquéritos caninos amostrais e censitários durante anos. O ELISA era recomendado para triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação de cães sororreagentes ao teste de ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina (MS, 2006).

Entretanto, considerando a baixa sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes atualmente utilizados, principalmente com o Kit de RIFI e as freqüentes interrupções no fornecimento deles, o Ministério da Saúde orientou a realização de estudo transversal, multicêntrico, randomizado e duplo-cego com o objetivo de validar os testes diagnósticos sorológicos da LVC produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos da FIOCRUZ, gerando resultados que possam assegurar tomadas de decisão em saúde pública. Foram testados aproximadamente 1400 soros de cães de área urbana com transmissão intensa e percentual de positividade canina maior que 10%. Foram comparados os resultados dos testes com ELISA major *like*, RIFI major *like* (1:40) e teste rápido imunocromatográfico (DPP), tendo exames parasitológicos como padrão ouro. Os resultados obtidos mostraram maior sensibilidade (87,88 IC95% 79,78-93,58) e especificidade (88,03 IC95% 86,68-90,21) do DPP e ELISA ao se comparar com ELISA e RIFI (sensibilidade de 86,00 IC95% 77,63-92,13 e especificidade de 85,71 IC95% 83,67-87,59) também utilizados em série. Foi igualmente melhor a reprodutibilidade apresentada pelo DPP (0,778 IC 95% 0,745-0,812) e pelo ELISA (0,819 IC95% 0,851-0,884) em comparação à RIFI (0,459 IC95% 0,418-0,499). Assim, a partir de março de 2012, o Ministério da Saúde passou a orientar a utilização do DPP como teste de triagem usando sangue total, plasma ou soro sanguíneo e o teste ELISA como confirmatório para LVC (CAD. TEC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Finalizando, a literatura é rica quando cita as limitações dos testes sorológicos, cabendo destacar algumas: os testes sorológicos não permitem a diferenciação entre doença ativa e apenas um contato prévio com agente ou ainda não discrimina a doença clínica da infecção subclínica, fato este importante quando se trata de cães vacinados (GONTIJO & MELO, 2004); os testes sorológicos podem ser ineficientes para o diagnóstico no período de tempo entre a infecção e a soroconversão (MANNA *et al.*, 2004); as técnicas apresentam alta sensibilidade e especificidade, mas nem sempre um resultado positivo pode ser conclusivo da doença ativa, da mesma forma que cães

infectados podem ser soronegativos (SILVA *et al.*, 2006). Por fim, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e o grande número de métodos empregados demonstram a dificuldade em desenvolver uma técnica suficientemente confiável para o diagnóstico (IKEDA-GARCIA & FEITOSA, 2006 ; BARROSO-FREITAS *et al.*, 2009).

-Molecular

O teste molecular mais utilizado é o diagnóstico pela Reação da Cadeia em Polimerase (PCR), o qual baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos específicos apresentados pelo parasito, utilizando-se uma enzima termoestável, a taq DNA polimerase, isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (SINGH,1997).

Em função das elevadas sensibilidade e especificidade, a PCR tem se mostrado uma ferramenta de diagnóstico superior aos métodos convencionais (ASHFORD *et al.*, 1995; SANCHES *et al.*, 2001). Além disto, a PCR vem sendo considerada um método alternativo para diagnóstico em cães vacinados, visto que as técnicas convencionais podem resultar em falso-positivos (PILLATTI *et al.*, 2009). Entretanto, a eficácia da PCR depende de diferentes fatores tais como os iniciadores, o número de cópias do alvo, o método de extração do DNA, o material biológico e o protocolo (CORTES *et al.*, 2004).

Segundo Gomes *et al.*, (2007) uma metodologia baseada na técnica da PCR é interessante por ser rápida, sensível e específica, além de evitar a etapa de cultivo de parasitos. A PCR apresenta potencial para ser empregada em programas de vigilância em leishmanioses, os quais requerem análises laboratoriais eficientes e necessitam de ações rápidas e concisas. Além disto, deve-se acrescentar que a PCR pode ser realizada a partir de amostras, como pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos, além de técnicas não invasivas como swab conjuntival (PILLATTI, 2009; SOLANO-GALEGO *et al.*, 2011). Reale *et al.*, (1999) acrescentam também que os resultados da PCR não dependem do estado imunológico do animal.

Entretanto, deve ser levado em consideração que pode haver diferenças nos resultados em função das técnicas da PCR e tipos de amostras biológicas escolhidas. Por exemplo, Solano-Galego *et al.*, (2001) realizaram PCR em população canina residente em área endêmica para LV utilizando amostras de

biópsia de pele, conjuntiva do olho e de punção de medula, concluindo que o tecido cutâneo representa a principal reserva de *Leishmania infantum*, independentemente da presença de lesões ou outros sinais clínicos da doença. Mais recentemente, em uma revisão, Solano-Galego *et al.*, (2011) demonstraram que existem variações de sensibilidade entre a amostra escolhida e a técnica de PCR utilizada e verificaram que a PCR em tempo real é mais sensível em amostras de medula óssea, linfonodo, fígado, pele e conjuntiva, enquanto que a PCR convencional e “Nested PCR” são menos sensíveis quando utilizadas amostras de sangue e urina.

Vale ainda acrescentar que técnicas de diagnóstico como a PCR apresentam como desvantagem o custo e a dificuldade do uso em triagens de campo (KEENAN *et al.*, 1984; TAFURI *et al.*, 2001; TAFURI *et al.*, 2004).

Finalizando, apesar dos inúmeros testes de diagnóstico disponíveis para a LVC, o tema continua representando um desafio, pois não existe um único método capaz de obter sensibilidade e especificidade máximas, de forma a permitir um diagnóstico preciso das diversas formas de apresentação da doença (MS, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Assis *et al.*, (2008) acrescentaram que o discreto avanço no diagnóstico LV nas últimas décadas pode dever-se à complexidade biológica da infecção, bem como ao fato da LV ser uma doença negligenciada e portanto, com baixo lucro comercial, apesar de ser atraente às pesquisas.

Todas as observações reforçam a necessidade de cautela, bom senso e análise crítica multidisciplinar de todos os fatores que permitam o fechamento do diagnóstico da LVC, que deve ser uma conjunção de dados clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e de anamnese.

2.8 Tratamento e vacina da leishmaniose visceral canina

A literatura sobre o tratamento da LVC no Velho Mundo, alerta sobre o perigo potencial de geração e circulação de cepas do parasito resistentes às drogas usualmente utilizadas para o tratamento de seres humanos, tais como: o antimonial pentavalente, anfotericina B e a miltefosina (GRAMÍCCIA *et al.*, 1992; CARRIÓ & PORTÚS, 2002). Apesar do tratamento recuperar clinicamente o animal, com concomitante diminuição da carga parasitária e dos títulos de anticorpos circulantes, por meio dele ocorre apenas redução de sua capacidade infectante para o inseto transmissor e, ainda, as recidivas são frequentes, atingindo 75% dos casos no período de 2 anos após o tratamento (CAD. TÉC. VET. ZOOTECNIA, 2012). Dujardin *et al.*, (2008), fazem ressalvas para o tratamento de cães com miltefosina, recentemente lançada para uso veterinário nos países do Mediterrâneo (Portugal, Espanha, Itália, Grécia e Ilha de Chipre), e a possibilidade de que o parasito que infecta cães tratados com miltefosine apresente resistência e seja disseminado por meio da migração desses animais para os países em que esta droga vem sendo utilizada para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose humana, como Colômbia, Guatemala, Argentina, Venezuela, Paraguai, Equador e Honduras (GRAMÍCCIA *et al.*, 1992; ROUGIER *et al.*, 2008). O surgimento e disseminação de cepas resistentes de *Leishmania* como tem ocorrido em alguns países (SUNDAR *et al.*, 2000; SUNDAR, 2001) tem sido alertada em localidades nas quais o tratamento de cães é praticado (GRAMÍCCIA *et al.*, 1992), o qual pode ter caráter irreversível e conseqüências imprevisíveis.

No Brasil, o tratamento da LVC é um tema bastante polêmico e controverso. É defendido pela ANCLIVEPA (Associação Nacional dos Clínicos Veterinários de pequenos animais) e proibido pelo Ministério da Saúde. O tema vem sendo alvo de constantes discussões, apresentação de novos trabalhos científicos, ações judiciais e mobilizações que buscam conseguir autorizações e mudanças na legislação vigente para que os animais possam ser tratados e se evite a eutanásia. Em contrapartida, o Ministério da Saúde reitera sua posição de proibição do tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura

Pecuária e Abastecimento (MAPA) e apresenta argumentos para a tal conduta (SVS, 2009).

Em 2007, foi realizado em Brasília/DF o I Fórum de Discussões sobre o Tratamento da LVC, ocasião em que foram avaliados os diferentes aspectos da doença no intuito de se avaliar evidências sobre a eficácia do tratamento e o risco que os animais submetidos a este procedimento poderiam trazer à saúde humana. Como resultado do Fórum, foi elaborado um relatório final que contra indicou o tratamento de cães infectados e/ou doentes tendo em vista o risco para a saúde humana que tal conduta pode acarretar. Frente a esta conclusão e recomendação, o Ministério da Saúde em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou e publicou a portaria interministerial n. 1426, de 11 de julho de 2008, que "... proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA." Cabe ressaltar que a portaria regulamenta as normas sanitárias vigentes, cabendo destacar além do Decreto n. 51838 de 1963, a Lei n. 6259 de 1975, a Lei n. 6437 de 1977 e a Lei n. 8080 de 1990 (SVS, 2009).

Em 2009, após um Novo Fórum (II), não houve alterações quanto a legalização do tratamento de LVC. A recomendação deste fórum é de que seja mantida a proibição do tratamento da LVC pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme a Portaria Interministerial 1426/2008 que regulamenta o Decreto n. 51838 (1963) (SVS, 2009). Os estudos apresentados sugeriram que o tratamento da LVC poderia levar a melhoria transitória do quadro clínico-laboratorial do cão, redução dos níveis de anticorpos séricos contra o parasito, associados a uma possível redução (também transitória) na carga parasitária em alguns tecidos (MANNA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008). No entanto, nenhum desses parâmetros foi validado como marcador de infectividade para os flebotomíneos e os trabalhos sobre a infectividade para os vetores foram inconclusivos e apresentaram evidências de que animais tratados mantêm a capacidade de infectar esses insetos (MIRET *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008).

De acordo com a mesma portaria que proíbe o tratamento canino com drogas registradas no Ministério da Saúde ou não registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Portaria interministerial número 1426, de junho de 2008, o tratamento de animais infectados só pode ser feito

após realização de ensaios clínicos controlados, posteriormente à autorização do órgão competente (MAPA) e do Ministério da Saúde.

Entretanto, através do Acórdão 8268/2013, o Tribunal Regional Federal da terceira região declarou ilegal a portaria 1426/2008 que proíbe o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A apelação cível movida pela Organização-Não- Governamental (ONG) Sociedade de Proteção e Bem-Estar Animal Abrigo dos Bichos, foi considerada procedente pelo Tribunal Regional Federal, que justificou a ilegalidade da portaria por considerar que a mesma extrapola os limites tanto da legislação que regulamenta a garantia do livre exercício da profissão de Médico Veterinário, como das leis protetoras do meio ambiente, em especial, a da fauna. O Ministério da Saúde contestou a decisão do Tribunal Regional Federal junto ao Supremo Tribunal Federal pleiteando a manutenção da portaria 1426/2008.

O Tribunal Federal Regional da 3ª Região deferiu, parcialmente o pedido de suspensão da ilegalidade da portaria 1426/2008, sob alegação de proteção à saúde pública, desde que a eventual eutanásia canina a ser praticada deva ser precedida da realização de dois testes sorológicos (RIFI e ELISA) e também de criteriosa avaliação do médico veterinário pertencente aos quadros públicos. Portanto, voltou a ser vigorada a portaria 1426/2008, que proíbe o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Levando-se em conta as divergências entre opiniões e a necessidade de mais pesquisas sobre o tratamento canino, principalmente no que se refere à cura clínica e parasitológica, associado à polêmica da eutanásia, a existência de uma vacina canina plenamente aceita pela comunidade científica e adotada pelo Ministério da Saúde, a exemplo da vacina antirrábica, seria um grande avanço na prevenção e controle da LV. Infelizmente, esta não é a realidade atual, pelo menos, não em sua totalidade, cabendo algumas considerações a respeito de vacinas caninas. No Brasil, existem no mercado duas vacinas contra a LVC: a vacina Leishmune® e Leish-tec®. A primeira é composta pelo antígeno complexo glicoproteico ligante de fucose e manose (FML) de *Leishmania donovani*, presente na superfície da *Leishmania* durante todo o seu ciclo, e pelo adjuvante saponina QS21 (FORT DODGE, 2004). Segundo

Palatinik-De-Souza (2012) a vacina Leishmune® obteve licença definitiva do MAPA em outubro de 2001. A Leish-tec® é uma vacina recombinante que utiliza o antígeno A2, uma proteína específica do estágio amastigota de várias espécies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*), e tem como adjuvante também a saponina (HERTAPE CALLIER, 2009).

Em outubro de 2009, através de nota técnica de esclarecimento do MAPA foi publicado que as duas vacinas registradas neste ministério cumprem os requisitos técnicos de eficácia, vigentes no momento da concessão dos registros (2003 e 2007), porém o Ministério da Saúde ainda não recomenda o seu uso em saúde pública, pois ainda estão sendo realizados estudos para avaliar a utilização destes produtos para este fim (BRASIL, 2009b).

2.9 Controle

As principais medidas recomendadas no controle e prevenção da LV são o diagnóstico e tratamento dos casos humanos através do SUS (Sistema Único de Saúde), controle vetorial através de inseticidas de ação residual, saneamento básico, limpeza de áreas urbanas, eutanásia de cães infectados, uso de telas em canis, colocação de coleiras impregnadas com inseticida deltametrina a 4% nos animais e educação em saúde. O uso destas coleiras, indicadas inicialmente para o controle de pulgas e carrapatos pode auxiliar no controle da LV (MS, 2007). Segundo Reithinger *et al.*, (2004) o uso de coleiras reduz a taxa de infecção nos cães e diminui o tempo de vida dos flebotomíneos, reduzindo conseqüentemente, a propagação da doença.

Levando-se em conta a expansão da LV e as dificuldades no controle da doença, o Ministério da Saúde, através de medidas preconizadas no PCLV (Programa de Controle da Leishmaniose Visceral), tem dado importância a uma melhor definição de áreas de transmissão ou de risco para a doença, contemplando nas ações de vigilância os estados e municípios “silenciosos”, ou seja, aqueles sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, no intuito de prevenir e/ou minimizar a ocorrência da LV nestas áreas (MS, 2005).

Em relação à vigilância dos reservatórios caninos, cabe ressaltar a importância da notificação aos órgãos públicos de diagnósticos de LVC obtidos através de atendimentos em clínicas veterinárias particulares, ou mesmo que sejam apenas animais suspeitos. Tal procedimento é essencial para que se proceda uma investigação epidemiológica no local de origem dos mesmos e se realize uma contra-prova em laboratório de referência do MS ou mesmo outros testes de diagnóstico que se façam necessários. É igualmente importante o acompanhamento de animais com resultado de exame sorológico “indeterminado”, haja vista publicação onde foi observado que, em média, 80,7% dos animais com resultados iniciais “indeterminados” tornaram-se reativos na segunda coleta após 45 dias de intervalo da primeira, mostrando a necessidade de acompanhamento constante destes animais (CAD. TEC. VET. ZOOTECNIA, 2012).

Vários trabalhos mostram que a retirada de cães infectados reduz a incidência do LV humana. Segundo Borges *et al.*, (2009), ao se avaliar a presença do cão no domicílio como fator de risco, estatisticamente existe maior chance de se ter a LVH como doença ou infecção nos domicílios com presença dos animais. Estudos mostraram que a eliminação de cães infectados juntamente com a borrifação intradomiciliar causaram uma diminuição em 80% da incidência da infecção por *L. chagasi*. A remoção de cães infectados estaria reduzindo a disponibilidade de fontes de infecção para flebotomíneos, limitando a capacidade destes vetores em transmitir o parasito para humanos (COSTA; TAPETY; WERNECK; 2007). No entanto, Dietze *et al.*, (1997) realizaram estudo no estado do Espírito Santo, para avaliar o impacto da retirada de cães infectados sobre a soropositividade humana e constataram não ter havido diferenças em áreas onde os cães foram retirados e áreas onde os animais permaneceram.

A infecção canina é considerada importante por várias razões, dentre as quais se destacam: o convívio do animal em estreita aproximação com o homem; o fato deste servir de repasto para o vetor, atraindo-o para perto do homem; alta densidade populacional da espécie, aliada à susceptibilidade que apresenta à *L. chagasi*, além do grande número de cães assintomáticos com intenso parasitismo cutâneo (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1997).

Considerando-se que as leishmanioses apresentam maiores prevalências em áreas menos favorecidas sócio-economicamente e com carências sanitárias, é importante frisar que políticas públicas favoráveis à diminuição destas desigualdades, referentes a padrões de educação, condições de habitação, distribuição de renda, grau de nutrição, cobertura de saneamento básico e equilíbrio do meio ambiente são importantes para que as ações de controle contemplem todas as vertentes do processo saúde-doença. Segundo Alvar *et al.*, (2006) é alta a correlação entre a ocorrência da LV e a condição sócio-econômica da população.

A complexidade na luta contra as infecções leishmanióticas explica-se pela grande diversidade de agentes etiológicos, pelo grande número de espécies de flebotomíneos que podem ser vetores e por mais de uma centena de espécies de animais que podem se reservatórios (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1990). Apenas quando for obtido melhor entendimento da diversidade genética das espécies de *Leishmania* e dos reservatórios envolvidos no ciclo enzoótico de cada uma delas, será possível avaliar qual método (ou métodos) de controle mais eficaz (ou eficazes) (SHAW, 2007). Também deve se considerar que as circunstâncias da transmissão das leishmanioses são continuamente alteradas em relação aos fatores ambientais e do comportamento humano (GRAMÍCCIA & GRADONI, 2005).

O mais importante no controle das leishmanioses é que todas as ações sejam realizadas de forma integrada e simultânea, envolvendo profissionais de formações multidisciplinares, tenham continuidade, e, principalmente, sejam associadas a um trabalho de educação em saúde junto à população, para que a mesma entenda o porquê de todos os procedimentos e seja induzida a colaborar. Um exemplo clássico da falta de integração das ações é a retirada do ambiente de cães sororreagentes e a pronta reposição por parte da população. BRAGA *et al.*, (1988) relata em seu estudo a grande velocidade de reposição da população canina.

Em função da complexidade dos fatores determinantes e a diversidade de formas de ocorrência das leishmanioses, deve-se ressaltar como importante medida de controle, a realização de constantes estudos para que se conheça as particularidades da doença em cada região. Assim, este trabalho visa o

inquérito da LVC em Juiz de Fora-MG e o estudo dos possíveis fatores de risco associados à doença, no intuito de esclarecer a real situação desta zoonose no município.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

- Realizar o inquérito sorológico da LVC no município de Juiz de Fora e pesquisar os fatores de risco associados à doença.

3.2 Objetivos específicos:

- Investigar a ocorrência da LVC através do teste imunocromatográfico “TR DPP® KIT” (FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil);
- Investigar a ocorrência do LVC através da técnica de ELISA (Kit “EIE-leishmaniose visceral canina®”, FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil);
- Investigar a ocorrência da LVC através da técnica de ELISA *in house*, utilizando antígenos obtidos de extrato bruto de promastigota de *L. infantum*;
- Realizar avaliações clínicas, semiológicas e epidemiológicas dos animais;
- Estabelecer relações entre a sorologia positiva para a LVC e a expressão de sinais clínicos dos cães;
- Estabelecer relações entre sorologia positiva para LVC e características zootécnicas exteriores dos animais;
- Estabelecer relações entre sorologia positiva para LVC e a origem dos animais;
- Estabelecer os fatores de risco associados à LVC no município, entre os quais serão analisados a expressão dos sinais clínicos dos animais, a origem e características zootécnicas exteriores (sexo, grupo racial, grupo etário, tipo de pelagem e porte físico);
- Gerar dados epidemiológicos que servirão de balizamento para estratégias de prevenção e controle do calazar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Este trabalho foi realizado no município de Juiz de Fora, o qual segundo o Anuário Estatístico do Centro de Pesquisas Sociais da Universidade Federal de Juiz de Fora (2009), se posiciona geograficamente no Sudeste do Estado de Minas Gerais, mesorregião da Zona da Mata Mineira, estando distante 272 Km de Belo Horizonte, 184 Km do Rio de Janeiro e 506 Km de São Paulo. Ocupa área de 1.429.875 Km² (Figura 5).



Figura 5 - Localização espacial do município de Juiz de Fora na região Sudeste. Fonte: IBGE

Os animais foram oriundos do canil municipal de Juiz de Fora e diversas ONGs (Organizações-Não-Governamentais), consideradas como “sociedades

protetoras de animais”. A distribuição espacial destas áreas pode ser verificada na Figura 6.

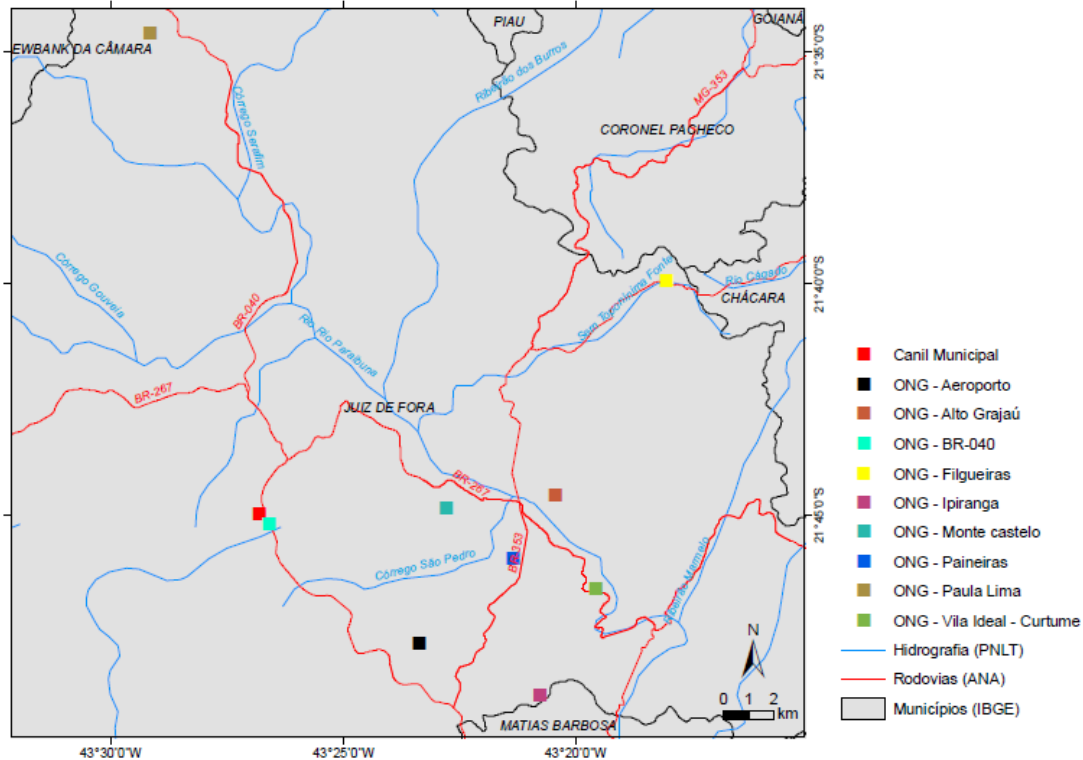


Figura 6- Localização espacial do canil municipal e das ONGs em Juiz de Fora. Fonte: NUPEP/ICB/UFJF.

O canil municipal (Figura 7) localiza-se na zona norte do município, no Bairro São Damião 2. Abriga animais recolhidos dentro de todo o perímetro da cidade e possui como critérios para recolhimento a demanda espontânea oriunda da população, privilegiando fêmeas, principalmente quando no cio. Recolhe também animais com comportamento agressivo, em situações de risco de acidente de trânsito, aqueles que andam em grupos e os que de alguma forma estejam causando incômodos à população. Esporadicamente, são albergados animais por determinação judicial que foram desalojados por estarem em condições de falta de higiene e/ou causando problemas aos vizinhos. As rotas percorridas pela “carrocinha” têm coberto praticamente todas

as áreas do município, contemplando desde as regiões mais favorecidas sócio-economicamente, até as áreas mais carentes da cidade.



Figura 7- Fotos ilustrativas do Canil Municipal. Fonte: do autor.

As ONGs foram escolhidas de maneira aleatória em diversas regiões do município, estando localizadas nos bairros Alto Grajaú, Aeroporto, Filgueiras, Ipiranga, Monte Castelo, Paineiras, Vila Ideal, às margens da BR 040 e no distrito de Paula Lima. Em algumas ONGs todos os animais foram pesquisados e em outras apenas uma amostra foi trabalhada. As Figuras 8 e 9 mostram imagens de algumas ONGs.

A escolha dos animais, tanto no canil quanto nas ONGs, foi feita de maneira aleatória, não sendo privilegiados nenhum critério de raça, sexo, idade, pelagem, tamanho, características clínicas, origem ou quaisquer outros.



Figura 8- Foto ilustrativa da ONG Paula Lima. Fonte: do autor.



Figura 9- Fotos ilustrativas da ONG Br 040. Fonte: do autor.

4.2 População Amostral

Em função de não se ter um histórico de censo canino no município, não existem dados oficiais sobre o número de cães da cidade. Assim, a amostra investigada foi calculada de acordo com os seguintes parâmetros: com um nível de confiança 95%, para uma população finita de 50.000 cães, uma proporção esperada de 5%, admitindo um erro absoluto de 1,6% (erro relativo de > 0,32%), a amostra calculada seria de 703 cães. Assim, optou-se por uma amostragem maior, que foi de 781 animais.

4.3 Coleta de material biológico

Os trabalhos de coleta de sangue, colocação de identificação e exames clínicos/ semiológicos de todos os animais foram realizados entre o período de 07/11/2011 a 15/08/2012.

Para a coleta do material biológico, os animais foram imobilizados através de técnicas de contenção, ocasião em que tiveram suas bocas amarradas com cordas ou envolvidas por focinheiras. Foram coletados pelo menos 08 ml de sangue venoso de cada animal, sendo realizado o procedimento através de punção de veia cefálica, braquial ou jugular, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis (Figura 10). O sangue foi distribuído em dois tubos: um destes à vácuo contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético-EDTA; (marca Labor Import com K3 EDTA, não siliconizado) e o outro tubo, sem EDTA (marca Labor Import). As amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) em caixas térmicas com gelo reciclável e termômetro de cabo extensor, durante todo o período de trabalho de coleta e foram transportadas à mesma temperatura para o laboratório de Parasitologia, Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.



Figura 10- Venopunção braquial. Fonte: do autor.

No laboratório, todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rpm durante 20 minutos (Centrífuga Thermo Electron Corporation CR 312). As amostras acondicionadas em tubos com anticoagulante EDTA foram destinadas à obtenção do plasma, “papa de leucócitos” e eritrócitos. Após a centrifugação houve a formação de três camadas no tubo: a mais superficial representada pelo plasma; a intermediária, representada pela “papa de leucócitos” e a mais interna sendo a dos eritrócitos. A “papa de leucócitos” e o plasma foram separados e acondicionados em microtubos. No recipiente em que foi armazenada a “papa de leucócitos” foi adicionada solução de tris EDTA (1:1). O objetivo da obtenção deste tipo de amostra biológica foi a realização de futuros exames de Biologia Molecular. A obtenção do plasma objetivou a realização futura de testes diagnósticos. Todas as amostras foram etiquetadas e conservadas em freezer à temperatura de -20°C .

Nos tubos sem EDTA, foram retirados os fluidos superficiais que correspondem aos soros, os quais foram acondicionados em microtubos, etiquetados e congelados em freezer à temperatura de -20°C , para posterior uso.

4.4 Identificação dos animais

No intuito de marcar e criar referências em cada animal que forneceu material biológico para pesquisa, a identificação destes foi realizada através de quatro procedimentos: inserção de microchips no tecido subcutâneo, colocação de coleiras, criação de resenhas e fotos.

Em relação à inserção do microchip (transponder) no tecido subcutâneo do animal, foi utilizado aplicador e o dispositivo (Animall® Tag- São Carlos, SP) colocado no dorso, na região interescapular – localização padrão para inserção de microchips em cães (Figura 11), seguindo instruções do fabricante. Em relação à colocação de coleiras, as mesmas foram artesanais, confeccionadas com tecidos de algodão e placas de alumínio marcadas com numeração correspondente a cada animal (Figura 12). A confecção de resenha (apêndice A) de cada cão, consistiu no desenho deste, onde privilegiou-se características físicas exteriores (zootécnicas) importantes na descrição e identificação dos animais, tais como, cor, tipo de pelagem, porte físico, escore corporal, formato de orelha, disposição de cauda, dentre outras características e particularidades que favoreçam a individualização de cada cão. O último procedimento foi a realização de pelo menos duas fotos dos animais em ângulos diferentes.



Figura 11- Fotos ilustrativas dos dispositivos utilizados na microchipagem e dos procedimentos adotados- (A), o microchip (B), a colocação do microchip (C) e a leitura de localização (D).
Fonte: do autor



Figura 12- Foto ilustrativa da coleira artesanal. Fonte: do autor

4.5 Avaliações epidemiológicas, clínicas e semiológicas dos animais

No momento da captura, cada animal foi examinado clínica e semiologicamente (Figura 13), no intuito de se avaliar o estado geral de seu organismo, considerando-se sinais e sintomas. Para cada cão foi preenchida uma ficha onde privilegiou-se avaliar as alterações clínicas mais comuns a cães infectados por *Leishmania*, (apêndice B). Os parâmetros semiológicos também foram anotados em uma ficha (apêndice C). No caso dos animais possuírem donos e/ou algum histórico, foi preenchido também um questionário epidemiológico (apêndice D).



Figura 13 – Fotos ilustrativas dos exames clínico e semiológico dos animais. Fonte: do autor.

Os animais foram submetidos a exame clínico minucioso, onde foram pesquisadas as seguintes alterações clínicas: onicogrifose, ceratoconjuntivite, alterações de pele e pelos, edema de patas, paresia de membros posteriores, hemorragias, hepatomegalia, esplenomegalia, alterações de linfonodos, coloração de mucosas, diarreia, coriza e quaisquer outras que no momento da avaliação fossem consideradas relevantes. No caso das alterações estarem presentes, foram classificadas em leves, moderadas e graves.

Na semiologia foram avaliados parâmetros de temperatura, palpação, percussão, auscultação, grau de hidratação e estado geral dos animais. Quando presentes, as alterações foram especificadas e quantificadas.

Em função da necessidade de material biológico para a padronização do teste ELISA UFOP, os primeiros 42 animais oriundos do canil municipal não foram submetidos aos exames clínicos e semiológicos. Nestes animais foram realizadas coletas de sangue e avaliações de características físicas exteriores (Zootécnicas).

Clinicamente, os animais foram classificados segundo normatização de dois autores:

- Mancianti e colaboradores (1988): classificam os cães clinicamente nos seguintes grupos: assintomáticos, aqueles que apresentam ausência de sinais e sintomas sugestivos de infecção por *Leishmania sp*; oligossintomáticos, aqueles que apresentam adenopatia linfóide, leve diminuição no peso e/ou pelos opacos e; sintomáticos, aqueles que apresentam todos ou alguns dos sinais severos (graves) da doença, i.e. alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras), onicogrifose, ceratoconjuntivite, rigidez de membros posteriores, etc.

- Quinnell e colaboradores (2003): foram consideradas as seguintes alterações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral, sendo alopecia, dermatite, úlcera, conjuntivite, onicogrifose e linfadenopatia, totalizando 06 itens a serem contemplados. Cada um destes foram quantificados e pontuados em AUSENTE, recebendo nota zero; LEVE, recebendo nota um; MODERADO, recebendo nota 2; e GRAVE, recebendo nota 3. Os animais foram classificados segundo uma escala que levou em conta o somatório de pontos atribuídos,

sendo classificados em ASSINTOMÁTICOS aqueles com pontuação entre 0 e 2, OLIGOSSINTOMÁTICOS os que tiveram pontuação entre 3 e 6 e POLISSINTOMÁTICOS os animais que receberam entre 7 e 18 pontos.

4.6 Parâmetros utilizados na classificação das características físicas e exteriores dos animais (zootécnicas)

- **Faixa etária:** Na classificação da faixa etária dos animais, foram considerados filhotes, aqueles com idade até 01 ano. Na categoria de adultos foram incluídos aqueles com mais de um ano até o limite de 10 anos de idade. Finalmente, foram considerados idosos os animais com mais de 10 anos de idade.

- **Pelagem:** As pelagens dos animais foram classificadas em curtas, médias e longas, utilizando-se dos critérios abaixo discriminados:

Curtas – são aquelas nas quais os pelos usualmente crescem pouco, de forma que fiquem rentes à pele. Para esta classificação foram utilizados como referência as pelagens das raças Pinscher, Fox Paulistinha, Bull Terrier, Chihuahua, Dobermann e Boxer;

Médias – são aquelas pelagens intermediárias, nas quais os pelos crescem mais que aqueles que ficam rentes à pele, porém, não chegam a um tamanho em que se necessite da realização de tosa. São pelagens típicas das raças Pastor Alemão, Golden Retriever e Labrador;

Longas – são aquelas nas quais os pelos crescem muito, sendo que em algumas raças chegam a cobrir os olhos, orifícios, vindo a se arrastarem ao chão, embolarem, fazendo-se necessária a tosa periódica para a manutenção da saúde e bem-estar do animal e até mesmo por questões estéticas. Para esta categoria, utilizou-se como referências as pelagens das raças Lhasa Apso, Poodle, Pequinês e Shih tzu.

- **Raça:** Na classificação do grupo racial, os animais foram enquadrados de acordo com as características e padrões estabelecidos de cada raça. Aqueles animais que não estavam rigorosamente dentro de um padrão racial pré-estabelecido foram classificados como “Sem raça definida” (SRD).

- **Porte físico:** Para a classificação de porte físico foram considerados a altura da cernelha e comprimento do animal, utilizando-se como referência o padrão dessas características típicas em determinadas raças (animal adulto), sendo agrupados nas categorias: porte pequeno, médio e grande. Para dirimir qualquer dúvida, foi considerado também o peso do animal. Baseando-se em tais critérios, os animais foram agrupados em três categorias, a saber:

Pequeno – Animais com altura e comprimento semelhantes aos da raça Pinscher, Chihuahua, Lhasa Apso, Pequinês, Fox Paulistinha, Poodle Toy, dentre outras com porte semelhante. Quando o comprimento ou a altura dos animais não foi compatível com o do padrão pré-estabelecido para o “Porte pequeno”, foram considerados como de porte pequeno aqueles animais com peso até 10 quilos;

Médio – Animais com altura e comprimento semelhante aos das raças Setter Irlandês, Cooker Spaniel Inglês, dentre outras. Quando o comprimento ou altura não foi compatível com o do padrão pré-estabelecido para “Porte Médio”, foram considerados como de porte médio aqueles animais com peso corporal maior que 10 quilos e até 25 quilos. Um exemplo clássico desta situação é o da raça Basset Hound, que possui altura de “porte pequeno” e comprimento de “porte médio”. Para definição de qual categoria o animal pertenceria, consideraria-se o peso corporal, que o colocaria no grupo de porte médio.

Grande – Animais com altura e comprimento semelhantes aos das raças Pastor Alemão, Rottweiler, Dogue Alemão, Fila Brasileiro, São Bernardo, Coolie, dentre outros com porte semelhante. Quando o comprimento ou altura não foi compatível com o do padrão pré-estabelecido para “porte grande”, foram considerados como de porte grande, aqueles animais com peso corporal acima de 25 quilos.

4.7 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico da LVC foi feito utilizando-se de várias técnicas: inicialmente foi realizado o teste imunocromatográfico “TR DPP® KIT” (FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil), em seguida, foi feito o ELISA- “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, utilizando o Kit “EIE- Leishmaniose visceral canina®” (FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil), e finalmente, outro ELISA com antígenos totais de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Alexandre Reis.

O Teste ELISA da Bio-Manguinhos, em consonância com o Ministério da Saúde, foi considerado o resultado confirmatório e seus resultados foram comparados com os dos outros dois testes utilizados, ELISA UFOP e DPP.

Todos os KITS da Bio-Manguinhos foram doados gentilmente pelo Prof. Dr. Renato Porrozzi, do laboratório de pesquisas em leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, em parceria com Edmilson D. Silva, do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

4.7.1 Teste imunocromatográfico “TR DPP® Kit”, (FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil)

Este teste é do tipo imunocromatográfico rápido e, de acordo com o fabricante, emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos para *Leishmania*. Em sequência, reage com antígenos recombinantes de *Leishmania* ligados a uma membrana (fase sólida). O antígeno utilizado é composto pela proteína recombinante denominada K28, composta por fragmentos de antígenos K9, K26, e K39 do complexo *Leishmania donovani* (comunicação pessoal do Professor Dr. Renato Porrozzi-FIOCRUZ). Segue-se a seguinte metodologia: 5µl de soro é colocado no poço 1 do cassete (Amostra + Tampão), seguida pela adição de 2 gotas do

tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Aguarda-se 5 minutos, período em que ocorrerá a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte do teste. Em seguida, adiciona-se 4 gotas de tampão de corrida no poço 2. O conjugado se liga aos anticorpos específicos para *Leishmania*, produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para *Leishmania* a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes. Os resultados podem ser interpretados visualmente ou com a ajuda de um leitor DPP®, 10 minutos após a adição tampão no poço 2.

Um resultado NÃO REAGENTE é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área do TESTE (T). Esse resultado sugere a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra, mas não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania*.

A detecção de duas linhas (roxa/rosa): uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T) indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área do TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste.

Um teste REAGENTE significa que anticorpos para *Leishmania* foram detectados. Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não da linha da área do TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE (C) o teste deve ser considerado inválido, não podendo ser interpretado. O teste permite o diagnóstico num prazo de 15-20 minutos. Seguem abaixo fotos ilustrativas do teste DPP (Figura 14).

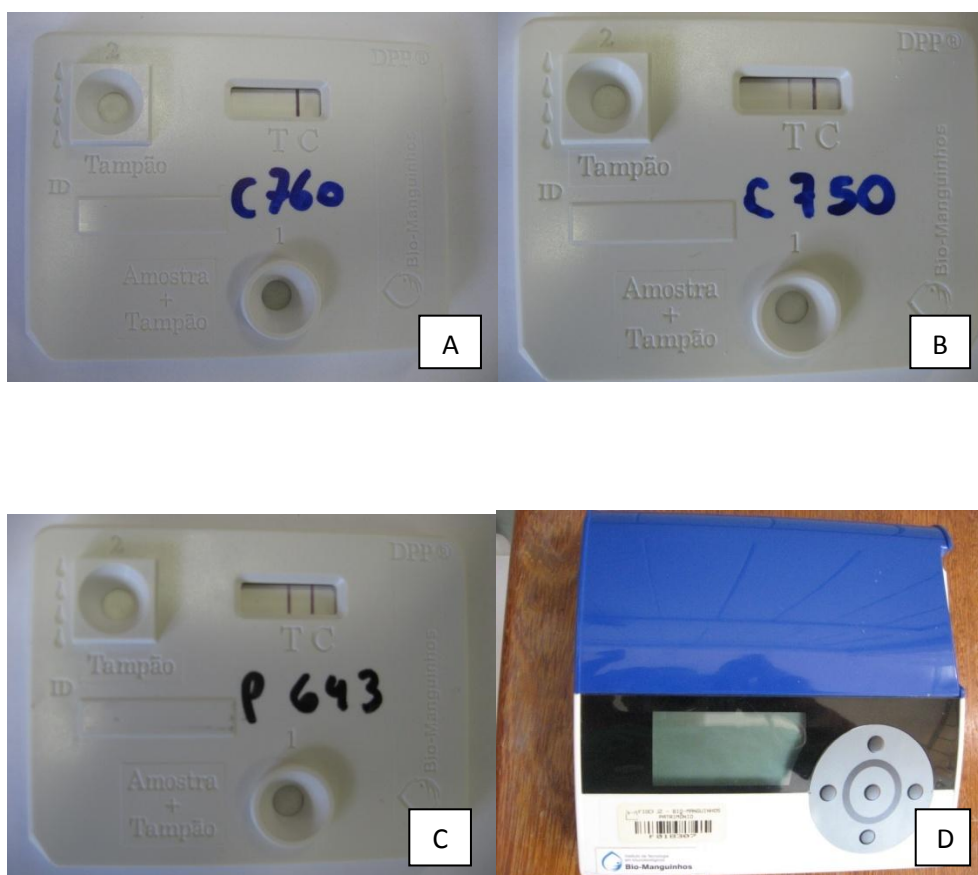


Figura 14 – Fotos ilustrativas dos suportes (cassetes) utilizados no teste DPP, destacando resultado negativo e positivos de diferentes intensidades, além do leitor óptico. A - resultado negativo; B – resultado positivo (intensidade fraca); C – resultado positivo (intensidade forte); D – leitor óptico do teste. Fonte: do autor.

Neste trabalho, foram considerados reativos os cassetes que tiveram indicação no leitor óptico como positivos, sendo mensuradas as intensidades das reações. Portanto, o aparelho foi considerado o dispositivo confirmatório do teste.

4.7.2 ELISA (Kit "EIE- Leishmaniose visceral canina®", FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil).

O protocolo foi utilizado como descrito pelo fabricante. O teste foi realizado em placas de 96 poços previamente sensibilizada com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like*. Preparou-se a solução do diluente da amostra/conjugado utilizando-se os seguintes componentes: diluente da amostra/conjugado (5 x), lecitina de leite e água destilada. Os soros controles e os das amostras foram diluídos na solução do diluente da amostra/conjugado na concentração de 1:100 e homogeneizados. Em seguida, transferiu-se 100µl da solução de cada soro para placa previamente sensibilizada. Em cada placa foram utilizados dois soros controles positivos, três soros controles negativos, dois poços sem soro para controle de conjugado e as amostras de soro a serem analisadas. A placa foi selada com folha adesiva e incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a folha adesiva foi descolada e a placa foi lavada por 6 vezes com solução de tampão de lavagem (20 x), sendo utilizado por vez, 200µl/por orifício (poço), sendo aguardado tempo de 30 a 60 segundos entre cada lavagem. Em seguida dilui-se o conjugado no diluente da amostra/conjugado diluído, que foi preparado anteriormente. Após homogeneização, distribuiu-se 100µl da diluição do conjugado em cada orifício (poço). Em seguida a placa foi selada com folha adesiva e incubada a 37°C por 30 minutos. Passado este tempo, descolou-se a folha adesiva e a placa foi novamente lavada por 6 vezes com tampão de lavagem (20 x), sendo depositado em cada orifício (poço) 200µl.

Em seguida preparou-se a solução do substrato que foi composta por diluente do substrato, cromógeno (TMB) e o substrato (H₂O₂). Esta solução foi preparada em frasco escuro (ao abrigo da luz). Este preparo foi feito alguns minutos antes do uso. Em seguida, distribuiu-se 100µl da solução do substrato em todos os orifícios (poços), rapidamente. A placa foi deixada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Em seguida, a reação foi bloqueada utilizando-se 50µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios (poços). Em seguida foi feita a leitura da placa. Esta foi feita em

espectrofotômetro para microplacas equipado com filtro de 450nm. São mostradas abaixo fotos ilustrativas do teste ELISA (Figura 15).

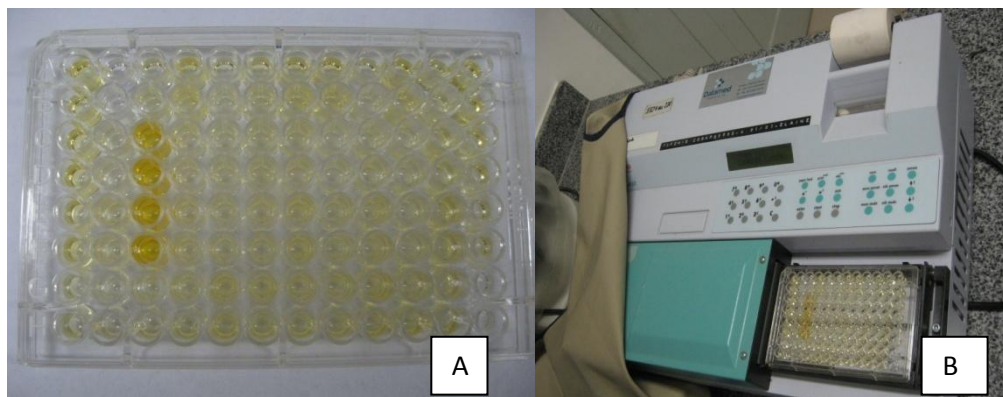


Figura 15 – Fotos ilustrativas do teste ELISA, mostrando a placa padrão com 96 poços (A), e leitor de placas (B). Fontes: do autor

O *cut-off* foi calculado a partir da média das densidades ópticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso fosse encontrada alguma DO fora da faixa de validação do teste, este seria descartado. Assim, de acordo com o fabricante, foi considerado teste válido quando os valores da densidade óptica estiveram nas seguintes faixas: CONTROLE POSITIVO: $\geq 0,500$ de DO; CONTROLE NEGATIVO: $\geq 0,050 \leq 0,12$ de DO. O *cut-off* foi calculado através da seguinte fórmula: $CO = XCN \times 2$, onde: XCN= média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo, DO= densidade óptica, CN= controle negativo.

Foram consideradas amostras REAGENTES as que apresentaram densidade óptica igual ou superior ao *cut-off*. As NÃO REAGENTES foram aquelas com densidade óptica inferior ao *cut-off* e as INDETERMINADAS, aquelas que apresentaram DO entre o *cut-off* e "FAIXA CINZA". Esta faixa foi calculada multiplicando-se o valor do *cut-off* por 1,2. Todas as amostras que apresentaram valores de densidade óptica na "FAIXA CINZA" foram repetidas em novo exame. Se em novo exame mantiverem-se na mesma faixa, recomenda-se a utilização de outras metodologias para a confirmação desse resultado, que deverá ser considerado como INDETERMINADO. O controle do

conjugado (SS) não poderá apresentar valores superiores aos da densidade óptica dos controles negativos multiplicados por 1,5.

Todas as amostras consideradas reativas tiveram pelo menos dois resultados iguais.

4.7.3 ELISA “in house”, com antígenos provenientes da UFOP (ELISA UFOP)

Foi realizado segundo proposto por Voller e colaboradores (1979) e Coura-Vital (2011), com pequenas modificações. O antígeno solúvel utilizado foi de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/Br/1972/BH46), cedido pelo professor Dr. Alexandre Reis (UFOP). O mesmo foi transportado sob refrigeração para o laboratório de Parasitologia, Imunologia e Microbiologia da UFJF e armazenado à temperatura de - 20°C, até o momento do uso.

Placas de poliestireno (96 poços, fundo chato, marca Corning/Costar), foram sensibilizadas com 0,5µg de antígenos por poço diluído em tampão de ligação no volume de 100µl por poço. As placas foram vedadas e deixadas na geladeira por 16 horas à temperatura de 4°C. Em seguida, foi retirada a vedação e procedeu-se a lavagem das placas por 4 vezes com tampão de lavagem, usando-se 200µl por poço. No passo seguinte, as placas foram bloqueadas com 150µl de tampão de bloqueio por poço. Na sequência, foram colocadas em câmara úmida à temperatura de 37°C por um período de 1 hora. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem utilizando-se 200µl por poço, repetindo-se o procedimento por 4 vezes. Procedeu-se a diluição da amostra de soro a 1:80 em solução de incubação. A solução de tampão de incubação foi composta por 30 ml de PBS + 0,075 g de molico e 15µl de tween 20. Foi adicionado 3µl de soro de cada amostra e 247 µl de tampão de incubação (1:80). Então, 100µl das diluições foram colocadas em cada poço e as placas foram deixadas à temperatura de 37°C por 30 minutos. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem, utilizando-se 200µl por orifício em 4 oportunidades, em sequência. Foi adicionado conjugado peroxidase anti-igG total de cão (Bethyl laboraytores, inc

Montgomery, Texas, EUA) na diluição de 1:8000 (1µl de ant-igG + 8000µl de tampão de incubação). Foi adicionado em cada poço 100µl da solução. Posteriormente, as placas foram incubadas pelo período de 30 minutos à temperatura de 37°C. As placas foram lavadas com o mesmo tampão de lavagem, depositando-se 200µl por orifício, repetindo-se o procedimento por 5 vezes. Posteriormente, foi adicionado 100µl da solução do substrato, composta por 8 ml de citrato de sódio 1X + 4 ml de ácido cítrico 1X + 12 mg de OPD + 48µl de H₂O₂. Logo após um período de 1 a 2 minutos, as reações foram interrompidas com ácido sulfúrico (1:20). As formações do complexo antígeno-anticorpo foram reveladas através de leitura ótica em leitor de ELISA a 492 nm (Multiskan Ex-Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Para cada placa, o ponto de corte ("*Cut-off*") foi estabelecido a partir da média das absorvâncias de 7 soros de cães não infectados, procedentes de Juiz de Fora, acrescido de 2 desvios-padrões. Os testes diagnósticos utilizados na escolha destes animais foram o ELISA "EIE-Leishmaniose visceral canina®" (FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil), Imunocromatográfico "TR DPP® Kit" (FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, RJ, Brasil), além da PCR em tempo real e convencional.

Os soros controle positivos foram cedidos pelo professor Dr. Alexandre Reis (UFOP). Foram utilizados sete controles negativos e dois controles positivos. Para o controle dos conjugados foram utilizados 2 poços de cada placa, sendo adicionados 100µl de tampão de incubação em cada um desses, sem a ação dos conjugados. Todas as amostras de soro foram utilizadas em duplicata.

4.8 Análise Estatística dos dados

4.8.1 Delineamento do estudo

Os resultados de positividade dos testes sorológicos foram utilizados para construção de uma proporção de positividade (estudo transversal ou prevalência). Adicionalmente, foram realizadas análises pareadas utilizando vários testes diagnósticos (DPP, ELISA-BIO e ELISA UFOP), tendo em vista o diagnóstico da LVC. A proporção de concordância dos testes DPP e ELISA UFOP em relação ao ELISA Bio-Manguinhos, considerado o teste de diagnóstico confirmatório, de acordo com o Ministério da Saúde, foi avaliada e definido um intervalo de confiança de 95%. Finalmente, foram realizados estudos analíticos para avaliar fatores associados à positividade no ELISA Bio-Manguinhos.

4.8.2 Variáveis do modelo univariado e multivariado para positividade do ELISA Bio-Manguinhos.

Como variável resposta para os modelos explicativos (análises uni e multivariadas) foi considerado o resultado do ELISA Bio-Manguinhos (diagnóstico confirmatório). Como possíveis explicativas foram consideradas as classificações clínicas por Quinnell *et al.*, (2003) e Mancianti *et al.*, (1988) o sexo, o tipo de pelagem, o porte físico, a faixa etária, o grupo racial e a origem (Canil e ONG).

4.8.3 Análises estatísticas

Foram realizadas análises da concordância entre o ELISA-UFOP e DPP com o ELISA Bio-Manguinhos (considerado como “padrão ouro”), utilizando-se o programa Open Epi. Foram estimadas as prevalências de animais positivos nos três testes empregados no trabalho e os respectivos intervalos de confiança de 95% pelo Epi Info.

Procedeu-se análises de regressão logística univariadas e multivariadas para avaliar possíveis variáveis explicativas para a positividade ao ELISA Bio-Manguinhos, utilizando o Epi Info. O nível de significância considerado foi de 0,05.

As variáveis que apresentaram $p < 0,20$ nas análises univariadas foram consideradas num modelo multivariado para avaliar o efeito independente de cada uma delas. Foi utilizado o método “backward” na construção do modelo multivariado final.

O software Epi Info foi utilizado para armazenamento e gerenciamento dos dados.

4.9 Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEEA no. 03/2010, CEEA 063/11), como disposto no Apêndice F.

5 RESULTADOS

Parte deste trabalho já foi aceita para publicação na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Apêndice G).

5.1 Características da população amostral

A tabela 1 mostra a procedência da população amostral utilizada no estudo. Como pode ser observado, a amostra dos cães pesquisados foi composta por 781 animais, sendo que a maioria, 459 cães (58,77%) foi oriunda do Canil Municipal e 322 (41,23%) foram procedentes de ONGs. Dentre os procedentes das ONGs, a maioria veio da Br-040, com percentual de 23,95% e as demais entidades tiveram representatividade abaixo de 10% (Tabela 1).

Em relação às ONGs, um total de nove Sociedades Protetoras de Animais fizeram parte deste estudo, nas quais oito destas estão localizadas na zona urbana e uma na zona rural. A maior parte dos animais foi procedente da BR-040 (58,07%); seguida de Paula Lima (12,42%); Bairro Paineiras (12,11%); Bairro Vila Ideal (5,90%), Bairro Filgueiras (3,11%), Bairro Ipiranga (3,11%), Bairro Monte Castelo (2,80%), Bairro Aeroporto (1,86%) e Bairro Alto Grajaú (0,62%).

Tabela 1- Procedência da população amostral (n=781).

	Localização	Coordenadas geográficas	Altitude (m)	N	%
Canil Municipal	urbano	21°44' 59,8" S 43°26' 49,5" O	705	459	58,77
ONGs					

Br-040	urbano	21°45'38,7" S 43°44'38,6" O	800	187	23,95
Bairro Paineiras	urbano	21°45'57,2" S 43°21'21,4" O	788	39	4,99
Bairro Vila Ideal	urbano	21°46'36,9" S 43°19'35,0" O	666	19	2,43
Bairro Filgueiras	urbano	21°39'58,2" S 43°18'03,9" O	805	10	1,28
Bairro Ipiranga	urbano	21°48'54,3" S 43°20'46,9" O	815	10	1,28
Bairro Monte Castelo	urbano	21°44'52,0" S 43°22'47,9" O	815	09	1,15
Bairro Aeroporto	urbano	21°47'49,0" S 43°23'23,3" O	856	06	0,77
Bairro Alto Grajaú	urbano	21°44'35,1" S 43°20'26,7" O	839	02	0,26
Paula Lima	Rural	21°34'34,9" S 43°29'10,5" O	716	40	5,12

Dentre as características físicas exteriores dos animais (tabela 2), foram abordados os seguintes parâmetros: sexo, grupo etário, tipo de pelagem, porte físico e grupo racial. Dentre os 781 animais pesquisados, 511 foram do sexo feminino e 270 do sexo masculino, o que representou 65,43% e 34,57% do total da amostra, respectivamente. Em relação ao grupo etário, 637 animais (81,56%) foram considerados como adultos, 104 animais (13,32%) como

idosos e 40 animais (5,12%) como filhotes. Quando pesquisados os tipos de pelagem dos animais, foram encontrados 460 cães (58,9%) com pelagem curta, 167 cães (21,38%) com pelagem média e 154 (19,72%) com pelagem longa. No estudo do porte físico dos animais foram encontrados 454 cães (58%) de porte médio, 184 cães (23,43%) de porte pequeno e 145 cães (18,57%) de porte grande. Classificando-se os cães quanto aos grupos raciais, 681 animais (87,19%) foram considerados como “Sem raça definida” (SRD), 35 animais (4,48%) foram de raça Poodle, 14 animais (1,79%) foram da raça Pastor Alemão, 11 (1,41%) foram da raça Labrador, 11 animais foram da raça Pit Bull (1,41%) e o restante foram de várias outras raças que apresentaram menores expressões numérica e percentual, estando descritos na tabela 2. Como pode ser observado, a maioria dos animais componentes da amostra foram cadelas adultas, sem raça definida, de porte médio e pelagem curta.

Tabela 2- Classificação da população amostral quanto às características físicas exteriores (n= 781).

		n	%
Sexo	Masculino	270	34,57
	Feminino	511	65,43
Tipo de pelagem	Curta	460	58,9
	Média	167	21,38
	Longa	154	19,72
Porte físico	Pequeno	183	23,43
	Médio	454	58,00
	Grande	145	18,57
Grupo etário	Filhote	40	5.12

	Adulto	637	81,56
	Idoso	104	13,32
Grupo racial	SRD (Sem raça definida)	681	87,19
	Poodle	35	4,48
	Pastor alemão	14	1,79
	Labrador	11	1,41
	Pit bull	11	1,41
	Rottweiler	7	0,89
	Dachshund	5	0,64
	Pinscher	4	0,51
	Lhasa apso	3	0,38
	Husky siberiano	2	0,26
	Old english sheepdog	1	0,13
	Golden retriever	1	0,13
	Boxer	1	0,13
	Yorkshire	1	0,13
	Fila brasileiro	1	0,13
	Fox paulistinha	1	0,13
	Weimaraner	1	0,13
	Beagle	1	0,13

Em relação aos sinais clínicos e semiológicos, dos 781 animais componentes da amostra (Figura 16 e 17), 739 cães (94,62%) foram submetidos a tais exames e apenas 42 cães (5,38%) não foram examinados (Tabela 3). Como pode ser verificado, a perda de peso foi o sinal clínico mais prevalente, seguida de hipocoloração de mucosas (11,50%), onicogribose (11,36%) e opacidade de pelos (10,41%). Outros sinais clínicos presentes em menos de 10% da população analisada também foram observados e estão descritos na tabela 3.

Tabela 3- Sinais clínicos e semiológicos da população amostral (n= 739).

Sinais clínicos e semiológicos	n	%
Perda de peso	97	13,12
Hipocoloração de mucosas	85	11,50
Onicogribose	84	11,37
Opacidade de pelos	77	10,42
Desidratação	47	6,36
Estado geral ruim	33	4,46
Conjuntivite	32	4,33
Alopecia	25	3,38
Aumento de temperatura corporal	22	2,98
Dermatite	15	2,03
Úlcera	11	1,44
Diarréia	7	0,95
Caquexia	7	0,95
Linfadenopatia	6	0,81
Edema pulmonar	5	0,68
Coriza	5	0,68

Esplenomegalia	2	0,27
Hepatomegalia	1	0,14
Epistaxe	1	0,14
Hematúria	1	0,14
Tosse	1	0,14
Mioclonia	1	0,14

As figuras 16 e 17 ilustram vários sinais clínicos observados na população amostral. Como pode ser visto, foram verificados animais com alterações de pele, as quais incluíam dermatites, feridas em úlceras, alopecia e descamações. Além disto, alguns animais também apresentavam caquexia, conjuntivite, linfadenopatias, onicogribose e hipocoloração de mucosas, dentre outros.

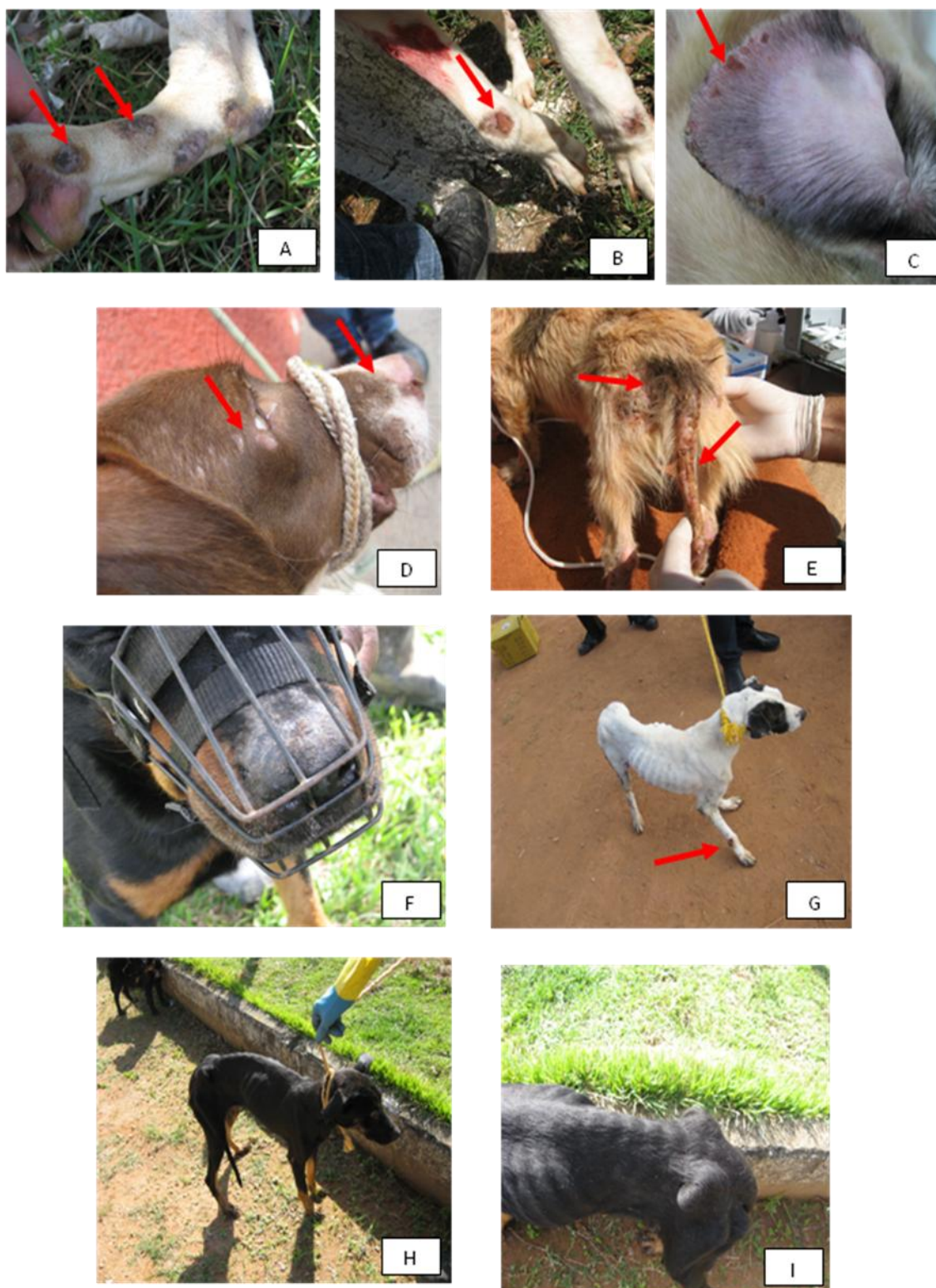


Figura 16 – Fotos ilustrativas dos sinais clínicos dos animais da amostra. A- Dermatite em membro posterior; B- Feridas em úlceras em membros anteriores; C Feridas em úlcera de extremidade auricular; D- Alopecia peri orbital e descamação do focinho; E- Dermatite em cauda e região peri anal; F- Descamação ao redor do focinho; G- Caquexia e ferida em úlcera - membro anterior direito; H-I – Caquexia. Fonte: Do autor.



Figura 17– Fotos ilustrativas dos sinais clínicos dos animais da amostra. A- Conjuntivite; B- Mucosa hipocorada; C- Aumento de linfonodo sub mandibular; D- Aumento de linfonodo poplíteo; E, F- Onicogrífose em membros anteriores. Fonte: Do autor.

No intuito de classificar os animais em relação aos sinais clínicos da LVC (tabela 4), foram utilizados parâmetros distintos de dois autores: Quinnell *et al.*, (2003) e Mancianti *et al.*, (1988). Como pode ser observado, a grande maioria dos animais foi classificada como assintomáticos por ambos os autores. Segundo a classificação clínica de Quinnell e colaboradores (2003), dentre os 739 animais examinados, 692 foram enquadrados como assintomáticos (93,64%), 43 foram classificados como oligossintomáticos (5,82%) e 04 foram categorizados como polissintomáticos (0,54%). Avaliando-se os animais segundo a metodologia de Mancianti *et al.*, (1988), 527 cães foram classificados como assintomáticos (71,31%), 125 animais foram incluídos na categoria de oligossintomáticos (16,92%) e 87 foram enquadrados em sintomáticos (11,77%).

Tabela 4 - Classificação clínica dos animais segundo Quinnell *et al.*, (2003) e Mancianti *et al.*, (1988) (n= 739).

	Quinnell <i>et al.</i> , (2003)	Mancianti <i>et al.</i> , (1988)
	n (%)	n (%)
Assintomáticos	692 (93,64%)	527 (71,31%)
Oligossintomáticos	43 (5,82%)	125 (16,92%)
Polissintomáticos ou sintomáticos	04 (0,54%)	87 (11,77%)

5.2 Diagnóstico sorológico da LVC

Em relação ao teste DPP, este foi utilizado em todos os 781 animais que constituíram a população amostral. Como pode ser observado na tabela 5, na amostra total, 38 animais (4,87%) foram positivos a este teste, sendo que 21 destes (4,58%), a maioria, foi procedente do canil municipal e 17 (5,28%) oriundos de ONGs.

Em relação ao teste sorológico ELISA Bio-Manguinhos (tabela 5), foram encontrados 17 animais positivos, o que representou 2,18% da amostra total. A maioria dos cães positivos no teste foram oriundos do canil municipal, totalizando 15 animais (3,27%) e apenas 02 cães (0,62%) foram oriundos das ONGs.

Em relação ao diagnóstico sorológico utilizando o ELISA-UFOP (tabela 5), o mesmo foi realizado com o soro procedente apenas dos animais do Canil Municipal em uma população amostral de 459 cães. Como pode ser verificado, dentre os animais analisados, um total de 63 animais foi positivo a este teste, o que representou 13,73% dentre a população analisada.

Tabela 5 - Diagnóstico sorológico pelas técnicas imunocromatográfica DPP, ELISA Bio-Manguinhos e ELISA UFOP.

DPP ^a				
	Canil Municipal	ONGs	TOTAL	IC 95%*
	n (%)	n (%)	n (%)	
Positivo	21 (4,58)	17 (5,28)	38 (4,87)	3,5-6,7
Negativo	438 (95,42)	305 (94,72)	743 (95,13)	93,3-96,5
Total	459 (100)	322 (100)	781 (100)	
ELISA Bio-Manguinhos ^a				
	Canil Municipal	ONGs	TOTAL	IC 95%*
	n (%)	n (%)	n (%)	
Positivo	15 (3,27)	2 (0,62)	17 (2,18)	1,3-3,5
Negativo	444 (96,73)	320 (99,38)	764 (97,82)	96,5-98,7
Total	459 (100)	322 (100)	781 (100)	
ELISA UFOP ^b				
	Canil Municipal			IC 95%*
	n (%)			
Positivo	63 (13,73)	-	-	10,8-17,3
Negativo	396 (86,27)	-	-	82,7-89,2
Total	459 (100)	-	-	

^aTestes realizados em animais do Canil municipal e ONGs. ^bTeste realizado em animais do Canil municipal. *IC (Intervalo de Confiança)

5.3 Fatores associados à positividade por ELISA Bio-Manguinhos- Análise univariada

Foram analisadas as variáveis procedência dos animais, classificações clínicas da LVC por Quinnell *et al.*, (2003) e Mancianti *et al.*, (1988) e características físicas exteriores dos animais (zootécnicas), em relação teste diagnóstico confirmatório (ELISA Bio-Manguinhos), conforme mostra a tabela 6.

Em relação à procedência, a grande maioria dos animais considerados positivos para LVC pelo teste ELISA Bio-Manguinhos, foi oriunda do canil municipal, 15 (3,2%) e apenas 2 (0,6%) foram procedentes de ONGs. Esta variável apresentou forte associação com o desfecho ($p= 0,02$) mostrando que os animais do canil apresentam 5,4 vezes mais chances de positividade por ELISA Bio-Manguinhos em comparação aos animais provenientes de ONGs.

Numa análise levando-se em consideração a classificação de sintomas da LVC adotada por Mancianti *et al.*, (1988), dentre o total de 739 animais examinados, 527 apresentaram-se “sem sintomas”, e dentre estes, 11 (2,1%) foram positivos, enquanto 212 mostraram-se “com sintomas” e neste grupo, 6 (2,8%) foram positivos. Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa entre a classificação clínica por estes autores em relação ao desfecho ($p=0,35$).

Levando-se em consideração a positividade por ELISA Bio-Manguinhos e a classificação de sintomas da LVC adotada por Quinnell *et al.*, (2003), dentre os 739 animais que foram analisados, a maioria foi considerada “sem sintomas” para a LVC ($n=693$) e nesta amostra, 13 foram positivos ao teste sorológico (1,9%). Poucos animais apresentavam “sintomas” ($n=46$) e, dentre estes, 04 foram positivos ao teste (8,7%). Esta variável, “sintomas por Quinnell *et al.*, (2003)”, apresentou forte associação com o desfecho ($p=0,01$) e houve 4,98 (1,55-15,94) vezes mais chances de animais “com sintomas” serem positivos ao teste sorológico ELISA Bio-Manguinhos em relação àqueles “sem sintomas”.

Em relação ao sexo, a grande maioria da população estudada ($n=781$) foi de fêmeas ($n=511$), e dentre estas, 7 (1,4%) foram positivas ao teste sorológico. Entre os 270 machos, 10 animais foram positivos ao teste, representando 3,7% destes. Os resultados obtidos sugerem uma associação estatística entre sexo masculino e positividade por ELISA Bio-Manguinhos, uma vez que a OR foi de 2,76 (IC 95% = 1,04-7,35), sendo estes resultados próximos dos limites de significância (*borderline*), observando portanto, que por muito pouco o 1 não ficou compreendido no IC 95%. Cabe salientar também, que o valor de p foi muito próximo do limite de significância ($p=0,06$).

Analisando os tipos de pelagem, dentre a população total amostral ($n=781$), a maioria apresentou pelagem curta ($n=460$), sendo que dentre estes,

11 cães apresentaram positivos ao ELISA Bio-Manguinhos, o que representou 2,4% deste tipo de pelagem. Os animais de pelagem média e longa totalizaram 167 e 154 cães, respectivamente, com 3 animais positivos ao teste sorológico em ambos os tipos de pelagem, o que representou 1,8% dentre os de pelagem média e 1,9% nos de longa.

Os resultados mostram que não houve associação estatística entre tipos de pelagem e positividade por ELISA-Bio ($p=0,88$). Na combinação de pelagens (longa/curta) a OR foi de 0,81, não sendo portanto, significativa. Na combinação de pelagens (média/curta) a OR foi de 0,74 e também não foi significativa.

Em relação ao porte físico, foram avaliados os 781 animais que constituíram a amostra, sendo que 182 foram classificados como "pequeno", 454 como "médio" e 145 como "grande". Quando associado o porte físico dos animais com a positividade no ELISA Bio-Manguinhos, foi observado que a maioria ($n=14$) apresentou porte médio, representando 3,1% desta categoria; 1 animal foi classificado como "pequeno" (0,5%) e 2 como "grande" (1,4%). Houve uma tendência linear *borderline* ($p=0,052$) entre o tipo de porte e a razão de chances de positividade pelo ELISA Bio-Manguinhos. Houve sugestão de aumento de positividade pelo ELISA Bio-Manguinhos no sentido PEQUENO-GRANDE-MÉDIO. Houve sugestão de que os cães de porte médio tiveram 5,76 vezes mais chance de positividade que cães de porte pequeno e os de grande porte tiveram 2,53 vezes mais chances de positividade em relação aos de porte pequeno.

Em relação ao grupo etário, a maioria dos animais da população amostral ($n=781$) foi constituída por "adultos" ($n=642$), seguida de 98 "idosos" e 41 "filhotes". Quando associado o grupo etário dos animais com a positividade no ELISA Bio-Manguinhos, foi observado que houve 13 cães positivos dentre os adultos (2% dentre o grupo etário), 2 cães dentre os idosos (2%) e 2 dentre os filhotes (4,9%). Não houve associação estatística entre grupo etário e positividade por ELISA Bio-Manguinhos ($p=0,46$).

Em relação ao grupo racial, a grande maioria dos animais foi classificada como SRD ($n=681$). Objetivando otimizar o cálculo estatístico, foi criado o grupo intitulado "outros", sendo composto por raças que não tiveram resultado positivo no ELISA Bio-Manguinhos, o que representou 64 animais dentre a

população amostral. As raças Labrador, Pastor Alemão e Pit Bull foram representadas por 11, 14 e 11 animais, respectivamente. Em relação aos animais positivos ao teste sorológico, foi observado um total de 14 animais SRD (2,1%) e um animal para as raças Labrador, Pastor alemão e Pit Bull (9,1%; 7,1% e 9,1%, respectivamente). Houve associação estatística entre grupo racial e positividade por ELISA Bio-Manguinhos ($p=0,001$), sendo que animais da raça Pit Bull e Labrador apresentaram 19 vezes mais chances de positividade no teste em comparação com grupo chamado de “outros”. Animais da raça Pastor Alemão apresentaram 14,7 vezes mais chance de positividade no ELISA Bio-Manguinhos em comparação com o grupo “outros”. Animais SRD apresentaram 2,9 vezes mais chance de positividade no ELISA Bio-Manguinhos em comparação como grupo “outros”.

Tabela 6 - Análise univariada da positividade por ELISA Bio-Manguinhos em relação à procedência dos animais, classificações clínicas por Quinnell *et al.*, (2003) e Mancianti *et al.*, (1988) e características físicas exteriores (zootécnicas).

	ELISA Bio-Manguinhos				
	Total	Positivo	% positivos	OR (IC95%)*	Valor de <i>p</i>
Origem					
Canil	459	15	3,2	5,4(1,22–23,80)	0,02
ONG	322	2	0,6	1	
Total	781	17			
Classificação clínica- Mancianti <i>et al.</i>, (1988)					
Sem sintomas	527	11	2,1	1	
Com sintomas	212	6	2,8	1,36 (0,49-3,74)	0,35
Total	739	17			
Classificação clínica- Quinnell <i>et al.</i>, (2003)					
Sem sintomas	693	13	1,9	1	
Com sintomas	46	4	8,7	4,98 (1,55 – 15,94)	0,01
Total	739	17			
Sexo					
Feminino	511	7	1,4	1	

Masculino	270	10	3,7	2,76 (1,04 – 7,35)	0,06
Total	781	17	100		
Pelagem					
Curta	460	11	2,4	1	
Média	167	3	1,8	0,74 (0,2-2,70)	0,65
Longa	154	3	1,9	0,81 (0,22-2,94)	0,75
Total	781	17			
Porte Físico ^a					
Pequeno	182	1	0,5	1	
Médio	454	14	3,1	5,76	
Grande	145	2	1,4	2,53	
Total	781	17	100		
Grupo Etário ^b					
Filhote	41	2	4,9	2,48	
Adulto	642	13	2	1	
Idoso	98	2	2	1,01	
Total	781	17			
Raça ^c					
Outros	64	0	0	1	
SRD	681	14	2,1	2,9	
Pastor Alemão	14	1	7,1	14,78	
Labrador	11	1	9,1	19	

Pit Bull	11	1	9,1	19
Total	781	17		

*OR (*odds ratio*): razão de prevalência. ^aQui-Quadrado para tendência linear = 3,75 (p = 0,052). ^b Qui-Quadrado para tendência linear = 0,53 (p = 0,46). ^cQui-Quadrado de Mantel-Haenszel para tendência linear = 10,56 (p = 0,001)

5.4 Análise estatística Multivariada

As análises estatísticas univariadas realizadas inicialmente entre o diagnóstico positivo por ELISA Bio-Manguinhos ("Padrão-Ouro") e as possíveis variáveis explicativas, mostraram que houve associação estatística do teste diagnóstico com procedência (p=0,01), sintomas por Quinnell *et al.*, (2003) p=0,01 e grupo racial (p=0,001). Não foram detectadas associações estatísticas com as variáveis classificação clínica de sintomas por Mancianti *et al.*, (1988) p=0,35, tipo de pelagem (p=0,75 e p=0,65) e grupo etário (p=0,47). As variáveis porte físico (p=0,052) e sexo (p=0,06), mostraram-se muito próximas do limite de significância, sugerindo associação estatística.

Como verificado na tabela 7, ao se proceder a análise no modelo multivariado, foram observadas associações estatísticas entre o ELISA Bio-Manguinhos positivo e as variáveis procedência (canil), e sintomas por Quinnell *et al.*, (2003). Em relação á variável sexo, esta novamente sugere associação com o desfecho, p=0,057, muito próximo do limite de significância.

Tabela 7- Análise multivariada do diagnóstico por ELISA Bio-Manguinhos com variáveis explicativas.

VARIÁVEL	OR (IC95%)	Valor de p
Procedência (canil/ONG)	5,90 (41,3-26,3)	<0,05
Quinnell (sintomático/assintomático)	4,98 (1,5-16,4)	<0,01
Sexo (M/F)	2,61 (0,9-7,04)	0,057

5.5 Concordância entre os testes

Haja vista a existência de um desequilíbrio muito grande entre os pares negativos e pares positivos, associado ao fato de existirem dúvidas quanto aos “verdadeiros positivos” e “verdadeiros negativos”, não foram realizados os cálculos de sensibilidade e especificidade dos testes. Assim, optou-se proceder comparações pareadas entre o diagnóstico pelo ELISA Bio-Manguinhos, considerado o “padrão-ouro”, com o DPP e o ELISA UFOP, mostrados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

A proporção de concordância entre ELISA Bio-Manguinhos com o DPP foi: resultados positivos = 5,77% (1,5-16,92); resultados negativos = 93,7% (91,7-95,26); Resultados positivos+negativos = 93,7% (91,73-95,28). Os cálculos mostraram que o desempenho do DPP foi considerado estatisticamente diferente do ELISA Bio-Manguinhos ($p=0,004275$). O DPP detectou 2,5 vezes (1,34-4,64 IC 95%) mais positivos que o teste ELISA Bio-Manguinhos. O valor de Kappa (sem ponderar) foi de 8,14% (1,69% - 14,59% IC 95%).

A proporção de concordância entre ELISA Bio-Manguinhos e ELISA UFOP foi: Resultados positivos = 12,68% (6,31-23,20); Resultados negativos = 86,22% (82,61-89,20); Resultados positivos+ negativos = 86,49% (82,94-89,42). Os cálculos mostraram que o desempenho do ELISA UFOP foi considerado estatisticamente diferente do ELISA Bio-Manguinhos

(<0,0000001). O ELISA UFOP detectou 6,75 vezes (3,21-14,18 IC 95%) mais positivos que o ELISA Bio-Manguinhos. O valor de Kappa (sem ponderar) foi de 17,7%.

Tabela 8- Comparações pareadas entre o diagnóstico pelo ELISA Bio-Manguinhos (“padrão-ouro”) e pelo DPP.

ELISA Bio-Manguinhos	DPP		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
POSITIVOS	3	14	17
NEGATIVOS	35	729	764
TOTAL	38	743	781

Tabela 9 - Comparações pareadas entre o diagnóstico pelo ELISA Bio-Manguinhos (“padrão-ouro”) e pelo ELISA UFOP.

ELISA Bio-Manguinhos	ELISA UFOP		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
POSITIVOS	9	8	17
NEGATIVOS	54	388	442
TOTAL	63	396	459

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho representa o primeiro inquérito sorológico da LVC realizado no município de Juiz de Fora. Segundo informações do Setor de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde, há alguns anos já vinham ocorrendo diagnósticos esporádicos de LVC no município, porém as investigações epidemiológicas mostravam que estes cães não eram nascidos na cidade. Em 2008, foi diagnosticado o primeiro cão reativo em testes sorológicos (ELISA e RIFI) e confirmado por exame parasitológico (microscopia direta), realizados na Fundação Ezequiel Dias (FUNED). As investigações epidemiológicas indicaram ser este o primeiro caso autóctone de LVC no município em função do mesmo ter nascido em Juiz de Fora e nunca ter se ausentado do município. O presente estudo buscou conhecer a prevalência da infecção canina em Juiz de Fora e avaliar os fatores epidemiológicos envolvidos nas ocorrências. A realização de inquéritos sorológicos caninos representa o passo inicial para o conhecimento da real situação da doença na cidade e balizamento para ações de controle da LV e prevenção de aparecimento de casos humanos. Normalmente os casos de LVC precedem os de LV, já que os cães são os principais reservatórios domésticos e fundamentais na manutenção do ciclo da doença (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997).

Neste trabalho, a prevalência da LVC variou de acordo com a técnica empregada (tabelas 5): o teste DPP apresentou soropositividade de 4,87% (IC 95% de 3,5-6,7%); o ELISA Bio-Manguinhos de 2,18% (IC 95% de 1,3-3,5%) e o Elisa *in house* de 13,73% (IC 10,8-17,3%). Em relação à variabilidade observada entre as técnicas, vale a pena destacar que as mesmas apresentam antígenos diferentes e isto pode refletir nos resultados. O ELISA *in house*, realizado com antígenos de *L. chagasi*, foi obtido através de colaboração com o grupo do Dr. Alexandre Reis (UFOP) e num trabalho recente, este mesmo grupo verificou também uma positividade mais elevada (1,3 vezes) quando comparada com o ELISA Bio-Manguinhos (COURA-VITAL *et al.*, 2011).

Levando-se em consideração que o teste DPP é atualmente preconizado pelo MS como triagem para a LVC e o ELISA Bio-Manguinhos como confirmatório, convém ressaltar que a prevalência da infecção no município foi portanto, de 2,18%. O fato de não se ter relato de estudo similar na cidade de Juiz de Fora dificulta as comparações locais, porém a casuística dos dados obtidos junto aos órgãos municipais responsáveis pelo controle de zoonoses mostra-se condizente com os índices obtidos no trabalho.

A distribuição da LVC no Brasil e no mundo é heterogênea, apresentando grande variação entre regiões e mesmo dentro da mesma região. Ferrer (1999), relatou que a discordância observada entre as prevalências pode ser devido, principalmente ao estágio de infecção, à natureza dos antígenos, ao número de amostras e ao teste sorológico empregado.

Alguns trabalhos realizados no Brasil mostram índices próximos ao encontrado neste trabalho, como os de Maceió-AL (1,9%), Pedro Leopoldo-MG (1,4%) e Cuiabá-MT (3,4%) (NAVEDA, 2005; MARTINS, 2008; ALMEIDA, 2009). Cabe acrescentar que, apesar do ELISA Bio-Manguinhos ser a técnica de confirmação adotada pelo MS, o uso de técnicas sorológicas tem suscitado uma série de debates, visto que apresentam, entre outros problemas, reação cruzada com outros tripanosomatídeos (ALVES & BEVILACQUA 2004; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO 2006; ROMERO & BOELAERT 2010). Mais recentemente, numa tentativa de contornar estes problemas, a PCR tem se mostrado como boa alternativa para o diagnóstico da LVC por sua alta sensibilidade e especificidade (ALMEIDA 2007; ALVES 2008; PILATTI *et al.*, 2009). Estudos comparando a eficácia da PCR em relação a métodos sorológicos e parasitológicos têm demonstrado que a mesma pode ser de grande valia na confirmação dos casos positivos e inconclusivos pela sorologia como RIFI e ELISA, além de também detectar um maior número de animais positivos (SILVA, 2007; ALVES, 2008; COURA-VITAL *et al.*, 2011). Portanto, neste trabalho, não se pode descartar a possibilidade da prevalência apontada estar sendo subestimada e/ou ser referente à infecção por outros tripanosomatídeos. Assim, ensaios em paralelo durante o desenvolvimento deste trabalho utilizando a PCR já estão sendo realizados, no intuito de melhor conhecer e definir os casos de LVC no município.

Tem sido descrito que a leishmaniose visceral humana é favorecida por condições sócio-econômicas, movimentos migratórios e a presença de vetores e reservatórios no ambiente doméstico (MORENO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2005). Entretanto, os fatores de risco associados à LVC são escassos (COURA-VITAL *et al.*, 2011). Assim, um dos objetivos deste trabalho foi analisar os fatores de risco associados à LVC no município de Juiz de Fora.

Em função do teste ELISA Bio-Manguinhos ter sido considerado o resultado confirmatório de diagnóstico, foram pesquisadas possíveis associações estatísticas entre as variáveis e o referido teste. Neste sentido, a análise univariada (tabela 6) mostrou a associação de três variáveis com o desfecho ($p < 0,05$; IC 95%), indicando que a procedência, sintomas por Quinnell e grupo racial são fatores que favorecem a doença nos animais. Os fatores "sexo" e "porte físico" mostraram-se sugestivos à associação. Na análise multivariada, como os possíveis fatores de risco para a LVC no município permaneceram, ser procedente do canil municipal ($p < 0,05$) e apresentar sintomas de LVC como classificado por Quinnell ($p < 0,01$), além disto, continuou sugestiva a associação com o sexo masculino ($p = 0,057$), conforme apresentados na tabela 7.

Em relação à procedência, os animais do canil apresentaram 5,4 vezes mais chances de adquirirem a infecção quando comparados com os de ONGs (Tabela 6). A literatura carece de trabalhos similares neste quesito, porém, podem ser comparados os resultados obtidos neste trabalho com os de Fortaleza-CE (ALVES *et al.*, 1998), em que mostraram diferença significativa de infecção entre cães errantes e cães domiciliados. Os animais recolhidos no canil municipal se enquadram na categoria de cães errantes e os animais de ONGs, apesar de poderem possuir origem das ruas, normalmente estão domiciliados a bastante tempo sob o cuidado de seus proprietários. A prevalência da infecção no referido trabalho de Fortaleza foi de 1,59% para cães errantes e 0,28% para os domiciliados. Os resultados do presente trabalho indicam prevalência da infecção de 3,2% para animais do canil e 0,6% para os de ONGs. Também, Calheiros (2005) afirma que os animais recolhidos das ruas têm maior probabilidade de estarem contaminados pelo fato de terem realizado maiores deslocamentos, expondo-se assim, mais aos vetores da LV.

É importante também acrescentar que uma das motivações dos proprietários em abandonarem seus animais é o fato dos mesmos estarem doentes, o que poderia aumentar a probabilidade de se encontrar animal positivo para a LVC no canil municipal, em função deste albergar animais abandonados nas ruas. Deve-se considerar também, que apesar dos animais receberem alimentação e cuidados adequados no canil municipal, é sabido que muitos dos animais que chegam ao local possuem histórico de desnutrição na vida pregressa, o que poderia ter favorecido a infecção por LV.

Vale ainda acrescentar que, em um trabalho do nosso grupo, foi realizado um inquérito entomológico em diversas localidades do município de Juiz de Fora, incluindo o canil municipal (OLIVEIRA *et al.*, 2014- manuscrito aceito para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical). Durante a realização da pesquisa, apesar do encontro de várias espécies de flebotomíneos, nenhuma destas tem interesse epidemiológico na transmissão das leishmanioses, inclusive, não foi encontrado *Lutz. longipalpis*, incriminado como principal vetor da LVC no Brasil. A continuidade da pesquisa poderá favorecer futuros esclarecimentos sobre a presença de vetores da LVC no município.

Em relação aos sinais clínicos da LVC, os animais foram classificados clinicamente segundo duas metodologias: Mancianti *et al.*, (1988) e Quinnell *et al.*, (2003). Numa avaliação sobre a classificação clínica da população amostral, a grande maioria dos animais foram enquadrados como assintomáticos por ambos autores (Tabela 4). Os resultados obtidos (Tabela 6) mostram que 64,7% (11/17) dos animais positivos no ELISA Bio-Manguinhos foram classificados como assintomáticos quando foram usados parâmetros de Mancianti *et al.*, (1988). Sendo avaliados segundo Quinnell *et al.*, (2003) foram encontrados 76,4% (13/17) dos animais positivos no ELISA Bio-Manguinhos classificados como assintomáticos. O maior número de assintomáticos encontrados em Quinnell *et al.*, (2003) pode ser explicado pela metodologia adotada pelos autores na qual os sintomas são graduados em leve, moderado e severo, sendo pontuados. O animal precisa de uma determinada pontuação para que seja considerado sintomático, diferentemente de Mancianti *et al.*, (1988). As análises estatísticas univariada e multivariada mostraram

associação entre positividade no ELISA Bio-Manguinhos e classificação clínica por Quinnell *et al.*, (2003) entretanto, não foi encontrada associação estatística entre o referido diagnóstico e classificação clínica por Mancianti *et al.*, (1988).

Existem divergências quanto às associações entre sintomatologia clínica e positividade no diagnóstico sorológico. Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Almeida (2009), em Cuiabá-MT, relatando 56,25% de assintomáticos dentre os soropositivos e associação estatística entre sintomatologia e positividade no diagnóstico. Trabalho realizado na periferia da cidade do Rio de Janeiro relata 63,25% dos cães soropositivos como assintomáticos (MARZOCHI *et al.*, 1985). Em Belo Horizonte (região metropolitana), 68% dos cães confirmados positivos para LVC eram assintomáticos (SILVA *et al.*, 2001). Dantas-Torres *et al.*, (2006) encontrou 85% dos animais positivos assintomáticos. Trabalho realizado por Abranches *et al.*, (1991) em Portugal, na cidade de Lisboa, mostrou 53,8% de assintomáticos no grupo dos positivos.

Em contrapartida, Rondon (2007), na cidade de Fortaleza, relata 19,2% de assintomáticos dentre os positivos, encontrando associação estatística entre sintomatologia clínica de cães domiciliados e positividade na sorologia. Martins (2008), em pesquisa realizada em Maceió-AL, encontrou 25% dos soropositivos assintomáticos. Fisa *et al.*, (1999) na Espanha, relata 30% de cães assintomáticos dentre os animais com LV. Trabalho de Dantas-Torres (2009), em São Vicente do Férrer-PE, encontrou 25% dos cães soropositivos como assintomáticos, porém, não mostrou associação estatística entre sintomatologia clínica e positividade na sorologia. Barros (2009), no Distrito Federal, mostra 28,57% dos cães doentes assintomáticos. Cabe considerar que animais assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos e contribuem para manutenção dos níveis endêmicos da LVC (SOARES *et al.*, 2011).

Em relação ao grupo racial (tabela 6), a associação com o desfecho foi constatada na análise univariada, onde em comparação com o grupo “outros”, que incluiu animais com resultados negativos, as raças Pit Bull e Labrador mostraram 19 vezes mais chances de se infectarem; Pastor Alemão apresentaram 14,78 vezes mais chance de terem LV e 2,9 vezes mais chance de infecção foram imputadas aos

animais SRD. Neste sentido, a maioria dos trabalhos relata não haver pré disposição racial para a doença, como Noli (1999); Feitosa *et al.*, (2000); Leontides *et al.*, (2002); Moreira Jr. *et al.*, (2003); Gontijo & Melo (2004) e Almeida (2009). Entretanto, existem publicações correlacionando determinadas raças com susceptibilidade à infecção, inclusive há relato de raça resistente à LVC. Por exemplo, em um estudo feito em Montes Claros-MG, França-Silva *et al.*, (2003) descreveram as raças Boxer e Cocker Spaniel como mais suscetíveis à infecção por LV. Já Julião (2004) em Camaçari-BA e em Lauro de Freitas-BA, observou que animais de “raça pura” foram mais suscetíveis à infecção por LV, na análise univariada, porém os resultados não se repetiram na multivariada. Solano-Gallego *et al.*, (2000) descreveram resistência da raça Ibizian Hound à infecção por LVC, justificando pelo fato destes cães apresentarem resposta imune celular significativa ao parasito.

Em relação ao sexo dos animais, apesar da maioria dos animais da amostra ser de fêmeas (tabelas 2 e 6), a maioria dos animais positivos no ELISA Bio-Manguinhos são machos. Nas análises univariada e multivariada esta variável esteve próxima do limite de significância (tabelas 6 e 7). A literatura referente à associação entre gênero e infecção por LVC é vasta, porém bastante contraditória, tanto no Brasil quanto no exterior. A maioria dos trabalhos relatam a associação estatística entre cães do sexo masculino e infecção por LV, podendo serem citados: Lanotte *et al.*, (1975); Zaffaroni *et al.*, (1999); Crigoli *et al.*, (2002); Julião (2004); Dantas-Torres, Brito, Brandão-Filho (2006) e Silva (2007). É interessante ressaltar que a associação, quando existente, não está comumente associada ao sexo feminino. Entretanto, outros autores não relatam associação entre sexo e a ocorrência da doença, como Abranches *et al.*, (1991); Amusategui *et al.*, (2003); França-Silva *et al.*, (2003); Moreira *et al.*, (2003); Naveda *et al.*, (2006); Julião *et al.*, (2007); Rondon (2007); Martins (2008); Almeida (2009); Dantas-Torres (2009); Barros (2011).

É importante considerar que a associação de infecção por LVC com sexo masculino pode estar também relacionada com comportamentos e hábitos dos animais deste gênero que são influenciadas por questões culturais como por exemplo, machos serem mais destinados à função de guarda que fêmeas e conseqüentemente, permanecerem maior tempo no peridomicílio,

principalmente durante a noite, estando assim mais expostos ao vetor que realiza repasto sanguíneo preferencialmente no período noturno.

No tocante aos tipos de pelagem, foi observado que a maioria dos animais reativos no teste ELISA Bio-Manguinhos, apresentaram pelagem curta, porém não houve associação estatística, na análise univariada entre tipos de pelagem e positividade no ELISA Bio-Manguinhos (tabela 6). Os resultados obtidos corroboram com os de Fisa *et al.*, (1999) e Leontides *et al.*, (2002) que não encontraram associação estatística entre positividade para LVC e tipos de pelagem. No entanto, a maioria dos trabalhos mostram variadas correlações entre pelo curto e positividade para LVC, a saber, França-Silva *et al.*, (2003); Julião (2004); e Vital (2011). Além disto, Moreira Jr *et al.*, (2003) mostraram que cães de pelos curtos tem maior chance de adquirirem a infecção e indicaram como possível justificativa o fato destes atraírem mais facilmente o vetor, uma vez que o calor irradiado de suas peles seria mais facilmente percebido pelo inseto. Neste sentido, Boraschi & Nunes (2007) descrevem maior acometimento por LV em cães de pelo curto associando esta correlação ao fato destes possuírem baixa barreira mecânica ao vetor. Além disto, em um trabalho realizado na Grécia, os autores também sugeriram efeito protetor do pelo à investida do flebótomo e constataram que cães da raça Collie (pelo longo) são menos suscetíveis à infecção que os da raça Dobermann que apresentam pelo curto (SIDERIS *et al.*, 1996). Nesta linha de raciocínio, possivelmente os cães de pelo longo e orelha pendular teriam as suas chances de infecção pelos flebotomos ainda mais reduzidas, haja vista a peculiaridade da face interna da orelha do cão (pavilhão auricular) ser uma local com pouca presença de pelos, mesmo em animais de pelagem longa, considerando-se o fato desta região anatômica ser comumente escolhida pelos vetores para seu repasto sanguíneo. Associa-se às ponderações mencionadas o fato dos flebotomíneos possuírem reduzido tamanho, peso e limitações em deslocamentos, o que dificultaria sua atividade em animais de pelagens longas.

É importante relatar que alguns autores classificam os animais em apenas dois grupos: pelagem curta e pelagem longa, fazendo com que aqueles cães que seriam de pelagem média fiquem provavelmente enquadrados no grupo de animais de pelo longo, o que poderia gerar resultados diferentes de

associações estatísticas, a exemplo do presente trabalho que classificou os animais em pelos curtos, médios e longos.

Em relação ao porte físico dos animais, estes foram classificados em pequeno, médio e grande (tabela 2). Na análise univariada, houve associação sugestiva (valor de p próximo de 0,05) entre positividade no teste ELISA Bio-Manguinhos e os portes médio e grande dos animais, tendo os cães destes portes, 5,76 e 2,53 vezes, respectivamente, mais chances de adquirir a infecção quando comparados aos de porte pequeno (Tabela 6). Estes resultados corroboram com a maioria dos trabalhos, os quais verificam associação da LVC com porte, sendo que os animais de grande porte tendem a ser mais propensos à infecção. Por exemplo, Rondon (2007) encontrou associação entre porte grande e positividade na LVC alegando serem os animais maiores aqueles mais utilizados na função de guarda, permanecendo por um período maior de tempo no peridomicílio, especialmente durante à noite. Trabalho realizado no Rio Grande do Norte, associa a função de “cão de guarda” a um maior risco de infecção por LVC, tanto na área urbana, quanto rural (AMÓRA *et al.*, 2006), mostrando ser evidente a associação da função ao porte físico. Na mesma linha de raciocínio, Ferrer (1992) afirma que a ocorrência da LVC tem sido descrita com maior frequência em raça de porte grande e gigante, por estarem mais expostos ao inseto vetor em função de permanecerem mais tempo ao ar livre. Martin-Sanches *et al.*, (2009) corrobora com a mesma linha de pensamento relatando que cães que permanecem maior tempo no quintal de suas residências, inclusive dormindo nos mesmos, tendem a apresentar maior soroprevalência. Vital (2011) trabalhou com grande número de cães num estudo de coorte em Belo Horizonte, onde acompanhou a soroconversão destes animais e associou a possíveis variáveis, concluindo que os cães que ficavam no quintal tiveram duas vezes mais chance de adquirirem infecção quando comparados aos que ficavam mais tempo dentro de casa. O referido autor relata também, que os cães de grande

porte tiveram duas vezes mais chances de soroconversão em comparação com os animais de pequeno porte, pelo fato de geralmente permanecerem maior tempo nos quintais.

Além disto, a exposição contínua ao vetor pode favorecer a soroconversão e o desenvolvimento da doença, haja vista, que o parasito é constantemente reintroduzido nos cães (SOLLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Trabalhos na Espanha mostraram que a soroprevalência na LVC foi diretamente proporcional ao porte do animal, portanto, animais maiores estariam mais propensos a se infectarem (MARTIN-SANCHES *et al.*, 2009; GALVEZ *et al.*, 2010).

A casuística mostrada nos leva a supor que a maior propensão dos grandes animais à infecção pode estar relacionada também, à maior superfície corporal destes e, conseqüentemente, por apresentarem maior área exposta aos flebotomíneos, o que poderia fazer diferença principalmente em áreas de baixa densidade populacional do vetor. Assim, como pôde ser observado, a maioria dos trabalhos relacionou a probabilidade de infecção por LVC diretamente à função e hábitos do animal e conseqüentemente ao porte grande por estar diretamente ligado a tais funções, hábitos e comportamentos.

No presente trabalho não foi possível observar a função dos animais pelo motivo da população amostral ter sido composta por cães oriundos do Canil Municipal e ONGs. Não existem informações sobre a vida pregressa destes cães. Sabe-se, no entanto, que muitos destes conviveram no mesmo espaço físico por longos períodos de tempo. Portanto, dentro de cada localidade de origem, tínhamos grupos de animais expostos às mesmas condições. Cabe salientar ainda, que alguns autores classificam os animais em pequenos e grandes. Neste caso, alguns cães classificados no presente trabalho como médios estariam no grupo dos grandes e os resultados poderiam ser diferentes.

Em relação aos grupos etários, não foi encontrada associação estatística entre estes e a positividade no ELISA Bio-Manguinhos, na análise univariada, apesar de, proporcionalmente, os filhotes terem sido mais afetados pela infecção (tabela 6). A literatura mostra resultados bastante diversificados quanto à susceptibilidade à infecção em função do grupo etário, onde não

foram encontradas pré disposições etárias à infecção por Noli (1999); Feitosa *et al.*, (2000); Gontijo & Melo (2004); Silva (2007); Martins (2008); Almeida (2009) e Dantas-Torres (2009). Entretanto, Moreno & Alvar (2002) encontraram maior susceptibilidade em cães na faixa de 03 anos, portanto adultos; resultados semelhantes foram obtidos Arias Jr. *et al.*, (1996) que relacionam a maior pré disposição à infecção em adultos, provavelmente ao longo período de incubação da doença. Hernandez-Rodrigues *et al.*, (1987) relatam que animais jovens e adultos foram considerados mais suscetíveis. Matos *et al.*, (2006) reforça que, a partir de certa idade os cães passam a ser colocados na parte externa do domicílio, tendo assim favorecido, o contato com o vetor. Nesta linha de raciocínio, os filhotes estariam mais protegidos. Em contrapartida, Moreira Jr. *et al.*, (2004) e Dantas-Torres *et al.*, (2006) relatam maior suscetibilidade entre animais com menos de 01 ano de idade, ou seja, filhotes.

Finalizando, este trabalho pioneiro realizado em Juiz de Fora, aponta a presença da LVC no município. Apesar de não podermos afirmar que os casos são autóctones, visto o trabalho ter sido realizado com animais do canil e ONGs e não se ter confirmações da origem destes, é sabido que animais podem ser considerados como importantes sentinelas de algumas doenças, incluindo a LVC (CABEZON *et al.*, 2010). Além disto, a presença da LVC relatada neste trabalho, reforça a idéia de que a doença está em processo de expansão e urbanização no Brasil e aponta a necessidade de vigilância epidemiológica ativa em áreas indenes ou de baixa endemicidade no intuito de controlar a LVC e prevenir o aparecimento da doença humana.

7 CONCLUSÕES

Através deste trabalho pioneiro no município de Juiz de Fora sobre a LVC, foi possível verificar que:

Apesar da ocorrência de variações de positividade entre as técnicas, os dados apontam a existência de cães infectados no município de Juiz de Fora;

1) A prevalência considerada foi de 2,18% (IC 95% de 1,3-3,5), em consonância com a técnica de diagnóstico confirmatório preconizada pelo MS (ELISA Bio-Manguinhos); o teste imunocromatográfico DPP apresentou soropositividade de 4,87% (IC 95% de 3,5-6,7) e o ELISA *in house* (UFOP) 13,73% (IC95% de 10,8-17,3);

3) Em relação aos fatores de risco associados à LVC, utilizando o ELISA Bio-Manguinhos como confirmatório, numa análise univariada foi observada associação estatística com três variáveis:

- procedência do canil municipal ($p=0,02$; $OR=5,4$);
- sintomatologia clínica segundo Quinnell e colaboradores ($p=0,01$; $OR=4,98$);
- grupo racial ($p=0,001$), tendo associação os animais da raça Pit Bull e Labrador ($OR=19$), Pastor Alemão ($OR=14,7$) e SRD ($OR=2,9$);
- Foi observada sugestão de associação com sexo masculino e porte médio/grande dos animais, visto que os valores de p ficaram próximos do limites de significância;

4) Na análise multivariada, animais albergados no canil municipal, os quais são oriundos de várias ruas do município mantiveram-se associados ao despecho ($p<0,05$ $OR=5,9$). Além disto, a análise da sintomatologia clínica da LVC adotada por Quinnell e colaboradores, as quais se baseiam na análise qualitativa e quantitativa dos sintomas característicos da LVC, também foi apontada estatisticamente como fator de risco para a doença no município ($p<0,01$ $OR=4,98$); sexo masculino manteve-se sugestivo como fator de risco para a LVC ($p=0,057$) e ($OR=2,61$).

Este foi o primeiro inquérito da LVC no município de Juiz de Fora e a presença da doença relatada neste trabalho, reforça a idéia de que a endemia está em processo de expansão e urbanização no Brasil, apontando a necessidade de vigilância epidemiológica ativa em municípios "silenciosos", no intuito de prevenir ou minimizar o aparecimento da doença em seres humanos, até então sem nenhum diagnóstico confirmado no município.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P., *et al.* Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 557-561, 1991.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Med. Universidade Federal do Ceará**, v. 17/18, p.129-148, 1977.

ALMEIDA, A. B. P. F. **Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.** Cuiabá, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária). Universidade Federal de Mato Grosso.

ALVAR, J., *et al.* Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-87, 2004.

-----; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ALVES, A. W.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993 - 1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.

-----; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.

ALVES, A. L.; *et al.* Levantamento epidemiológico da leishmaniose visceral em cães vadio da cidade de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, Ceará, v. 8, n. 2, p. 63-67, 1998.

Alves, C. F. 2008. **Determinação do perfil de citocinas e quantificação da carga parasitária em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) com e sem expressão clínica da Leishmaniose Visceral.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Almeida, A. B. B. F. 2007. **Inquérito soropidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso.

AMÓRA, S. S. A.; *et al.* Fatores relacionados com a positividade de cães para Leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciê. Rur. Santa Maria**, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.

AMUSATEGUI, I., *et al.* Distribution and relationships between clinical and pathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v. 18, [s.n.], p. 147-156, 2003.

ANDRADE, A. R. O., *et al.* Estudo epidemiológico das leishmanioses em áreas de turismo ambiental e ecoturismo, Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, p. 488-493, set-out, 2009.

ARANSAY, A. M.; SCOLULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1933-1938, 2000.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P.; ZICKER, F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, p. 145-146, 1996.

ASHFORD, D. A.; *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

-----; *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 251-255, 1995.

ASSIS, T. S. M., *et al.* Validação do teste 101 imunocromatográfico rápido IT-® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.2, abr-jun 2008.

-----, *et al.* Validação do teste 101 imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, n.2, abr-jun 2008.

BADARÓ, R.; *et al.* rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 758-761, 1996.

-----; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immuno fluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensity and specity of different morphological formasof two *leishmania* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 480-484, 1983.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis – a diagnostic and clinical challenge. **Vet. J.**, v. 175, p. 14-15, 2008.

BARATA, R. A., *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais States, Brazil. **BioMed Research International**, 2013.

BARROS, C. L. S. Sistema Hemopoético. In:____. *Patologia Veterinária Especial de Thomson*. 2ª Edição. Porto Alegre: ArtMed, p.345, 1998.

BARROS, R. M. **Caracterização histopatológica da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saude Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília/DF.

BARROSO-FREITAS, A. P. T.; *et al.* Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p.383-389, 2009.

BATES, P. A.; ASHFORD, R. W. Old world leishmaniasis. In: COX, F.E.G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S.H.; DESPOMMIER, D.D. (Eds.), Topley & Wilson's microbiology & Microbial Infections, 10 nd ed. **Parasitology**. London, Hodder Arnold, 2006. p. 283-312.

BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 71, p. 44-48, 2007.

BORGES, B. K. A.; *et al.* Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1035-1043, 2009.

BRAGA, M. D. M.; *et al.* Controle do calazar canina: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Rev.Soc. Bras. Med. Trop.** v. 315, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saude do Ministério da Saude e da Secretaria de Estado da Saude do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saude, Secretaria de Vigilância em Saude, 2010.

-----MINISTÉRIO DA SAUDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saude. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília-DF: Editora do Ministério da Saude, 2005.

----- MINISTÉRIO DA SAUDE (MS). Brasília-DF: 2011. Disponível em: <[HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional)>. Acesso em: 07/10/2013.

----- Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. Brasília-DF: **Editora do Ministério da Saude**, 2007-2013.

----- Secretaria de Vigilância em Saude. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF: **Editora do Ministério da Saude**, 2006.

-----Superior Tribunal de Justiça. Tribunal Regional Federal da 3^o Região. Apelação cível. Acórdão em ação n.8268/2013- SP. Sociedade de Proteção e Bem Estar Animal Abrigo dos Bichos e União Federal. Relator: Juiz David Diniz. 13 set. 2012. **Acórdão** 8268/2013, São Paulo, edição n.11.

-----Superior Tribunal de Justiça. Tribunal Regional Federal da 3^o Região. Agravo de instrumento. Expediente Processual 24491/2013-SP. União Federal e Sociedade de Proteção e Bem Estar Animal Abrigo dos Bichos. Juiz Leonel Ferreira. 06 set. 2013. Expediente Processual 24491/2013, São Paulo, edição n. 167.

----- Ministério da Saude; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 31 de 20 de maio de 2003. **Nota de Esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no M.A.P.A.** Brasília: M.A.P.A., 2009b.

CABEZÓN O.; *et al.* Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. **Parasitol Res.**, v. 107, p. 1505-1508, 2010.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico da transmissão da Leishmania (Leishmania) chagasi CUNHA & CHAGAS, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ: Estudo de possíveis variáveis preditoras.** 1999, 90p. Tese (Magister Scientiae), Escola de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CADERNO TÉCNICO DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (Escola de Veterinária da UFMG/Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária-FEPMVZ). 2012.

CALHEIROS, P. W. B. **Leishmaniose visceral canina na cidade de Maceió-Alagoas.** 2005, 55 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; *et al.* **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo.** São Paulo: Secretaria de Estado da Saude. P. 145, 2006.

CARRERA, L.; *et al.* Antibody response in dogs experimentally infection course antigen markers. **Experimental Parasitology**, v. 82, [s.n.], p. 139-146, 1996.

CARVALHO, M. R.; *et al.* Phlebotomine sandfly species from an American visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 23, n. 5, p. 1227-1232, 2007.

----- **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral Americana na zona da mata norte de Pernambuco.** Recife (PE), 2005. Dissertação (mestrado). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

CARRIO, J.; PORTUS, M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. **BMC Pharmacol**, v. 2, p. 11, 2002.

CARVALHO, D. S., *et al.* Transmissão venérea da leishmaniose visceral canina – **X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX 2010 – UFRPE:** Recife, 18 a 22 out.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 873-882, 2007.

----- *et al.* Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic test for visceral leishmaniasis in rural Nepal. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, p. 31-40, 2006.

CIAMARELLA, P., *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 1, p. 539-543, 1997.

COLOMBO, F. A. **Detecção de RNA da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e padronização de uma PCR em tempo real para diagnóstico e diferenciação de espécies de *Leishmania***. São Paulo, 2012. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

CORTES, S., *et al.* PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.1. specific kinetoplastid primers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, p. 12-17, 2004.

COUTINHO, M. T., *et al.* Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1/2, p.149-155, Amsterdam, Mar. 2005.

-----; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3/4, p. 320-325, , Amsterdam, Jul. 2007.

COSTA-VAL, A. P. **Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial encapsulado em lipossomas**. Belo Horizonte, 2004, 125 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária. Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.

-----; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3/4, p. 320-325, Amsterdam, Jul. 2007.

COSTA, C. H.; *et al.* Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 99, p. 229-236, 2005.

COSTA, C. A., *et al.* Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, n.1, p. 21-25, 1991.

CRINGOLI, G.; *et al.* Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Veterinary parasitology**, v. 106, p. 307-313, 2002.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose visceral americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 32, p. 329-337, 1937.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.50, n.3, p.296-311, 1994.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 48, p. 151-156, 2006.

----- *et al.* Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 444-445, Set./Oct. 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 140, n. 1/2, p. 54-60, 2006.

----- . ***Rhipicephalus sanguineus* e a epidemiologia da leishmaniose visceral canina no Estado de Pernambuco**. 2009. Tese (Doutorado em Saude Pública) Fundação Oswaldo Cruz. Recife.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil, estudos sobre reservatório e transmissões realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. 1956.

DESJEUX, P. H. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DIETZE, R.; *et al.* Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

DOURADO, Z. F., *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n.3, p.205-214, set-dez 2007.

- DUJARDIN, J. C.; *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis. **Europe. Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, p.1013-1018, 2008.
- EVANS, D. Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 45, 1989.
- FEITOSA, M. M.; *et al.* Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, n. 28, p. 36-44, 2000.
- FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick. Canine leishmaniasis: an update, 1999. Barcelona, **Proceedings...** Barcelona, p. 6-10, 1999.
- Leishmaniasis. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D. **Current veterinary therapy: small animal practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 266-270, 1992.
- FERREIRA, E. C. **Estudo dos hospedeiros de Leishmania em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil**. Minas Gerais, 2010. Tese (Doutorado). Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.
- FISA, R.; *et al.* Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, p. 87-97, 1999.
- FORD DODGE SAUDE ANIMAL Ltda. **Manual Técnico Vacina Leishmune**, 51 p., 2004.
- FRANÇA-SILVA, J. C.; *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161-173, 2003.
- FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; MICHALICK, M. S. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1/2, p. 159-167, Amsterdam, Apr. 2006.
- GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Review Scientific and Technical Office International des Epizooties**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GALVEZ, R.; *et al.* Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in endemic areas of Maranhao, Brazil. **Cad Saude Pública**, v. 14, p. 381-390, 2010.

GENARO, O., *et al.* Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol. 23, p. 121-125, 1990.

----- **Leishmaniose visceral canina experimental**. Belo Horizonte, 1993, 146 p. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

GOMES, A. H. S.; *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 234–241, 2007.

GOMES, Y., *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet. J.**, v. 175, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, C. M. F. & MELO, M. N. Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRADONI, L. *et al.* *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. **Medicine Veterinary Entomology**, v. 1 n. 4, p. 339-342, 1987.

----- The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, v. 2, p. 21-24, 2002.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbial. Rev.**, vol. 6, p. 230-250, 1993.

GRAMÍCCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 86, p. 613-620, 1992.

-----; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Internatio. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

HARHAY, M. O., *et al.* Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.**, vol. 27, p. 403-409, 2011.

HARITH, A. *et al.* Application of a direct agglutination test for detection of specific-Leishmania antibodies in the canine reservoir. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2252-2257, 1989.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ; *et al.* Aspectos clínicos da la leishmaniosis canina. **Revista Ibérica Parasitologia**, v. extraordinário, p. 61-66, 1987.

HERTAPE CALLIER SAUDE ANIMAL Ltda. **Manual Técnico Vacina Leish-Tec®**. 36 p. 2009.

IKEDA, F. A. *et al.* Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo. **Clínica Veterinária**, n. 47, [s.n.], p. 42-48, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Região Sudeste Brasileira**. Localização de Juiz de Fora. [Juiz de Fora], 2005. ESCALA: 1:15 000 000.

JULIÃO, F. S.; *et al.* Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 319-324, 2007.

----- **Estudo epidemiológico de focos de leishmaniose visceral canina na região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil**. Salvador/Bahia, 2004. Dissertação (Mestrado na Saude Animal). Medicina Veterinária. Universidade Federal da Bahia.

KEENAN, C. M. *et al.* Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet Pathol**, v. 21, p. 74; 1984.

KILLICK-KENDRICK, R.; *et al.* Protection of dogs from bites of phebomotive sand flies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.** v. 11, p. 105-111, 1997.

KOUTINAS *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniosis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, [s.n.], p. 376-383, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis. In: COX, F.E.G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S.H.; DESPOMMIER, D.D. (Eds.), Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, 10 nd ed. **Parasitology**. London, Hodder Arnold, p. 313-349, 2006.

-----; READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian "uta", as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomya longipalpis*. **Proc. Royal Soc. of London Series B. Biological Science.**, v. 206, n. 1164, p. 307-318, 1979.

LANOTTE, G. *et al.* Écologie dès leishmanioses dans le Sud de La France. VIII Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques moyens dans la leishmaniose canine. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 50, p. 1-5, 1975.

LEONTIDES, L. S.; *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. Infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 19-27, 2002.

LIRA, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos.** Recife, 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

LOPEZ, R., *et al.* Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Journal Veterinary Medicine B*, v. 43, [s.n.], p. 469-474, 1996.

MADEIRA, M. F.; *et al.* Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the 106 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 442-445, Rio de Janeiro, 2006.

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

MANCIANTI, F.; *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection on different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 566-567, 1988.

MANNA, L.; *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, vol.125, p.251-262, Itália, jul 2004.

-----.; *et al.* Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1149, p. 358-360, 2008.

MARTINS, I. V. **Aspectos epidemiológicos e de hemostasia na leishmaniose visceral canina**. Pernambuco, 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

MARTIN-SANCHEZ, J.; *et al.* Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 15, p. 795-798, 2009.

MARZOCHI, M. C. A.; *et al.* Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical**, vol. 42, p. 570-580, 2009.

-----MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

-----; *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MATOS, M. M.; *et al.* Ocorrência da leishmaniose visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 51-54, 2006.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MEREDITH, S.; *et al.* Leish-KIT, a stable direct agglutination test base don freeze-dried antigen for serodiansis of visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1742-1745, 1995.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2^o edição atualizada, Editora MS, Brasília-DF, 2007.

-----Secretaria de Vigilância em Saude. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saude, 2005.

MIRET, J.; *et al.* Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f +MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, p. 1585-1594, 2008.

- MOLINA, R.; *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 4, n. 88, p. 491-493, Londres, 1994.
- MONTEIRO, E. M.; *et al.* Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infected in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 147-152, 2005.
- MORAIS, A. N.; *et al.* Leishmaniose visceral canina e doença de Chagas em cães de Araguaína, Tocantins. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 2, p. 225-229, Jaboticabal, 2013.
- MORAES, J. R. C. **Imunocromatografia, imunofluorescência indireta, ELISA e exame parasitológico “Pós Morten” no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais.
- MOREIRA, M. A. B; *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p.245-252, Araçatuba, 2007.
- MOREIRA Jr, E. D.; *et al.* Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Vet. Parasitol.**, v. 122, p. 245-252, 2004.
- Jr., E. D.; *et al.* Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393-397, 2003.
- MORENO, E.; *et al.* Epidemiologia da leishmaniose visceral humana assintomática em área urbana, Sabará, Minas Gerais, 1998-1999. **Inf. Epidemiol. SUS**, v. 11, p. 37-39, 2002.
- ; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **T. Parasitol.**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.
- ; *et al.* Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 456-463, 2005.
- NAVEDA, L. A. B.; *et al.* Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 988-993, 2006.

-----. **Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003**. Belo Horizonte, 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária da UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais.

NEOGY, A.; *et al.* Serodiagnostics and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 772-777, 1992.

NIETO, C. G.; *et al.* Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, [s.n.], p. 33-47, 1992.

NOGUEIRA, J. L.; *et al.* A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde pública: uma zoonose reemergente. **Rev. Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 13, ano VII, p. 12, 2009.

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

OLIVEIRA, F. S.; *et al.* PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 129, p. 219-227, 2005.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Lucha contra las leishmaniasis. **Serie de Reports Técnicos**, 193. Ginebra, 1990; p. 29-32.

OWENS, S. D.; *et al.* Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, Schaumburg, Oct. 2001.

PALATINIK-DE-SOUZA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Front Immunol**, vol. 3, p. 69-64, 2012.

----- Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 69, p. 1-15, 2012.

PILATTI, M. M.; *et al.* Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Res. Vet. Sci.** v. 87, n. 2, p. 255-7, 2009.

-----. **Comparação de quatro métodos de PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras coletadas por SWAB conjuntival**. Belo Horizonte, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências e

Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais). Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. Comissão Nacional de Energia Nuclear.

PINHEIRO, I. P.; *et al.* First inventory of the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in the municipality of Juiz de Fora, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras. Med. Trop.**- artigo aceito para publicação.

PORTARIA INTERMINISTERIAL n. 1426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PORROZZI, R.; *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infection in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 544-548, 2007.

PRADO, P. F.; *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral humana e canina em Montes Claros, Estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2007 e 2009. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p. 561-566, set-out, 2011.

QUINNELL, R. J.; *et al.* IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol Immunopathol**, v. 10, p. 161-168, 2003.

REALE, S.; *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.9, p.2931-2935, Palermo, set 1999.

REIS, A. B.; *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, vol. 8, p. 68-75, 2006.

----- . **Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção.** Belo Horizonte, 2001, 180 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REITHINGER, R.; *et al.* Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia) spp.* in domestic dogs (*Canis familiaris*). **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1486-1493, 2003.

-----; *et al.* Rapide detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic didstick test, Enzyme-linked Immunosorbent Assay, and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

-----; *et al.* Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55-62, 2004.

RIBEIRO, R. R.; *et al.* Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 2564-2572, 2008.

ROUGIER, S.; *et al.* Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. **Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 244-252, 2008.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – A systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-17, 2010.

-----; *et al.* Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. **Acta Tropica**, v.109, p. 74-77, 2009.

RONDON, F. C. M. **Estudo transversal da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil**. Fortaleza, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária). Universidade Estadual do Ceará.

ROSÁRIO, E. Y., *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

SANCHES, J. M.; *et al.* Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. **Parasitology**, v. 122, p. 607-615, 2001.

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

SANTOS-GOMES; *et al.* Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, [s.n.], p. 21-30, 2002.

SARAIVA, L.; *et al.* Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodida: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 46, p. 1159-1163, 2009.

SAVANI, E. S. M.; *et al.* The finding of *Lutzomya almeriori* and *Lutzomya longipalpis* naturally infected by *Leishmania spp.* in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 24, p. 160-18, 2009.

SCALONE, A.; *et al.* Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, n. 104, p.275-285, 2002.

SCHALLIG, H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; SILVA, E. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1015-1018, 2002a.

-----.; *et al.* Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 109, p. 1-8, 2002b.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAUDE, Ministério da Saude. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina, Brasília/DF, 2009. Disponível em: <www.saude.org.br/sv> Acesso em: 18 de out. 2013.

SHAW, J. J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SHERLOCK, I. Notas sobre a transmissao da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, n.1, p. 19-26, Rio de Janeiro, 1964.

SIDERIS, V.; *et al.* Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. **Parasite** (Paris, France), v. 3, p. 125-130, 1996.

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

-----; SIVAKUMAR, R. R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J. Postgrad. Med.**, v. 49, p. 55-60, 2003.

SILVA, A. V. M.; *et al.* Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Caderno de Saude Pública**, vol. 21, p. 324-328, 2005.

SILVA, F. L.; *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1/2, p. 55-59, Amsterdam, Mar. 2009.

-----; *et al.* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1/2, p. 55-59, Amsterdam, Mar. 2009.

SILVA-LOPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Quim. Nova**, vol. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SILVA, M. R.; *et al.* Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic área: Bom Sucesso, Minas Gerais. **Caderno Saude Pública**, vol. 24, p. 81-286.

SILVA, M. V. **Avaliação de testes sorológicos para leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel filtro**. 2005. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

SILVA, R. S.; SANTA ROSA, I. C. A. Levantamento de leishmaniose visceral canina em Bom Sucesso, Minas Gerais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 69-74, 2005.

-----, *et al.* Short report: detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 896-898, 2001a.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmanis* species. **Trends in Parasitol.**, v. 21, p. 550-552, 2005.

-----; *et al.* Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n.3, p.285-291, Rio de Janeiro, abr 2001a.

-----; *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communications**, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 637-643, 2006.

-----; *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Veterinary Research Communications**, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 637-643, 2006.

SILVA, E. F. P. **Inquérito sorológico de leishmaniose canina na cidade de Rio Verde-GO**. Campo Grande, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saude) Universidade de Rio Verde.

SILVA, S. M.; *et al.* First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 174, p. 150-154, 2010.

SOARES, M. R.; *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Acta Trop.**, v. 117, p. 6-9, 2011.

SOLANO-GALLEGU, L.; *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasit Vectors. The LeishVet Group**, v. 20, p. 4-86, 2011.

-----; *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, n. 165, p. 1-8, 2009

-----; BANETH, G. Canine leishmaniasis – a challenging zoonosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 18, p. 232-241, 2008.

-----; *et al.* Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p.560-563, fev 2001.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine visceral leishmaniasis. In: Recent advances in canine infectious diseases. **Int. Vet. Inf. Serv.** New York, 2000.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 951-958, 2002.

----- S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 6, p. 849-854, 2001.

----- S.; *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v. 31, p. 1104-1107, 2000.

TAFURI, W. L.; *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

-----, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnostic of leishmaniasis. **Expert Review Molecular Diagnosis**, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.

TRAVI, B. L.; *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3-4, p. 119-124, 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. Centro de Pesquisas Sociais. **Anuário Estatístico de Juiz de Fora**. Juiz de Fora, 2009. 13 p.

VITAL-COURA, W. **Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção**. Belo Horizonte, 2011. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

VOLLER, A.; BIDWELL, W.H.; ARJONA, I. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): guide with abstracts of microplate applications. **Guerney: Dynatec Europe**, p. 124, 1979.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Report for Research on Infectious Diseases of Poverty**. ISBN 978 92 4 156 448 9, 2012a.

----- Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. WHO technical report series no. 949.

----- First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, p. 172, Geneva, 2010.

XAVIER, S. C. **Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Minas Gerais, 2002, 46 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

ZAFFARONI, E.; *et al.* Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 11-19, 1999.

ANEXOS



EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Mangunhos (USO VETERINÁRIO)

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
(material fornecido para 384 reações)

INDICAÇÃO DE USO

O Kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Mangunhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major* *like*, em soros ou plasmas de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE

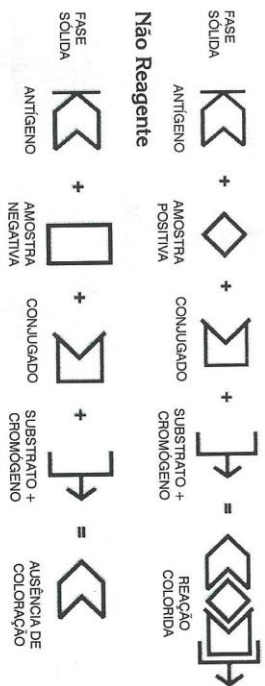
O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de micropilacas/ "strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para micropilaca em comprimento de onda de 450 nm.

2

ESQUEMA DO TESTE



MATERIAL FORNECIDO

Componentes

Diluyente Amostras/ Conjugado [5X]	02 frascos com 45 mL
Lectina de leite	01 saco - 10 g
Tampão de lavagem [20X]	02 frascos com 60 mL
Diluyente do Substrato	01 frasco com 60 mL
Cromógeno (TMB)	01 frasco com 0,7 mL
Substrato H ₂ O ₂	01 frasco com 0,2 mL
Ácido Sulfúrico 2M	01 frasco com 30 mL
Controle Positivo	01 frasco com 0,25 mL
Controle Negativo	01 frasco com 0,25 mL
Conjugado	01 frasco com 0,4 mL
Molduras com 6 "strips dupla sensibilizadas"	04 unidades
Folhas adesivas	08 unidades
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Barquetes ou reservatórios;
- Estufa a 37 °C;
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou

3

- lavador automático de microplacas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
 - Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm.
 - Balança semi-analítica;
 - Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6 mm.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES

Mantém entre 2° e 8°C: Diluente de amostra/conjugado [5X], Lectina de leite, Tampão de lavagem [20X], Diluente do Substrato, Corrógeno (TMB), Substrato H_2O_2 e Ácido Sulfúrico 2M.

Mantém a -20°C: Controle Positivo, Controle Negativo, Conjugado e "Strip" Sensibilizada. Todos os componentes do kit devem ser conservados nas respectivas temperaturas indicadas em seus rótulos, desde o ato do recebimento até a validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: De acordo com estudos realizados em Bio-Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições estáveis durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observar as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende

- do cumprimento às boas práticas de laboratório, tais como:
- As amostras e os soros controles devem ser manipulados com cuidado;
 - Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
 - Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial, em todas as etapas do teste.
 - Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
 - Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
 - Aconselha-se só utilizar componentes do mesmo conjunto.

4

- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte interna das strips;
- Cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- Soluções contendo TMB e/ou peroxidase são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- Não usar os componentes após sua data de vencimento;
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Os componentes do kit armazenados na temperatura de 2 a 8 °C, assim como os componentes armazenados na temperatura de -20 °C, soros controles e as strips sensibilizadas, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retornando-os à temperatura logo após o uso.

Importante: Retirar apenas a quantidade de "Strips" a serem utilizadas no teste.

O conjugado deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento da sua utilização, sem a necessidade de descongelamento retornando para conservação imediatamente, após seu uso.

Importante: Este insumo não tolera variações de temperatura, evitar prolongar sua permanência fora da temperatura de -20 °C.

1- Preparo do diluente de amostras/conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lectina de leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	Até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	Até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	Até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2- Diluir em tubos, 5 µL dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100)..

5

3- Distribuir na placa sensibilizada, 100 µL dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma: na coluna 1 fileiras "A" e "B" o controle positivo; na "C", "D" e "E" o controle negativo; "F" e "G" sem soro (controle do conjugado - SS). Nos demais orifícios, distribuir 100 µL das amostras testes, já diluídas nos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
CP	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
B	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
CP	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
C	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
CN	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
D	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
CN	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
E	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
CN	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
F	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
SS	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
G	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
SS	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
H	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89	97

CP = Controle Positivo | CN = Controle Negativo | SS = Sem Soro

4- Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37°C ± 1 °C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

5- Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37°C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	Até 16	2 mL	38 mL
02	Até 32	3 mL	57 mL
03	Até 48	4 mL	76 mL
04	Até 64	5 mL	95 mL
05	Até 80	7 mL	133 mL
06	Até 96	8 mL	152 mL

6

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº STRIPS duplas	nº PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
Até 3	1/2	20 mL	380 mL
Até 6	1	25 mL	475 mL
Até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
Até 12	2	35 mL	665 mL
Até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
Até 18	3	45 mL	855 mL
Até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
Até 24	4	55 mL	1045 mL

6- Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

7- Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluyente de Amostras/ Conjugado diluído	Conjugado
01	Até 16	5 mL	5 µL
02	Até 32	5 mL	5 µL
03	Até 48	10 mL	10 µL
04	Até 64	10 mL	10 µL
05	Até 80	15 mL	15 µL
06	Até 96	15 mL	15 µL

8- Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.

9- Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C ± 1 °C por 30 min.

Aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10- Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz).

7

11- Preparo do substrato:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluinte do Substrato	Cromógeno TMB	Substrato H ₂ O ₂
01	Até 16	2,5 mL	25 µL	5 µL
02	Até 32	4 mL	40 µL	8 µL
03	Até 48	6 mL	60 µL	12 µL
04	Até 64	8 mL	80 µL	16 µL
05	Até 80	10 mL	100 µL	20 µL
06	Até 96	12 mL	120 µL	24 µL

12- Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

13- Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min.

14- Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

LEITURA

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos, para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca de teste) e, em seguida, iniciar a leitura.

Obs.: Caso a leitura seja feita com filtro de 450 nm, tendo como referência outro de 620-630 nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do *cut-off* e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.

Para o cálculo do *cut-off* deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos **dentro da faixa de validação do teste**. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

- Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO
 - Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO
- Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do Cut-Off (CO)

$$CO = XCN \times 2$$

XCN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.

DO = densidade ótica

CN = controle negativo

Exemplo 1: $\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$

$$DO\ CN1 = 0,100$$

$$DO\ CN2 = 0,098$$

$$DO\ CN3 = 0,101$$

$$CO = XCN \times 2 = 0,099 \times 2 = 0,199$$

Exemplo 2:

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$$

$$DO\ CN1 = 0,110$$

$$DO\ CN2 = 0,090$$

~~DO CN3 = 0,131~~ Fora da faixa de validação do teste = descartar.

$$CO = XCN \times 2 = 0,100 \times 2 = 0,200$$

Exemplo 3:

$$\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$$

$$DO\ CN1 = 0,110$$

$$DO\ CN2 = 0,080$$

~~DO CN3 = 0,040~~ Fora da faixa de validação do teste = descartar.

$$CO = XCN \times 2 = 0,095 \times 2 = 0,190$$

Cálculo da Faixa Cinza (FC):

$$FC = CO \times 1,2$$

$$\text{Exemplo: } CO = 0,322$$

$$FC = CO \times 1,2$$

$$FC = 0,322 \times 1,2$$

$$FC = 0,386$$

CO

AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS
-----------------------	-------------	-------------------

RESULTADOS

- **Amostras reagentes** = As que apresentarem densidade ótica **igual** ou superior ao *Cut-Off*.

- **Amostras não reagentes** = As que apresentarem densidade ótica inferior ao *Cut-Off*.

- **Amostras indeterminadas** = As que apresentarem densidade ótica entre o *cut-off* e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o *Cut-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como **INDETERMINADO**.

Obs. 3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS COLHIDAS EM PAPEL FILTRO

1 - Preparo do diluente de amostras/conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado [5X]	Lectina de leite (pesar)	H ₂ O destilada
01	Até 16	3 mL	0,3 g	12 mL
02	Até 32	6 mL	0,6 g	24 mL
03	Até 48	8 mL	0,8 g	32 mL
04	Até 64	10 mL	1 g	40 mL
05	Até 80	12 mL	1,2 g	48 mL
06	Até 96	14 mL	1,4 g	56 mL

2 - Em tubos previamente descontaminados, limpos e secos, colocar 2 picotes (6 mm) de cada amostra coletada em papel de filtro Whatman nº1 ou 1 picote (6 mm) para papel filtro Klabin 80 e nos tubos correspondentes.

3 - Adicionar 400 µL de diluente de amostra/conjugado, por tubo, para as amostras coletadas em papel Whatman nº1 ou 500 µL de diluente para amostras coletadas em papel Klabin 80.

4 - Colocar a estante de tubos em agitador rotacional para eluir as amostras coletadas em papel de filtro. Deixar eluir durante a noite na geladeira ou agitar 1 hora no agitador, rotação de 50 Rpm a 125 Rpm.

5 - Diluir em tubos, 5 µL dos soros controle positivo e negativo, previamente homogeneizados, em 500 µL do diluente de amostra/conjugado (1:100).

6 - Distribuir na placa sensibilizada 100 µL dos controles e das amostras eluídas da seguinte forma: na coluna 1 fileira "A", "B", o soro controle positivo, na "C", "D", "E" o controle negativo, na "F" e "G", somente o diluente da amostra/conjugado (sem soro). Nos outros orifícios, distribuir 100 µL das amostras teste já eluídas, seguindo o protocolo abaixo:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 2	Amostra 10	Amostra 18	Amostra 26	Amostra 34	Amostra 42	Amostra 50	Amostra 58	Amostra 66	Amostra 74	Amostra 82
B	Amostra 3	Amostra 11	Amostra 19	Amostra 27	Amostra 35	Amostra 43	Amostra 51	Amostra 59	Amostra 67	Amostra 75	Amostra 83
C	Amostra 4	Amostra 12	Amostra 20	Amostra 28	Amostra 36	Amostra 44	Amostra 52	Amostra 60	Amostra 68	Amostra 76	Amostra 84
D	Amostra 5	Amostra 13	Amostra 21	Amostra 29	Amostra 37	Amostra 45	Amostra 53	Amostra 61	Amostra 69	Amostra 77	Amostra 85
E	Amostra 6	Amostra 14	Amostra 22	Amostra 30	Amostra 38	Amostra 46	Amostra 54	Amostra 62	Amostra 70	Amostra 78	Amostra 86
F	Amostra 7	Amostra 15	Amostra 23	Amostra 31	Amostra 39	Amostra 47	Amostra 55	Amostra 63	Amostra 71	Amostra 79	Amostra 87
G	Amostra 8	Amostra 16	Amostra 24	Amostra 32	Amostra 40	Amostra 48	Amostra 56	Amostra 64	Amostra 72	Amostra 80	Amostra 88
H	Amostra 9	Amostra 17	Amostra 25	Amostra 33	Amostra 41	Amostra 49	Amostra 57	Amostra 65	Amostra 73	Amostra 81	Amostra 89

CP = Controle Positivo | CN = Controle Negativo | SS = Sem Soro

7- Selar os "strips" com a folha adesiva e incubar a 37° C ± 1 °C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

8- Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37° C até a dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	Até 16	2 mL	38 mL
02	Até 32	3 mL	57 mL
03	Até 48	4 mL	76 mL
04	Até 64	5 mL	95 mL
05	Até 80	7 mL	133 mL
06	Até 96	8 mL	152 mL

12

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

nº STRIPS duplas	nº PLACAS	Tampão de Lavagem [20X]	H ₂ O destilada
Até 3	1/2	20 mL	380 mL
Até 6	1	25 mL	475 mL
Até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
Até 12	2	35 mL	665 mL
Até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
Até 18	3	45 mL	855 mL
Até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
Até 24	4	55 mL	1045 mL

9- Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

10- Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluente de Amostras/ Conjugado diluído	Conjugado
01	Até 16	5 mL	5 µL
02	Até 32	5 mL	5 µL
03	Até 48	10 mL	10 µL
04	Até 64	10 mL	10 µL
05	Até 80	15 mL	15 µL
06	Até 96	15 mL	15 µL

11- Homogeneizar e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício dos strips.

12- Selar "os strips" com folha adesiva e incubar a 37°C ± 1 °C por 30 min.

Aspirar e lavar conforme descrito no item 9.

13- Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro (ao abrigo da luz).

13

14- Preparo do substrato:

nº STRIPS duplas	nº REAÇÕES	Diluinte do Substrato	Cromógeno TMB	Substrato H ₂ O ₂
01	Até 16	Substrato 2,5 mL	25 µL	5 µL
02	Até 32	4 mL	40 µL	8 µL
03	Até 48	6 mL	60 µL	12 µL
04	Até 64	8 mL	80 µL	16 µL
05	Até 80	10 mL	100 µL	20 µL
06	Até 96	12 mL	120 µL	24 µL

15- Distribuir 100 µL do substrato rapidamente em todos os orifícios.

16- Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 min.

17- Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

LEITURA

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos, para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca de teste) e, em seguida, iniciar a leitura.

Obs.: Caso a leitura seja feita com filtro de 450 nm, tendo como referência outro de 620-630 nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do *cut-off* e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio. Para o cálculo do *cut-off* deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles positivos baixo e dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

14

- Controle Positivo: $\geq 0,500$ de DO
 - Controle Negativo: $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO
- Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do *Cut-Off* (CO)
 $CO = XCN \times 3$

XCN = média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo.
 DO = densidade ótica
 CN = controle negativo

Exemplo 1:
 $DO\ CN1 \pm DO\ CN2 + DO\ CN3 = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$

DO CN1 = 0,100
 DO CN2 = 0,098
 DO CN3 = 0,101

CO = XCN x 3 = 0,099 x 3 = 0,297

Exemplo 2:
 $DO\ CN1 \pm DO\ CN2 = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$

DO CN 1 = 0,110
 DO CN 2 = 0,090

BØ-ØN3 = Ø-ØØØ Fora da faixa de validação do teste = descartar.

CO = XCN x 3 = 0,100 x 3 = 0,300

Exemplo 3:
 $DO\ CN1 \pm DO\ CN2 = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$

DO CN 1 = 0,110
 DO CN 2 = 0,080

BØ-ØN3 = Ø-ØØØ Fora da faixa de validação do teste = descartar.

CO = XCN x 3 = 0,095 x 3 = 0,285

Cálculo da Faixa Cinza (FC):
 $FC = CO \times 1,2$

Exemplo: CO = 0,322

FC = CO x 1,2

FC = 0,322 x 1,2

FC = 0,386

15

CO		
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA	AMOSTRAS REATIVAS

RESULTADOS

- Amostras reagentes = As que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao *Cult-Off*.
- Amostras não reagentes = As que apresentarem densidade ótica inferior ao *Cult-Off*.
- Amostras indeterminadas = As que apresentarem densidade ótica entre o *cult-off* e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentaram densidade ótica na "faixa cinza", considerada neste teste, entre o valor obtido para o *Cult-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na "faixa cinza" após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como INDETERMINADO.

Obs.3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP). Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de Leishmania Visceral Americana (LVA) dos quais foram coletadas amostras de soro e amostras coletadas em papel de filtro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no EIE. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard"), e os seguintes índices foram encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76%. Já para as amostras coletadas em papel de filtro os índices de sensibilidade e especificidade foram de 79,45% e 90,24% respectivamente.

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE

Diversos estudos foram realizados em nossos laboratórios utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões nos permitiram determinar um período mínimo de 6 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad.S.Pub. RJ*; 2004; 20(1)jan-fev: 259-285.
2. ASFORD, D.A. BADARÓ, R. EULALIO, C. Et Al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FASTEIA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Amer.J.Trop.Med. Hyg.* 1993;Jan;48(1):1-8.
3. BADARÓ, R. DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R. FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 2ed. 2002; 1254-79
4. BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72.
5. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2003; 527-539.
6. CARVALHO, F.A.A. CHAREST, H. TAVARES, C.A.P. Et Al. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant Leishmania donovani A2 antigen. *Diag. Microb. And Infect. Disease*. 2002; 43: 289-295
7. CUBA, C.A. MARSDEN, P.H.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPAIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Of sanit. Param.* 1980; 89: 95-208.
8. MEDRONHO, R.A. Et Al. *Epidemiologia*. 2003. Cap 18;p 259-270.
9. MONTÓYA, A. CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labelled Immunoglobulins for use in enzyme Immunoassay. *J. Immun. Meth.* 1978; 99: 13-20.
10. MORENO, J. ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(9): 399-405.
11. NAKANE, P.K. KAWAMI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. *J. Histochem Cytochem*. 1974; 22(12):1084-1091.
12. PAPPAS, M.G. HAJKOSWSKI, R. HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme linked immunosorbant assay (DOT- LISA) : a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Method*. 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.
13. REITHINGER, R. DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitology*. 2002; 18(7): 289-290.

Licenciado no Min. da Agricultura sob o nº 8968/04, em 22/09/2004.
 Resp. Tec. Méd. Vet.: Adenauer Cruz Teixeira | CRMV-RJ nº 1.359

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
 Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos FIOCRUZ
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro-RJ
 CNPJ 33.781.055/0015-30
 SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
 Indústria Brasileira

**ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
 MODELO DE PROTOCOLO**

Produto: _____ Partida nº: _____ Venc.: ____/____/____
 Segão: _____ EIE nº: _____ Data: ____/____/____
 Início: ____ h ____ min Término: ____ h ____ min

Disposição das amostras:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Densidade ótica das amostras:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo do Cut-Off (CO)

CO = XCN x 2

XCN = média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo.

X = médias das DO

DO = densidade ótica.

CN = controle negativo.

$$CO = \frac{DO_{CN1} + DO_{CN2} + DO_{CN3}}{3} = \frac{XCN}{2} = X$$

Técnico Responsável: _____
 Observações: _____

**ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
MODELO DE PROTOCOLO**

Produto: _____ Partida nº: _____ Venc.: ____/____/____
 Sessão: _____ EIE nº: _____ Data: ____/____/____
 Início: ____ h ____ min Término: ____ h ____ min

Disposição das amostras:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Densidade ótica das amostras:

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo do Cut/Off (CO)

CO = $\frac{XCN \times 3}{3}$ CO = $\frac{DO\ CN1 + DO\ CN2 + DO\ CN3}{3} = \frac{XCN}{3} = X$
 XCN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.
 X = médias das DO
 DO = densidade ótica.
 CN = controle negativo.

Técnico Responsável: _____

Observações: _____

5) Vitar o fiasco de tampão mantido na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 2 (TRAPVAO), Adicionar 4 (quatro) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 2 (TRAPVAO).



10) Deixar o teste correr por 10 (dez) minutos a temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 (três) minutos, descartar o teste.
11) Leitura do teste: - Não ler os resultados após 25 minutos de adição do tampão de corado ao poço # 2 (TRAPVAO).

Leitura Visual

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50 cm entre o suporte do teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e ler o resultado do teste.

Leitura com Equipamento – Leitor de Testes DPP®

Alternativamente pode-se fazer a leitura dos testes DPP® com equipamento específico. Seguir as instruções de uso do equipamento para obtenção do resultado.

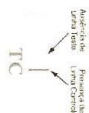
ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados podem ser interpretados tanto visualmente ou com a ajuda de um leitor DPP®. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

Um resultado não reagente é indicado por uma linha reativa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para Leishmania na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por Leishmania.



Resultado REAGENTE

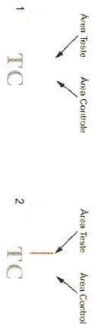
A detecção de duas linhas reativas, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A presença da linha na área de TESTE (T) varia de claro a escuro em função da reação de aglutinação dos sorpos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ser aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C), isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para Leishmania foram detectados.

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do Ministério da Saúde.



Resultado INVALIDO

Uma linha reativa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independentemente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha reativa não seja visível na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido não pode ser interpretado. Separar o material e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE
Ao término do teste, uma linha reativa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras reativas quanto nas positivas. Essa linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado com soro, plasma ou sangue total venoso.
- Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que não citrato, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anticoagulante.
- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado seguindo as instruções contidas neste manual visando o objetivo de fins específicos.
- Não utilizar o teste em, no máximo, 25 minutos.
- Somente utilizar o teste com o suporte do teste no momento de sua utilização.
- Um resultado reativo não exclui a possibilidade de infecção por Leishmania na amostra testada.
- Um resultado não reativo não exclui a possibilidade de infecção por Leishmania na amostra testada.
- Uma resposta humoral a uma infecção recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.
- Uma amostra infectada com Leishmania que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e a especificidade para Leishmania foram determinadas pela avaliação da capacidade do teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos de detectar anticorpos específicos para Leishmania em amostras clínicas de cães. Comparado ao teste parasitológico, para estas amostras, o teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 98,3% (167/171), sendo 1 amostra indeterminada. Quando comparado ao teste IIE (Bio-Manguinhos), para amostras de cães sem suspeita de leishmaniose, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou uma especificidade de 97,4% (172/176), sendo 6 amostras indeterminadas.

REPRODUTIBILIDADE, REPEITIVIDADE E ESTABILIDADE

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas a simplicidade e rapidez na utilização do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para a evidencição da infecção por Leishmania.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. The UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). www.int.who/diseases/trt/diseases/trt/diseases.htm, 2002.
2. CDC. Division of Parasitic Diseases. www.cdc.gov/nczod/dpdx/parasiticdisease/leishmania.htm, 2004.
3. PALATNIK/DE-SOUSA, C.B., dos Santos, W.R., France Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W., Genaro, O. Impact of Gamme Control of the Epidemiology of Gamme and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*; 65: 510-517, 2001.
4. SHEPHERD, J.P.X., David, J.R., Fretter, M., David, R., Sherlock, I., da Conceição Eulálio, M., Sampaio, D. *Am J Trop Med Hyg*; 65: 100-106, 2001.
5. HENNINGER, R., Ginnari, R.J., Alexander, B., Davies, C.R. Rapid Detection of Dog and Human Infection in Dogs: Comparative Study Using and Immunochromatographic Dipstick Test. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and PCR. J Clin Microbiol*; 40: 2352-2356, 2002.
6. DUD ROSARIO, E.Y., Genaro, O., France-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mern Inst Oswaldo Cruz*; 100: 197-203, 2005.
7. POKROZNI, R., Santos da Costa, M.V., Tava, A., Riquelme, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gennari, R.T., Campos-Hara, A., Ginnari, G.J. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant Leishmania antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infantum visceral infections in dogs. *Chimicae Immunol*; 14: 544-548, 2007.

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos | Bio-Manguinhos | FIOCRUZ
Av Brasil, 4305 - Manguinhos - CEP 21040-900 | Rio de Janeiro RJ | CNPJ 33.701.059/0001-35
SAC: 0800.0210.310 | sac.reactivos@biofio.org.br | www.biofio.org.br
Indústria Brasileira

Art. 1º - INSTRUÇÃO Nº 058-R-1997Z, Tabela III, DPP, LTC 20, 21
OBS: ARTIE EM APROVAÇÃO | FORMATO ORIGINAL, A3



TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA LEISHMANIA (Material fornecido para 20 determinações)



TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos
(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CAUSA PARA LEISHMANIA (material fornecido para 20 determinações)

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunoenzimológico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para Leishmania em soro, plasma, sêrum, soroquilo, urina, etc.

O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros critérios. O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um protozoário parasita do gênero Leishmania. Essa doença é endêmica em 88 países, totalizando 350 milhões de pessoas. A Leishmania está presente em áreas densas e floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos no Oeste da Ásia, com mais de 90% de todos os casos de leishmaniose visceral (LV) ocorridos em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil. Há cerca de 500.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana^{1,2}. Entre os anos de 1984 a 1993, 37.294 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde³.

A LV algumas vezes referida como Kalazar é uma doença crônica e potencialmente fatal se não tratada antes do aparecimento de sintomas. Sinais clínicos da doença incluem indisposição, anemia, febre, perda de peso e inchaço no bço, fígado e glândulas linfáticas⁴.

A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de flebotomíneos através de protetores como vestuário, repelentes ou inseticidas. Tratamentos para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de antimonial pentavalente ou estiboglucolato de sódio.

A LV é uma zoonose na qual os cães podem não só implicados como importantes reservatórios para o parasita^{5,6}. A transmissão aos humanos ocorre pela picada do flebotomo fêmea infectada. Programas de controle para LV incluem a eutanásia de cães infectados identificados através de teste sorológico. Esse procedimento tem provado ser uma importante etapa do controle empregado no Brasil⁷.

Vários ensaios como a imunofluorescência, hemaglutinação, PCR e ELISA encontram-se atualmente em uso para esse diagnóstico^{8,9} e os antígenos recombinantes são ferramentas apropriadas para melhorar os métodos de diagnóstico sorológico atuais para leishmaniose visceral canina (LVC).

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um ensaio de triagem imunoenzimológico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para Leishmania, em cães. É rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2 a 30°C).

PRINCÍPIO DO TESTE

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para Leishmania. Em seguida, reage com antígenos recombinantes de Leishmania ligadas a uma membrana (fase sólida).

A amostra é aplicada ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço #2 (TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para Leishmania produzindo uma linha (corações) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para Leishmania a linha (corações) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (corações) na área do CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

MATERIAL FORNECIDO

Supporto/Papel contendo Antígenos de Leishmania e o Conjugado de ouro coloidal dessecado em Membranas Especiais	20 unidades
Tampão de Corrida	01 frasco (6 mL)
Alças Coloridas Descartáveis (CAL)	20 unidades
Lancetas Estéreis Descartáveis	20 unidades
Manual de Instrução de Uso	01 unidade
MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO	
- Contorno ou relâmpo	
- Micropipeta calibrada para 5 µL (como alternativa à alça colorida)	
- Luvas descartáveis	

- Receptivo seguro para descarte de material biológico
- Alcool 70%

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos deve ser armazenado entre 2 e 30°C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30°C. Não congelar o kit ou os seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer fechados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original. Caso o kit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso veterinário.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observar as precauções de biossegurança necessárias. A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

- O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde, segundo as instruções contidas neste manual;
- Não realizar mais de 5 testes por vez. Esta conduta reduz fálhas no procedimento do teste, bem como na interpretação dos resultados;
- As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso;
- As amostras de sangue não testadas imediatamente após a coleta, devem ser refrigeradas entre 2 e 8°C, podendo ser usadas em até 3 dias;
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas entre 2 e 8°C por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro desse período, as amostras devem ser congeladas (-20°C ou abaixo);
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após a data de validade;
- Equipamentos de kits de testes diferentes nunca devem ser misturados;
- Componentes de kits de testes diferentes não são sempre de uso específico. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso alguns dos componentes do kit demonstrar irregularidade, separe o kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos.
- Nunca fracionar os kits;
- Não pipetar sangue diretamente no suporte de teste. Utilizar sempre a alça colorida fornecida no kit, seguindo as orientações abaixo (ver Procedimento do teste).
- Cuidado ao adicionar a amostra: a água deve ser manida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício ou poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO) do suporte de teste;
- Cuidado no adiamento do tampão de corrida: o fôlego deve ser mantido em posição vertical e apenas duas gotas do líquido devem ser dispensadas ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO) do suporte de teste onde se encontra a amostra;
- Aguardar cinco minutos e somente após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionar quatro gotas do tampão de corrida ao poço #2 (TAMPÃO).

ATENÇÃO: Alguns resultados reagentes podem aparecer em menos de 10 minutos, mas são necessários 10 minutos para detectar um resultado não-reativo. Ler os resultados em ambiente bem iluminado. Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço #2 (TAMPÃO).

- Após o uso, suportes, ponteiros, lancetas, alças coloridas e luvas devem ser descartadas em água sanitada ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% como material biológico potencialmente infeccioso.

COLETA DE AMOSTRA

ATENÇÃO: para o perfilho funcionamento do teste, usar 5 µL de amostra e seguir as instruções de procedimento do teste.

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostra de soro, plasma ou sangue total venoso.

Sanguine Total

Utilizar a lanceta para obter sangue a partir da orelha, patas ou rabo do animal. Para teste imediato utilizar as alças coloridas.

Sanguine Total Venoso

Coletar o sangue assepticamente nos tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Centrifuge-se que tubo de sangue fal bem misturado antes da punção. Siga cuidadosamente o procedimento do teste obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para obter hemólise.

Soro

Plasma

Coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA - BIO-MANGUINHOS

1. Certifique-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra esteja sendo refrigerada ou congelada, permitir que a mesma atinja a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Realizar o número necessário de componentes do TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO - MANGUINHOS e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam à temperatura ambiente no momento do uso.

3. Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.

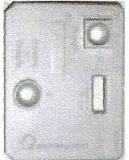
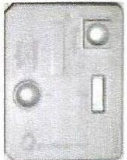
4. Verificar a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas na janela de teste do suporte, sendo 1 (uma) de cor azul e 1 (uma) de cor verde. Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separar o suporte de teste para que não seja usado e comunicar o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

5. Enfiar a alça colorida de 5 µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µL.

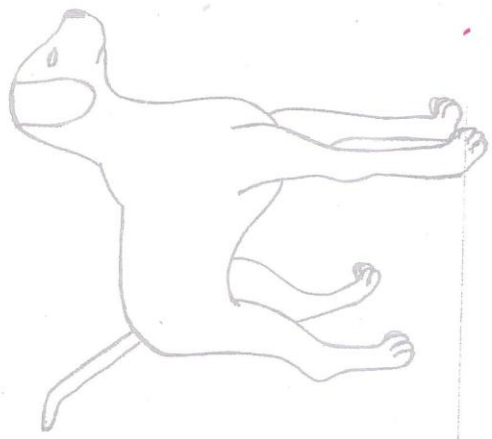
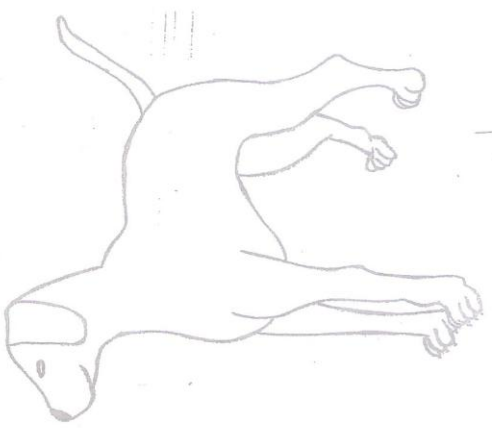
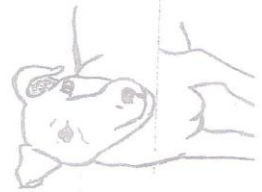
6. Segurar a alça colorida na posição vertical e tocar na área de aplicação da amostra, poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO) do suporte para liberar 5 µL de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou (correu) do alto para o local do teste.

7. Virar o frasco de tampão e manter na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO). Adicionar 2 (duas) gotas de tampão, lentamente, ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPAO).

8. Aguardar 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.



APÊNDICE A

RESENHA	ANIMAL	PARTICULARIDADES / DESCRIÇÃO
		

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO CLÍNICO SEMIOLÓGICO

CLÍNICA

Alterações de pele Descrição:	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Onicogribose	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Conjuntivite	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Edema de Patas	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Paresia de Posteriores	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Hemorragias Descrição:	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Hepatomegalia	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Esplenomegalia	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Alterações de linfonodo Descrição:	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Febre	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Coloração de mucosas	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Diarréia	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente
Coriza	() Leve () Moderado () Severo	() Ausente

APÊNDICE C**SEMIOLÓGICO**

Temperatura: _____

Palpação: _____

Percussão: _____

Auscultação: _____

Desidratação: _____

() Leve () Moderada () Severa

Mucosas : _____

() Hipocorada () Normocorada () Hiperacorada

APÊNDICE D**AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS / ANAMNESE****QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO****NOME:****NOME DO PROPRIETÁRIO:****DATA DO NASCIMENTO DO ANIMAL:****RAÇA:****SEXO:****LOCAL DE NASCIMENTO:****DESLOCAMENTO(S) DO ANIMAL:****DATA(S) DE DESLOCAMENTO(S):****CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS**

APÊNDICE E**ANAMNESE**

Alterações de Saúde:
Diagnóstico:

Uso de medicamentos:
Quais:

Vacinação contra Leishmaniose:
Nº de doses e datas:

APÊNDICE F**CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal


CERTIFICADO –


Certificamos que o Protocolo nº 03/2010 – CEEA sobre “Inquérito epidemiológico de leishmaniose visceral canina em Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Elaine Soares Coimbra, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/02/2010.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 03/2010 - CEEA about “Inquérito epidemiológico de leishmaniose visceral canina em Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil” – Elaine Soares Coimbra - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/02/2010.

Juiz de Fora, 02 de Fevereiro de 2010

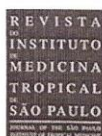

Presidente/CEEA


h/Secretário/CEEA

APÊNDICE G

ARTIGO

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo



Evidence of Leishmania (Leishmania) infantum infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic Dual-Path Platform (DPP®) and PCR assays.

Journal:	Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Castro-Júnior, José Geraldo; Setor de Zoonoses, Departamento de Vigilância Epidemiológica e Ambiental da Secretaria Municipal de Saúde de Juiz de Fora, ; Universidade Federal de Juiz de Fora, Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira</p> <p>Freire, Mariana; FEDERAL UNIVERSITY OF JUIZ DE FORA, PARASITOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY</p> <p>Campos, Samantha Priscila; FEDERAL UNIVERSITY OF JUIZ DE FORA, PARASITOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY</p> <p>Scopel, Kezia; FEDERAL UNIVERSITY OF JUIZ DE FORA, PARASITOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY</p> <p>Porrozi, Renato; Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose</p> <p>Silva, Edimilson; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Desenvolvimento de Reativos para Diagnóstico</p> <p>Colombo, Fabio; Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Parasitologia, Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Médicas</p> <p>Viveiros, Rita; Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Parasitologia, Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Médicas</p> <p>Marques, Marcos; Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Parasitologia, Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Médicas</p> <p>COIMBRA, ELAINE; FEDERAL UNIVERSITY OF JUIZ DE FORA, PARASITOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY</p>
Keyword:	canine visceral leishmaniasis, serological diagnosis, immunochromatographic diagnosis, DPP, PCR diagnosis

<http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>