

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

TESE

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *LEISHMANIA* SPP. EM
CÃES ORIUNDOS DE ABRIGOS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ALINE TONUSSI DA SILVA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIA CLÍNICAS)

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *LEISHMANIA* SPP. EM CÃES
ORIUNDOS DE ABRIGOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO

ALINE TONUSSI DA SILVA

Sob a Orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d Silva, Aline Tonussi da, 1986-
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LEISHMANIA SPP. EM CÃES
ORIUNDOS DE ABRIGOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO / Aline Tonussi da Silva. -
Barbacena, 2020.
87 f.

Orientadora: Cristiane Divan Baldani.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS), 2020.

1. Cão. 2. Leishmaniose. 3. Diagnóstico. 4. Doença.
5.Zoonose. I. Baldani, Cristiane Divan, 1978-, orient.
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)
III. Título.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIA CLÍNICAS)

ALINE TONUSSI DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), área de Concentração em Patologia.

TESE APROVADA EM 06/02/2020

Cristiane Divan Baldani, UFRRJ (Ph. D)
(presidente)

Carlos Henrique Machado (Ph. D) UFRRJ

Daniel de Almeida Balthazar (Ph. D) UFRRJ

Aline Moreira de Souza (Ph. D) UFF

Carlos Alberto Sanches Pereira (Ph. D) UNIFOA

DEDICATÓRIA

Á Deus, que nos fortalece nas adversidades.

Dedico este trabalho, aos meus pais, Júlio e Elizabeth, base da minha formação, vocês são os orientadores do meu caráter.

Ao Leone e Olívia pelo apoio e confiança que depositaram em mim.

‘O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho’.

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado o privilégio de conviver com pessoas extremamente diferentes, mas cada uma com sua peculiaridade.

Aos meus pais Julio Cesar da Silva e Elizabeth Tonussi e a minha irmã, Olívia Carolina pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu esposo Leone Prezoti Tonussi pelo incentivo, carinho, apoio, amizade e compreensão desde a minha graduação.

À minha orientadora Professora Dr.^a Cristiane Divan Baldani, pela amizade, oportunidade, compreensão, apoio e orientação.

Aos Professores Dr. Carlos Luiz Massard e Huarrisson Azevedo Santos, por ter disponibilizado seus laboratórios para a execução de partes do meu projeto.

Ao professor Carlos Henrique Machado por ter sido um amigo durante esses anos e por suas muitas palavras de apoio.

À professora Graça do Laboratório de Imunologia por ter gentilmente cedido o microscópio de Imunofluorescência para que eu pudesse realizar a parte sorológica do projeto.

Aos componentes do laboratório LABVET, pelo auxílio durante a minha pesquisa, em especial a residente Naiara Vidal

À Professora Dr.^a Rosangela Zacarias Machado e ao Professor Dr. Marcos Rogério André ambos da instituição (UNESP/Jaboticabal) por cederem os controles positivos e lâminas de sorologia, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas e companheiras de laboratório pelo auxílio em todas as etapas deste projeto, sem as quais este resultado não seria alcançado: Juliana Macêdo Raimundo, Andresa Guimarães, Ágatha Oliveira, Gleice Amaro, Camila.

Às minha amiga Andresa Guimarães e Juliana Macedo Raimundo, pela paciência para me ensinar e ajudar em todos os momentos, por todas as horas que passamos juntas, por todo incentivo.

Aos proprietários dos abrigos, que nos receberam sempre com muita gentileza, muitas das vezes atrapalhando a sua rotina ou final de semana.

Aos cães que participaram desta pesquisa, que sem eles não seria possível que a mesma estivesse concluída.

Aos moradores e ex-moradores da vila mais cheia de histórias da Rural, que se tornaram companheiros dessa vida ruralina. Sempre dispostos a me acolher, em especial Letícia Macedo e Sérgio Oliveira.

Aos meus amigos e familiares Uiara Raiana, Douglas Mena, Caio Balduino, Thérèsse Holmstrom, Luciano Bertolino, Maria Carmem Tonussi, Hélio Tonussi, Kátia Tonussi, Rômulo Tonussi, Arthur Tonussi, Edgard Gonzaga, Esther Tonussi, Robson Goulart, Wagner Martins, Rebecca Barbosa, Nilsen Ramil, Marcos Barreto, Vanessa Vital que sempre me apoiaram e incentivaram.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização da minha Graduação, Mestrado e Doutorado.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização dessa pesquisa, mas por esquecimento não mencionei.

BIOGRAFIA

Aline Tonussi da Silva, filha de Júlio Cesar da Silva e Elizabeth Tonussi, nasceu no dia 05 de novembro de 1986, na cidade de Barbacena, MG. Iniciou sua trajetória educacional cursando o ensino infantil no Colégio Padre Mestre Corrêia, ensino fundamental e médio no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais.

Em 2008 ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), permanecendo no mesmo por três períodos. Em 2010 ingressou no curso de de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo o curso de graduação no dia 11 de abril de 2014.

Em 2009 foi estagiária no Departamento de Medicina e Cirurgia na área de experimentação animal sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida.

Em 2010 foi bolsista de Apoio Técnico Acadêmico na área de Avaliação Animal sob orientação do professor Victor Cruz Rodrigues. No mesmo período foi estagiária no Hospital de Grandes Animais da UFRRJ, sob a orientação do Médico Veterinário Gilberto dos Santos Seappa.

Em 2011 foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida, com o projeto intitulado “Utilização da técnica in vitro semi-automática com produção de gases na avaliação de forrageiras para equinos.”

Em 2012 foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida, com o projeto intitulado “Análise morfométrica e do desempenho de equinos em salto.”

Foi monitora voluntária da disciplina de Doenças Infecciosas no período 2012 a 2013, sob a orientação dos professores Clayton Gitti e Edson Souza.

Em 2013 foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida, com o projeto intitulado “Avaliação do metabolismo muscular em equinos de concurso completo de equitação em treinamento.” No mesmo período foi aprovada no concurso de monitoria de Patologia Clínica do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária.

Realizou em 2013, o estágio supervisionado de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária com a supervisão da professora Cristiane Divan Baldani. Foi treinada

para execução das principais técnicas hematológicas, bioquímicas e de urinálise utilizadas no laboratório clínico e acompanhou projetos de Medicina Preventiva Veterinária.

Em março de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) da UFRRJ em nível de mestrado, sendo contemplada com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Período no qual participou de cursos e eventos relacionados à área, realizou estágio docência na disciplina de patologia clínica e publicou os resultados parciais da dissertação em congressos e eventos da área. Participou da organização da Semana acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ.

Em 2016, ingressou no curso de doutorado do PPGMV/UFRRJ e aprovada em concurso público para o cargo de Médica Veterinária da Prefeitura Municipal de Carandaí – Minas Gerais, tomou posse do cargo no dia 05/01/16.

RESUMO

SILVA, Aline Tonussi. **Diagnóstico laboratorial de *Leishmania* spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro**. 2020. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pelos vetores flebotômíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia* que infectam uma ampla variedade de hospedeiros mamíferos, incluindo cães e humanos. Sendo considerada um grande problema de saúde pública, o reservatório canino deriva do contato próximo e frequente entre cães e seres humanos, e o fato de que os animais podem apresentar infecção assintomática, apesar de um alto grau de parasitismo. O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações hematológicas, bioquímicas e clínicas na infecção por *Leishmania* spp. em cães sorologicamente e molecularmente positivos. Amostras de sangue de 166 cães, oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, foram coletadas. Realizou-se análise hematológica e bioquímica-sérica dos animais, bem como a pesquisa de anticorpos IgG anti-*Leishmania* spp. pelo teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP - (Fiocruz®) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os animais sorologicamente positivos, tiveram suas amostras sanguíneas avaliadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os resultados demonstraram que (18/166) 10,84% dos cães apresentaram sororeatividade por meio do TR DPP, sendo essas amostras submetidas também a RIFI, na qual 100% (18/18) dos animais foram sororeagentes. Na nested PCR, baseada na porção do gene v7-v8 18S SSU rRNA, 16,66% (3/18) dos cães de abrigos apresentaram positividade. Não foram observadas correlações hematológicas, bioquímicas e alterações clínicas com a infecção. Os resultados denotam a importância do monitoramento da leishmaniose canina, especialmente, em cães de abrigos a fim de que estratégias de controle e prevenção possam ser implementadas adequadamente, minimizando os efeitos deletérios desta zoonose e sua propagação para áreas livres da afecção.

Palavras-chave: RIFI; DPP; Hematologia; Bioquímica.

ABSTRACT

SILVA, Aline Tonussi. **Laboratory diagnosis of *Leishmania* spp. in dogs from shelters in Metropolitan Region of the State of Rio de Janeiro.** 2020. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by hematophagous sandfly vectors of the genus *Lutzomyia* that infect a wide variety of mammalian hosts, including dogs and humans. Being considered a major public health problem, the canine reservoir derives from close and frequent contact between dogs and humans, and the fact that animals can present asymptomatic infection, despite a high degree of parasitism. The aim of the present study was to evaluate hematological, biochemical and clinical changes in dogs positive for *Leishmania* spp. by serological and molecular methods. Blood samples from 166 shelter dogs in the metropolitan region of Rio de Janeiro were collected. Hematological and serum biochemical analysis of the animals, as well as the detection of antibodies anti-*Leishmania* spp. by double-path immunochromatographic rapid test TR DDP - (Fiocruz®) and Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI) were performed. In addition, serologically positive animals were molecularly evaluated by polymerase chain reaction (PCR). The results showed that 10,84% (18/166) of the dogs presented seroreactivity by TR DDP, and these samples also underwent IFAT, in which 100% (18/18) of the animals were seroreagent. In PCR, based on the portion of the v7-v8 18S SSU rRNA gene, 16,66% (3/18) of shelter dogs were positive. No hematological, biochemical and clinical alterations were observed with the infection. No hematological, biochemical and clinical changes were observed with the infection. The results denote the importance of monitoring canine leishmaniasis, especially in shelter dogs, so that control and prevention strategies can be implemented properly, minimizing the deleterious effects of this zoonosis and its spread to areas free of the disease

Keywords: RIFI; DPP; Hematological; Biochemical.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de cães domésticos positivos pelo teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania</i> spp. oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.....	22
Tabela 2. Frequência de cães domésticos positivos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>Leishmania</i> spp. oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015	22
Tabela 3. Localização dos abrigos, condições estruturais, número de animias coletados, o número de positivos em relação ao total de animais	23
Tabela 4. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos cães positivos e negativos no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® para <i>Leishmania</i> spp. e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado Rio de Janeiro, 2015.	24
Tabela 5. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® para <i>Leishmania</i> spp. e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado Rio de Janeiro, 2015.....	25
Tabela 6. Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) associadas à soropositividade por <i>Leishmania</i> spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado Rio de Janeiro, 2015	26
Tabela 7. Alterações no leucograma associadas à soropositividade por <i>Leishmania</i> spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015	27
Tabela 8. Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DDP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Leishmania</i> spp, oriundos de abrigos pertencentes a região metropolitana do Rio de Janeiro, 2015	28
Tabela 9. Alterações na bioquímica sanguínea associadas à soropositividade por <i>Leishmania</i> ssp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.....	29
Tabela 10. Associação entre os dados de sintomático gênero, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinantrópicos, castração e o resultado pelo teste rápido	

imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para o agente *Leishmania* spp.30

Tabela 11. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos cães positivos e negativos na PCR para o agente *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015 31

Tabela 12. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente para *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015 32

Tabela 13. Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015..... 33

Tabela 14. Alterações no leucograma associadas aos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp., oriundos abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 201534

Tabela 15. Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015. 35

Tabela 16. Alterações na bioquímica sanguínea associadas aos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente para *Leishmania* spp., oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015 36

Tabela 17. Associação entre os dados de sintomático, gênero, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinantrópicos, castração com o resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp. 37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Municípios pertencentes a Região Metropolitana do Estado Rio de Janeiro, 2015. Locais de obtenção das amostras 15
- Figura 2. Imagem demonstrativa de resultado negativo no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP®. a) Observação do teste positivo. b) Observação do teste negativo19
- Figura 3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando antígeno de formas promastigotas, na titulação 1:40 através da microcopia de imunofluorescência. a) Observação de amostra não reagente. b) Observação de amostra reagente, com observação20
- Figura 4. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 600 pares base do gene 18S SSU rRNA de *Leishmania* spp., pela Nested PCR, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com bormeto de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); +: Controle positivo; -: Controle negativo; 121 ao 164: amostras positivas; Controle positivo Nested.....21

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA - Análise de Variância
ALT - Alanina Aminotransferase
AST- Aspartato Aminotransferase
CHGM -Concentração de hemoglobina globular média
dATP- Deoxiadenosina trifosfato
dCTP - Deoxicitosina trifosfato
dGTP- Deoxiguanosina trifosfato
DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
DNNE - Desvio nuclear de neutrófilos à esquerda
DP - Desvio Padrão
dTTP - Deoxitimidina trifosfato
EDTA - Etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio Imunoenzimático
EP - Erro Padrão
EUA - Estados Unidos da América
FA - Fosfatase alcalina
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
He - Hemácias
Hg - Hemoglobina
Ht - Hematócrito
IgG - Imunoglobulina G
LABVET – Laboratório de Patologia Clínica Veterinária
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LV – Leishmaniose Visceral
LVC – Leishmaniose Visceral Canina
Máx. Limite máximo
Mín. Limite mínimo
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS – Ministério da Saúde
N - Número de cães
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPAS/OMS - Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde
OIE - Organização Mundial de Saúde Animal
PBS – Solução Salina de Fosfato Tamponada (Phosphate Buffered Saline)
pb - Pares de base
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PK - Proteinase Kinase
PM Peso molecular
PPT Proteína Plasmática Total
qPCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
rnpB Gene RNase P
TR DPP - teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso
UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UNESP Universidade Estadual Paulista
VGM Volume globular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Princípios sobre a Leishmaniose Visceral	2
2.1.1 Definição.	2
2.1.2 Agente etiológico: Morfologia e Taxonomia	3
2.1.3. Ciclo Biológico	3
2.1.4 Patogenia	4
2.1.5 Hospedeiro Invertebrado	4
2.1.6 Epidemiologia.....	5
2.1.7 Fatores de risco.	6
2.1.8 Sinais clínicos e achados laboratoriais	6
2.2 Métodos diagnósticos.....	8
2.2.1 Diagnóstico clínico	8
2.2.2 Métodos parasitológicos	8
2.2.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	9
2.2.4. Testes sorológicos	10
2.3 Controle e Prevenção	11
2.4 Tratamento.....	13
2.5 Importância em Saúde Pública	13
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 Princípios éticos.....	14
3.2 Animais	14
3.3 Estrutura dos abrigos	16
3.4 Coleta de sangue	16
3.5 Análises Hematológicas	16
3.6 Análises Bioquímicas	17
3.7 Testes sorológicos.	17
3.7.1 Teste Rápido Qualitativo para a detecção de anticorpos de cão para Leishmania: TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos	17
3.7.2 Testes sorológico de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	17
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	18
3.8.1 Extração de DNA de sangue total	18
3.8.2 Reações de Amplificação para <i>Leishmania</i> sp. baseada na porção do gene v7-v8 18S SSUrRNA	18
3.8.3 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares	18
3.8.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose	18
3.9 Análise estatística	19
4 RESULTADOS	19
4.1 Testes sorológicos	19
4.1.1 Diagnóstico utilizando o Teste Rápido Qualitativo para a detecção de anticorpos de cão	

para <i>Leishmania</i> : TR DPP® <i>Leishmaniose</i> Visceral Canina – BioManguinhos	19
4.1.2 Diagnóstico utilizando a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)	20
4.2 Diagnóstico molecular utilizando as Reações de amplificação para <i>Leishmania</i> sp. baseadas no gene 18S SSU rRNA	21
4.3 Distribuição de <i>Leishmania</i> na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.....	21
4.4 Análise de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de soropositividade para <i>Leishmania</i> spp.	23
4.5 Análises de parâmetros bioquímicos correlacionados com a ocorrência de <i>Leishmania</i> spp.....	28
4.6 Fatores associados à soropositividade para <i>Leishmania</i> spp. utilizando a técnica TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	30
4.7 Análises de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de positividade para <i>Leishmania</i> spp. na técnica molecular.	31
4.8 Análises de parâmetros bioquímicos correlacionados com a ocorrência de positividade para <i>Leishmania</i> spp. na técnica molecular	35
4.9 Fatores associados a positividade para o agente <i>Leishmania</i> spp. utilizando a técnica molecular	37
5.DISSCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	44
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8.ANEXOS	67
ANEXO A - Questionário epidemiológico e avaliação clínica, referente aos cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil	68
ANEXO B - Fotos demonstrando as diferentes condições estruturais, higiênico-sanitárias e presença de animais contactantes obseradas nos abrigos.	70

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma antroponose, e o cão doméstico é o principal reservatório da leishmaniose em áreas urbanas e periurbanas, sendo que a infecção de cães normalmente precede a ocorrência de casos em humanos (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; SILVA et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007; NEUBER, 2008). Os cães, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem, preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *Leishmania infantum* (DANTAS-TORRES et al., 2006). Sabe-se que vários mamíferos são hospedeiros: marsupiais, roedores, edentados, carnívoros, primatas, inclusive os herbívoros (REY, 2002). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pelos vetores flebotômicos hematófagos do gênero *Lutzomyia* (GONTIJO et al., 2011; MARCONDES, 2016). Os vetores são flebotômicos conhecidos vulgarmente como mosquito palha, birigui, cangalhinha ou asa dura. As alterações patológicas mais particulares são encontradas no tecido esplênico, hepático, sanguíneo, pulmonar e renal (FREHSE, 2008).

No Brasil, a leishmaniose pode apresentar-se como Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). De acordo com a espécie, podem produzir manifestações mucocutâneas, cutâneas, cutâneas difusas e viscerais (REY, 2001). As espécies desse parasito, que possuem ciclo de vida heteroxênico, são transmitidas por meio da picada de flebotomos fêmeas infectadas, pertencentes à subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo), e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Ocorre uma concentração de 90% dos casos de LV em seis países: Brasil, Índia, Sudão, Bangladesh, Sudão do Sul, e Etiópia (REIS et al., 2017). Nos últimos 30 anos a região do nordeste do Brasil era considerada a principal região endêmica da doença, contudo, constatou-se uma expansão da LV em cães. Anteriormente era considerada uma doença rural e agora também está presente em áreas urbanas e peri-urbanas do país (STEINDEL et al., 2013). Fatores que influenciam na dispersão da doença, como a urbanização desordenada, pobreza, imigração humana, desmatamento e adaptação do vetor a novos locais (ROCHA et al., 2018).

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa causada por um protozoário da espécie *Leishmania infantum*, que compromete as vísceras e acomete mamíferos domésticos e silvestres tornando-os reservatórios (GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA DE ZOOSES E ENTOMOLOGIA, 2018).

A convivência do homem com os cães, tem aumentado em decorrência da diminuição do espaço das moradias, reduzindo o espaço do quintal fazendo com que os animais tenham maior acesso ao interior das residências. Os sinais clínicos no cão, são inespecíficos e podem incluir linfadenomegalia, alopecia, atrofia muscular e condição corporal comprometida, além de hiporexia, onicogrifose, alterações oftálmicas, anemia, alterações cardíacas e neurológicas (FEITOSA et al., 2000; DANTAS-TORRES et al., 2012; WILSON et al., 2012).

O diagnóstico em cães pode ser obtido por meio de associação de alguns testes como: imunocromatográfico, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para triagem e acompanhamento (GONTIJO et al., 2011; DANTAS-TORRES et al., 2017). Já a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e parasitológico são testes considerados confirmatórios por serem de detecção direta do agente (DANTAS-TORRES et al., 2012; DANTAS-TORRES et al., 2017).

O presente estudo tem como objetivo investigar a infecção por *Leishmania* spp. em cães de abrigos, através das técnicas sorológicas e moleculares (imunocromatografia, RIFI e PCR) para leishmaniose na região metropolitana do Rio de Janeiro, assim como avaliar a correlação das alterações hematológicas, bioquímicas e fatores associados a infecção. Os resultados

obtidos deverão permitir um entendimento da dinâmica da infecção por *Leishmania* spp. e de sua ocorrência em cães de abrigos no Rio de Janeiro, contribuindo para ressaltar sua relevância na medicina veterinária e saúde pública.

Além de salientar que a medicina veterinária do coletivo, tem como objetivo promover a saúde animal como promoção de saúde humana em coletividade através de ações de controle de doenças de pequenos animais, com ênfase em LV em cães. A implementação de atividades direcionadas a populações em abrigos, situações de desastre, de abandono e maus-tratos, promovendo práticas em medicina preventiva, controle populacional e educação da população sobre a LV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Princípios sobre a Leishmaniose Visceral

2.1.1 Definição

A leishmaniose visceral é uma zoonose sistêmica potencialmente fatal quando não tratada. É conhecida por: barriga d'água, calazar, entre outras denominações. Caracteriza-se pela infecção de fagócitos mononucleares pelo protozoário *L. chagasi* (sin. *L. infantum*). No Brasil é uma doença endêmica e o seu principal transmissor é o inseto *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al, 2004; BRASIL, 2016; AMORIM et al., 2017; ROCHA et al., 2018). Esta enfermidade é um grande problema de saúde pública em mais de 88 países, possuindo uma incidência anual de 500 mil casos humanos (WHO, 2010). Esta zoonose grave afeta milhões de cães na Europa, Ásia, Norte da África e América do Sul (DUPREY et al., 2006).

2.1.2 Agente etiológico: Morfologia e Taxonomia

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários classificados taxonomicamente como pertencentes ao Reino Protista (HAEKEL 1886); Subreino Protozoa (GOLDFUSS 1817); Filo Sarcomastigophora (HONIBERG ; BALAMUTH 1963); Subfilo Mastigophora (DIESING 1866); Classe Zoomastigophora (CALKINS 1909); Ordem Kinetoplastida (VICK KERMAN 1976); Subordem Trypanosomatina (KENT 1880); Família Trypanosomatidae (GROBBEN 1905); Gênero *Leishmania* (ROSS 1903); Subgênero *Leishmania* (SAF'JANOVA 1982) e Espécies *Leishmania donovani* (LAVERAN ; MENSIL 1903), *L. infantum* (NICOLE 1908) e *L. chagasi* (CUNHA ; CHAGAS 1937) (CABRERA, 1999).

Este gênero caracteriza-se por apresentar apenas duas formas de desenvolvimento: amastigota e promastigota. A forma evolutiva amastigota apresenta um citossomo levemente achatado e de contorno ovóide, por vezes elíptico ou fusiforme, mostrando poucas estruturas internas, quando fixado e corado pelos corantes do grupo Romanovsky. Por suas dimensões (entre 1,5 a 3 µm de largura por 2 a 6 µm de comprimento), a forma aflagelada encontra-se entre os protozoários de menor tamanho que parasitam o homem. Situado para adiante do núcleo, quase sempre tangente a ele, encontra-se o cinetoplasto, de aspecto baciliforme, reto ou curvo, corando-se em violeta pela técnica de Giemsa. De perfil, sua forma lembra um disco convexo-côncavo. Em geral, o blefaroplasto e o flagelo intracelular não são visíveis nessas preparações. Nesta fase, o parasito caracteriza-se como intracelular de células de defesa dos hospedeiros vertebrados, habitando os vacúolos digestivos (fagolisossomos) de macrófagos (REY, 2001).

A forma evolutiva é descrita promastigota quando o citossomo alonga-se, assumindo aspecto fusiforme ou piriforme, com a extremidade anterior mais arredondada e a posterior mais fina. A forma promastigota alcança dimensões entre 14 e 20 µm de comprimento por 1,5 e 4 µm de largura, e o corpo flexível movimentava-se, tracionado pelo comprido flagelo (aproximadamente 30 µm), que emerge da extremidade anterior. O núcleo fica situado no terço médio da célula, e o cinetoplasto, em posição mais anterior, apresentando-se (de perfil) o aspecto de bastonete curvo. O agente nesta fase se desenvolve no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (flebotomíneos), bem como em meios de cultura (LAINSON; SHAW, 1987a).

2.1.3 Ciclo biológico

A doença é disseminada pela picada do flebotomíneo fêmea, sendo *Phlebotomus* o gênero de importância no Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). O ciclo de vida do protozoário é do tipo heteroxênico, vivendo alternadamente em insetos vetores e vertebrados como reservatórios e hospedeiros (GOMES et al., 1995; BRASIL, 2006; IESBICH, 2008).

O ciclo inicia durante o repasto sanguíneo da fêmea adulta do flebotomíneo em hospedeiros vertebrados infectados. Ao sugar o sangue, a fêmea também ingere macrófagos parasitados com a forma amastigota da *L. infantum* (BRASIL, 2006).

No trato gastrointestinal do vetor ocorre a ruptura dos macrófagos liberando a forma amastigota do protozoário (BRASIL, 2006). Após seis a 12 horas da alimentação do flebotomíneo, inicia-se o processo de transformação da *Leishmania* por divisão binária. O parasito irá apresentar cinco morfotipos flagelados no vetor: promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas, sendo a última forma considerada a formainfectante (PIMENTA;

FREITAS; SECUNDINO, 2012). O ciclo completo do protozoário no inseto possui duração de 72 horas (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007; BRASIL, 2014).

Após atingirem a forma infectante, a fêmea do vetor realiza um novo repasto sanguíneo inoculando o parasito em um hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado a forma promastigota metacíclica é fagocitada pelo sistema mononuclear fagocitário, invade macrófagos do hospedeiro e realizam seu processo de multiplicação até a ruptura da célula, liberando o parasito que será novamente fagocitado e invadindo novos macrófagos (IKEDA-GARCIA & MARCONDES, 2007; BRASIL, 2014).

Em um ciclo contínuo ocorre a disseminação sanguínea da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, atingindo tecidos ricos em células do sistema fagocitário, como fígado, baço, linfonodos e medula óssea (BRASIL, 2014).

2.1.4 Patogenia

De acordo com Bowman (2010), os protozoários do gênero *Leishmania* habitam o interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados sob a forma amastigotas. É ingerido pelo flebotomíneo, que se alimenta de tecidos superficiais e fluidos do seu hospedeiro, onde as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, que multiplicam em grande quantidade. Nos cães susceptíveis, a partir de uma infecção cutânea localizada, o parasito pode disseminar via vasos sanguíneos ou linfáticos, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodo, fígado e baço, bem como rins e trato gastrointestinal, podendo causar doenças crônicas, que culminam em morte na maioria dos casos (GENARO et al., 1988; REIS et al., 2006a).

Devido a razão da *Leishmania* ser um parasito intracelular obrigatório, as defesas do hospedeiro são dependentes da atividade dessas células, que são reduzidas na infecção por este parasito. Em compensação há a proliferação intensa de linfócitos B e há produção de anticorpos, porém, esta é deletéria e não protetora. Com isso, a ocorrência de sintomatologia depende da imunocompetência do animal. Geralmente, a doença no cão é sistêmica e crônica, no entanto a evolução aguda pode levar o animal ao óbito em poucas semanas. Em alguns cães a doença pode permanecer latente, levando inclusive à cura clínica espontânea. No Brasil, a forma assintomática da doença é encontrada com índices variados e geralmente representa 40 a 60% de uma população soropositiva (BRASIL, 2014).

2.1.5 Hospedeiro Invertebrado

No Brasil os vetores responsáveis pela transmissão da Leishmaniose visceral são insetos, cujos nomes populares variam de acordo com a região: mosquito palha, tatuquira, cangalha, asa dura e birigui. Em regiões endêmicas, as principais espécies transmissoras da *Leishmania infantum* são: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (REBÊLO, 1999; BRASIL, 2014). Geralmente o tamanho dos flebotomíneos não é superior a 0,5 cm de comprimento, apresentando pernas longas e delgadas e corpo coberto de cerdas. Seu vôo é saltitante, mantém as asas eretas até quando em repouso, o que o caracteriza, diferenciando dos outros dípteros epidemiológicos (FORATTINI et al., 1973; SOUZA et al., 2003).

A duração de cada estágio de vida varia de acordo com diferentes espécies, com as condições ambientais e alimentares que são expostos. As formas imaturas são terrestres, e necessitam de abrigos ricos em matéria orgânica em decomposição e alta umidade para seu desenvolvimento (YOUNG E DUNCAN, 1994; BRAZIL & BRAZIL, 2003). As formas adultas podem viver em diferentes habitats como abrigos e tocas de animais, troncos de árvores e serapilheira. No ambiente peridoméstico, esses insetos estão associados aos criadouros animais devido à oferta de fonte alimentar (AGUIAR & VILELA, 1987; BRAZIL & BRAZIL, 2003; GALATI et al., 2003). Os flebotomíneos adultos, tanto machos quanto as fêmeas necessitam de açúcares como fonte energética, porém somente a fêmea é hematófaga e alimenta-se de sangue para o desenvolvimento ovariano. A oviposição ocorre cerca cinco a sete dias após o repasto sanguíneo. (FORATTINI, 1983; BRAZIL; BRAZIL, 2003).

2.1.6 Epidemiologia

A leishmaniose é uma zoonose de notificação compulsória em 32 países, caráter emergente e importância mundial (WHO, 2010). Colômbia, Bolívia, Equador, Peru, Venezuela e Brasil apresentam as prevalências mais elevadas (AGUILLAR et al., 1998; DAVIES et al., 2000).

Há relatos de pelo menos 30 espécies diferentes de *Leishmania* distribuídas no Velho e Novo Mundo. As espécies causadoras da leishmaniose na América Latina são divididas em dois grupos taxonômicos. Um grupo é o subgênero *Viannia*, que compreende as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, e são responsáveis por infecções cutâneas ou mucocutâneas. O outro grupo é o subgênero *Leishmania*, que inclui as espécies *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsáveis por lesões cutâneas localizadas ou difusas, e *Leishmania (Leishmania) infantum*, causador da leishmaniose visceral (ASHFORD; BATES, 1998; LAINSON et al., 2005).

No Brasil, a prevalência da leishmaniose visceral canina vem aumentando, não só em número de casos, mas também na dispersão geográfica. Na perspectiva epidemiológica, normalmente a doença canina antecede o acometimento de casos humanos (NUNES et al., 2010; MADEIRA et al., 2004), sendo a infecção nos cães mais prevalente que nos humanos (DEANE; DEANE, 1955; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; GALIMBERTTI et al., 1999). Das 27 unidades federativas brasileiras, já houve relatos de leishmaniose em humanos em 23 deles e relatos em cães em 25 (BRASILEISH, 2017). Ocorreu a expansão dos relatos, devido as ações antrópicas como as ocupações e construções desordenadas e sem infraestrutura necessárias a vida, que acabaram expondo as populações ao risco de infecção (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; SILVA et al., 2017). Com isso, nos últimos anos a LV vem se revelando periurbana e urbana, registrando surtos em vários centros urbanos importantes do país (OPAS/OMS, 2018).

A importância do cão como reservatório da leishmaniose deve-se ao fato de apresentar intenso parasitismo cutâneo e ser capaz de transmitir o parasita ao vetor, mesmo assintomático, constituindo-se em elo essencial para disseminação e amplificação de focos e normalmente antecedendo o acometimento de casos humanos (MOLINA et al., 1994; MADEIRA et al., 2004; MONTEIRO, 2005; GIUNCHETTI et al., 2006; NUNES et al., 2010; DE QUEIROZ et al., 2011). Os reservatórios silvestres da doença são raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon*

thous), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e roedores (*Nectomys squamipes*) (DANTAS-TORRES et al. 2007, REY, 2008).

A leishmaniose cutânea é uma doença que está relacionada, em caráter epidêmico, com episódios de desmatamento. No entanto, o caráter endêmico da doença ocorre quando o homem se encontra próximo a áreas florestais já colonizadas (NARDI, 2010). Existem algumas espécies vetoradas envolvidas na transmissão de leishmaniose tegumentar, como *Lutzomyia intermedia* e *L. migonei* (CAMARGO-NEVES, et al., 2002). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* está distribuída por todo o Brasil, é o principal agente da forma cutânea da doença, dentre outras espécies, porém seus reservatórios silvestres não estão bem definidos (NARDI, 2010).

A ampla distribuição geográfica da leishmaniose deve-se a urbanização desordenada, migração humana constante, desmatamento acentuado, construção de barragens, adaptação do vetor a novos ecótopos e a presença do cão, reservatório da LV no ambiente doméstico (ALVES; BEVILACQUA, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005; WHO, 2012). Sendo encontrados os flebotomíneos, sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes (silvestres, rurais e urbanos) (MIRANDA e DIAS, 2011).

2.1.7 Fatores de risco

Os vetores flebotomíneos tem boa adaptação em regiões peridomiciliares, utilizam como abrigos uma grande variedade de locais, com pequena variação de temperatura e umidade, pouca ou nenhuma luminosidade e movimentação de ar, o que favorece a presença destes insetos (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; FELICIANGELI, 2004). Podemos encontrá-los em espaços existentes entre folhas caídas e o solo, tocas de animais (AGUIAR et al., 1985; ALEXANDER et al., 1992; AZEVEDO et al., 1993). Mais um fator que influencia a transmissão da LV é a abundância de *Lutzomyia longipalpis* em áreas urbanas. Esta espécie é encontrada em abundância em áreas de alta vulnerabilidade (VIANNA et al., 2016). Diversos fatores são determinantes para o encontro de alto número de flebotomíneos capturados, como: baixa condição socioeconômica da população, ambiente propício para reprodução dos flebotomíneos, com acúmulo de matéria orgânica, árvores frutíferas e presença de animais domésticos (LIMA, 1986; XIMENES et al., 1999; FELICIANGELI, 2004; OLIVEIRA et al., 2012).

2.1.8 Sinais clínicos e achados laboratoriais

A dificuldade do diagnóstico clínico se deve ao fato de 50-60% dos cães infectados serem assintomáticos (LANOTTE et al., 1979; GRADONI et al., 1980; MANCIANTI et al., 1986; ABRANCHES et al., 1991a; BRANDONISIO et al., 1992), mas podem constituir importante elo epidemiológico, uma vez que permanecem no ambiente e são capazes de transmitir o parasito para o vetor, ainda que em menor proporção do que os animais sintomáticos (COURTENAY et al. 2002; COSTA-VAL et al. 2007; MICHALSKY et al. 2007; AMORIM et al. 2011; SOARES et al. 2011). Os cães infectados podem apresentar uma grande variedade de perfis clínicos, desde aparentemente saudáveis a severamente acometidos, sendo

este grau de apresentação dos sinais clínicos determinado pela cepa do parasito, genética e estado imunológico do animal (HANDMAN, 2001).

A leishmaniose visceral canina é uma doença de sintomatologia inespecífica, é difícil de ser diagnosticada apenas pela história do animal e apresentação clínica (KONTOS; KOUTINAS, 1993), tais como, febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso, caquexia, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, principalmente poplíteos, pré-escapulares e submaxilares (ABRANCHES et al. 1991b; GENARO, 1993).

Os maiores responsáveis pela grande variedade de sinais clínicos presentes na leishmaniose visceral, são os complexos imunes que se depositam em vários órgãos e tecidos dos vertebrados, como pele, vasos sanguíneos, tecidos oculares e em várias articulações, o que conduz ao aparecimento de diversas manifestações, como úlceras cutâneas e das pontas das orelhas, epistáxis, uveíte, conjuntivite e episclerite imunomediada e claudicação por poliartrite (KONTOS; KOUTINAS, 1993; CIARAMELLA; CORONA, 2003; TROTZ-WILLIAMS; GRADONI, 2003). Os sinais clínicos mais comuns são as lesões cutâneas, alopecia, descamação furfurácea, hiperqueratose, apatia, emagrecimento, onicogrifose, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (MANCIANTI, et al., 1988; ALMEIDA et al., 2005; SILVA et al., 2011), paresia dos membros (MANCIANTI, et al., 1988). Outras manifestações podem estar incluídas como diarreia, envolvimento articular, fraqueza, redução das atividades, anorexia, anemia, linfadenopatia local ou generalizada, atrofia muscular e falência renal a qual geralmente é a principal causa de morte de cães infectados (PUMAROLA et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

Quanto às manifestações, o cão infectado pode ser assintomático, quando não apresenta sinais clínicos sugestivos de infecção; oligossintomático, quando há presença de linfadenopatia, leve perda de peso e alterações dermatológicas; e sintomático, onde alguns ou todos os sinais comuns da doença são evidentes (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Ainda que não estejam essencialmente presentes em todos os animais doentes, outros sinais são frequentes como epistaxe, atrofia muscular, edema das membros, paresia das membros posteriores, diarreia, hemorragia intestinal, apatia, emaciação, onicogrifose, ceratoconjuntivite e uveíte (LANOTTE et al., 1979; MARZOCHI et al., 1985; SLAPPENDEL; GREENE, 1990; GENARO, 1993). Viñuelas et al. (2001) demonstraram que o parasito pode atingir os tecidos cerebrais e produzir um quadro clínico, caracterizado por manifestações neurológicas e alterações na composição do líquido.

Keenan (1984) relatou os seguintes achados: anemia grave normocítica e normocrômica, trombocitopenia, leucopenia, além de aumento de proteína sérica total com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Amusatogui e colaboradores (2003) correlacionaram sintomatologia visceral em cães e aumento nas concentrações médias de uréia e creatinina, porém com agravona porcentagem de casos no estágio avançado da doença, com elevação de ALT, uréia e/ou creatinina devido à disfunção renal ou falha hepática, foi relativamente baixa.

Diversos pesquisadores relataram alterações bioquímicas e hematológicas na leishmaniose com aplicações limitadas no diagnóstico da doença. Entretanto são de grande valia na avaliação prognóstica e no acompanhamento do status clínico do animal, bem como na elucidação da patogênese (IKEDA et al., 2002; REIS et al., 2006a).

2.2 Métodos diagnósticos

O diagnóstico da leishmaniose é na maioria das vezes através de testes sorológicos, tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), associado com os aspectos clínicos e epidemiológicos. Todavia, o diagnóstico definitivo da doença demanda a demonstração direta do parasito em tecidos de animais suspeitos (SACKS et al., 1993). O diagnóstico clínico-laboratorial da leishmaniose visceral canina é complexo pela prevalência de um grande número de animais assintomáticos (LANOTTE et al., 1979; GRADONI et al., 1980; MANCIANTI et al., 1986; ABRANCHES et al., 1991a; BRANDONISIO et al., 1992). A natureza crônica dos sinais clínicos da doença e o seu longo período de incubação são fatores responsáveis pelo atraso ou mesmo falha no diagnóstico clínico (SLAPPENDEL, 1988). Nota-se que os sinais clínicos da doença são muito semelhantes aos de outras enfermidades infecciosas, além da ocorrência de reações cruzadas nos testes sorológicos (GRIMALDI; TESH, 1993).

Com isso os métodos diagnósticos utilizados em inquéritos epidemiológicos devem possuir alta sensibilidade e especificidade, pois através de uma alta sensibilidade consegue-se detectar o maior número de doentes, evitando a permanência de animais positivos na população e através de uma alta especificidade, evita-se que cães não infectados com o parasita pesquisado estejam sujeitos ao sacrifício (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

2.2.1. Diagnóstico clínico

O diagnóstico da leishmaniose é dificultado pelo fato dos sintomas não serem específicos da doença. Desta forma o diagnóstico clínico isoladamente, não é suficiente para identificar um cão infectado (CAMARGO & LANGONI, 2006), tornando a utilização de exames laboratoriais de suma importância para confirmação diagnóstica (BRASIL, 2006).

O diagnóstico clínico isolado da doença, não é suficiente para detectar animais positivos, devido ao largo espectro de sinais clínicos, desde animais saudáveis a casos em estágio avançado da doença (CAMARGO; LANGONI, 2006). O diagnóstico definitivo, pode ser obtido através da demonstração de amastigotas em tecido do animal infectado ou de promastigotas em cultura ou através da detecção do DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No entanto, estes métodos requerem procedimentos invasivos, um laboratório bem equipado e técnicos treinados, o que é atualmente inviável em inquéritos epidemiológicos (BRASIL, 2006; GOMES et al., 2008; LIMA et al., 2010). Sendo os métodos sorológicos os mais utilizados em levantamentos epidemiológicos, os mais empregados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e teste imunocromatográfico rápido (QUEIROZ et al., 2009; PALTRINIERI et al., 2010).

2.2.2 Métodos parasitológicos

O diagnóstico parasitológico da leishmaniose, através da observação direta do parasita fornece prova definitiva da infecção, pois uma vez que o parasito é visualizado, a infecção é confirmada sem qualquer dúvida. A pesquisa de parasitos pode ser feita em esfregaços de medula óssea, obtidos por punção de costela, da crista ilíaca ou do fêmur, esfregaços de

linfonodo e, muito raramente, esfregaços de baço ou ainda através de biópsia cutânea (FAYET, 1999; CIARAMELLA; CORONA, 2003; QUEIROZ et al., 2009).

A parasitemia observada no exame parasitológico é muito variável, não tendo correlação com a intensidade da sintomatologia (PALTRINIERI et al., 2010). Em algumas situações é muito difícil analisar parasitas, principalmente em animais em fase inicial da doença, sendo comum a ocorrência de resultados falsos-negativos. Concluimos que, este diagnóstico apresenta alta especificidade, mas a sua sensibilidade é baixa, de cerca de 50% no caso de esfregaços de medula óssea, decaindo para valores de 30% em esfregaços de linfonodo (FAYET, 1999).

2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em tempo real vem sendo utilizada em trabalhos sobre diagnóstico da leishmaniose (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; GOMES et al., 2007; FERNANDES et al., 2019). Esta técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de seqüências de nucleotídeos específicas presentes no parasita, sendo um método bastante sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp em ampla variedade de amostras clínicas do homem, cães, reservatórios silvestres e vetores (GOMES et al., 2008). Em casos fortemente suspeitos, mas em que as técnicas sorológicas ou a observação direta do parasita são inconclusivas, recomenda-se as técnicas de diagnóstico moleculares (CRUZ et al. 2006; ANTINORI et al. 2007; MANNA et al. 2007; ALAM et al. 2009).

Corroborando com Akhavan e colaboradores (2010), relataram que os testes parasitológicos são os que apresentam maior especificidade, porém baixa sensibilidade devido a uma série de limitações relacionadas à dificuldade de isolamento dos parasitos, geralmente devido a uma baixa carga parasitária e irregularidade na distribuição nos tecidos do hospedeiro. Neste contexto, abordagens moleculares têm sido propostas com o objetivo de detectar a espécie de *Leishmania* diretamente em amostras biológicas. Podendo a princípio ser utilizada a técnica molecular para maximizar a sensibilidade para detecção de parasitos em vários tecidos, sejam eles provenientes de humanos, animal e ou de flebotomíneos obtendo uma alta especificidade, no que concerne à distinção das diferentes espécies do parasito.

As leishmânias, como os outros membros da ordem Kinetoplastida, apresentam uma rede de moléculas de DNA circular denominado de DNA do cinetoplasto ou kDNA, nas suas mitocôndrias. O kDNA é formado por arranjos de maxicírculos e minicírculos, onde os minicírculos representam 95% do kDNA. Os minicírculos são compostos por cerca de 800-1200 pares de bases (pb), apresentando uma região conservada entre os cinetoplastídeos, que contem cerca de 120-200 pb que podem ser utilizados como alvo da PCR e uma região não conservada ou variável, que pode apresentar diferenças entre cepas de uma mesma espécie. (RAY, 1989; CAVALCANTI et al., 2008; GOMES et al., 2008).

A Nested PCR é uma técnica altamente sensível e específica quando conduzida com aspirados de medula e linfonodo, bem como com sangue periférico (FISA et al. 2001).

A qPCR é consideravelmente mais sensível que a PCR convencional, como demonstrando por Francino et al. (2006) que verificaram que a PCR convencional somente poderia ser positiva em amostras com carga parasitária superior a 30 *Leishmania* spp/mL, enquanto a qPCR detecta cargas parasitárias em concentrações maiores que 0,2 *Leishmania* spp/mL de amostra. Os resultados da qPCR tornam-se extremamente importantes quando se busca um diagnóstico sensível e rápido, particularmente em casos onde os diagnósticos sorológicos são duvidosos. Assim, pode-se observar que as vantagens da qPCR em relação à

PCR convencional são inúmeras e incluem, rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e capacidade quantitativa (CAVALCANTI et al., 2008; GOMES et al., 2008).

A infecção por leishmaniose pode apresentar parasitas em latência, as abordagens quantitativas são necessárias para esclarecer a condição dos cães positivos pela PCR de áreas endêmicas, colaborando para a monitorização da carga parasitária e sua resposta ao tratamento, bem como o acompanhamento do desenvolvimento de novas vacinas (MARY et al., 2004 ; VITALE et al., 2004; FRANCINO et al., 2006).

Entretanto, as técnicas moleculares têm um custo elevado quando comparado as técnicas sorológicas (MAIA et al., 2009), dificultando a sua utilização de forma rotineira pelos laboratórios oficiais das leishmanioses, por requer de equipamentos e habilidade técnica específica (BRASIL, 2006).

2.2.4 Testes sorológicos

No Brasil, até 2011, os testes para diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) preconizados pelo Ministério da Saúde eram RIFI e ELISA. Entretanto, os resultados soropositivos por ELISA e RIFI não necessariamente representavam uma verdadeira infecção por *Leishmania* spp. devido a especificidade controversa de ambos os testes, conforme evidenciado em vários estudos. Assim, desde 2011, os critérios oficiais para o diagnóstico de LVC (Leishmaniose Visceral Canina) no Brasil foram baseados sobre o uso de uma plataforma Dual Path (DPP®, Biomanguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) compreendendo proteínas recombinantes específicas (rK26 e rK39) como o teste imunocromatográfico de triagem, seguido pelo ELISA indireto como o teste confirmatório (BRASIL, 2011).

Apesar dessas características e da facilidade de aplicação, a discussão sobre a precisão do DPP® persiste, especialmente quanto à sensibilidade para detecção de infecção assintomática dos animais (GRIMALDI et al., 2012). Ainda assim, é o teste de triagem preconizado pelo Ministério da Saúde, sendo os reagentes neste enviados para confirmação através do ELISA. Foram realizados trabalhos de validação desta técnica para diagnóstico da LVC, que se mostrou eficaz (QUEIROZ-JÚNIOR, 2011; SCHUBACH, 2012). Segundo Figueiredo e colaboradores (2018) o desempenho do teste é dependente da sintomatologia canina. Resultados favoráveis para sensibilidade e especificidade podem ser obtidos mesmo em animais assintomáticos. No entanto, é preciso cautela nessas avaliações, uma vez que o teste imunocromatográfico pode ser melhorado para uma investigação mais adequada em cães assintomáticos. Em seus resultados, esses autores confirmaram a utilidade do DPP® para aplicação em pesquisas sorológicas. A RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) é o teste de eleição para inquéritos epidemiológicos, por apresentar sensibilidade e especificidade adequadas, quando comparada a outras técnicas (ALVES & BEVILACQUA, 2004). Porém, relata-se a ocorrência de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como *Leishmania braziliensis* (DA COSTA et al., 2003; MADEIRA et al., 2006a; MADEIRA et al., 2006b). Mesmo sendo um dos testes mais sensíveis, um resultado negativo não exclui que o animal esteja afetado, uma vez que há animais que demoram algum tempo a desenvolver a resposta humoral e a atingir títulos de anticorpos considerados positivos. Deste modo, em animais clinicamente suspeitos ou com resultados duvidosos deve-se repetir o teste passadas 4 a 6 semanas ou recorrer a outro tipo de teste (BRASIL, 2006). O teste de ELISA (Ensaio Imunoenzimático) é bastante útil para análises de laboratório, possibilitando a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo (MAIA CAMPINO, 2008), sendo, por isso, mais rápido e de fácil execução (CAMARGO; LANGONI, 2006) quando comparado ao RIFI. A

técnica de ELISA permite detectar baixos títulos de anticorpos e é acurado na identificação de casos assintomáticos (CÂNDIDO et al., 2008).

Moreira e colaboradores (2007) demonstraram que o ELISA utilizando antígeno bruto de *L. chagasi* obteve sensibilidade 95,65% em animais assintomáticos seguido de 87,8% para o grupo de sintomáticos, no entanto, obteve uma sensibilidade de apenas 68% para os animais oligossintomáticos e especificidade de 100% para todos os grupos de animais.

Os testes sorológicos são usados para diagnóstico em áreas endêmicas e também como ferramentas em estudos epidemiológicos, uma vez que a excessiva produção de anticorpos observada no durante a infecção facilita o diagnóstico. Ainda assim, a reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos, bem como a inexistência de um teste que apresente 100% de sensibilidade e especificidade dificulta o diagnóstico sorológico (COSTA et al. 1991; DYE et al., 1993).

2.3 Controle e Prevenção

Os métodos utilizados para conter os reservatórios da leishmaniose, dependem de quais animais agem como reservatórios. Os cães têm um importante papel como reservatório da leishmaniose causada por *L. infantum* em algumas áreas devido ao parasitismo cutâneo intenso, o que beneficia a infecção dos flebotomíneos. O percentual de infecção por leishmaniose visceral depende de fatores como a densidade do vetor, a susceptibilidade e o comportamento dos cães, o grau de exposição aos vetores e a atitude dos proprietários. Fazendo-se necessárias medidas de controle adequadas para cada região, variando de controle populacional de cães infectados a medidas de controle vetorial (GONZÁLEZ et al., 2015).

O sacrifício de cães positivos, uma das principais ações profiláticas da leishmaniose visceral recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde), vem sofrendo crescentes críticas por parte da sociedade, já que a população apresenta grande estima pelos animais (WHO, 1990; ALVAR et al., 2004). Este método de controle reflete muitas polêmicas no meio veterinário por alguns pesquisadores através de trabalhos avaliando a funcionalidade da retirada do animal no recrudescimento da doença, e muitas vezes sugerem que esta ação é ineficaz (DYE, 1996; DIETZE et al., 1997; COURTENAY et al., 2002), e que a utilização de inseticidas no controle de vetores funciona de maneira mais atuante (DYE, 1996). Por conseguinte, um número cada vez maior de cães é submetido ao tratamento no Brasil, já praticado nos países da Europa. Inúmeros experimentos mostram que após o tratamento geralmente ocorre remissão temporária de sinais clínicos, seguida de recidivas (ALVAR et al., 1994; VERCAMMEN et al., 1995; MORENO et al., 1999; CAVALIERO et al., 1999; LAMOTHE, 2001; IKEDA-GARCIA et al., 2007).

Desta forma a imunoprofilaxia representa uma eficiente ferramenta de controle, diversos estudos sugerem o uso de vacinas profiláticas, humanas ou caninas, substituindo o sacrifício animal (MARZOCHI et al., 1985; GENARO, 1993; DYE, 1996; DA SILVA et al., 2000; GIUNCHETTI et al., 2007). Existe vacina contra a Leishmaniose (Leishtec®), que aplicada nos cães gera proteção contra a Leishmaniose Visceral Canina em 96.4% dos cães vacinados (<http://leishtec.com.br/portalveterinario/>). Porém, Grimardi e colaboradores (2017), observaram que a Leish-tec®, como uma vacina profilática, mostrou-se promissora, mas precisa ser ainda mais otimizada para ser eficaz em cães em condições de campo e, portanto, impactar positivamente a incidência humana. A vacinação com Leish-tec®, pode não ter um impacto sobre a incidência de Leishmaniose Canina em áreas de alta transmissão pois as vacinas

imperfeitas representam uma ameaça, porque não são completamente esterilizantes e permitem que cepas mais virulentas sobrevivam e transmitam a enfermidade (GRIMARDI et al., 2017).

Além disto, medidas de controle, tais como, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas tópicos (deltametrina) tem sido recomendado para proteção dos cães contra as picadas de flebotomíneos e, conseqüentemente, controlar a incidência da doença canina (KILLICK-KENDRICK, 1997; DAVID et al., 2001; MAROLI et al., 2001; REITHINGHER et al., 2004). Estudos recentes sugerem que a sua utilização em áreas com transmissão reduz a prevalência de casos caninos, sem entretanto fazer menção ao impacto efetivo na população de flebotomíneos (KAZIMOTO, 2016; SEVÁ et al., 2016).

Devido às dificuldades do controle da doença, é indicado o manejo ambiental adicionalmente à borrifação, pois certamente contribui para evitar ou diminuir a proliferação do vetor, uma vez que age modificando o ambiente que propicia seu desenvolvimento. (BRASIL, 2006). Em 2003, Teodoro e colaboradores, demonstraram que tanto a borrifação quanto a reorganização do ambiente contribuem significativamente para reduzir a densidade de flebotomíneos no domicílio e peridomicílio. Em contrapartida, Lara-Silva e colaboradores (2017) mostraram que o manejo pode ser até mais efetivo que a borrifação. Desse modo, a limpeza de matéria orgânica acumulada no solo, representada por folhas e frutos em decomposição, corte de algumas árvores ao lado das residências e drenagem do solo com elevada umidade constituem medidas complementares que podem auxiliar no controle destes insetos.

É importante salientar que as medidas, aplicadas isoladamente, não se mostram efetivas para a redução da incidência da doença. Recomenda-se, para evitar os riscos de transmissão, algumas medidas preventivas de ambientes individuais ou coletivos devem ser estimuladas, tais como: o uso de repelentes, evitar a exposição nos horários de atividades do vetor (crepúsculo e noite), uso de mosquiteiros de malha fina, bem como a telagem de portas e janelas, manejo ambiental por meio de limpeza de quintais e terrenos (a fim de alterar as condições do meio que propiciem o estabelecimento de criadouros para formas imaturas do vetor), poda de árvores (para aumentar a insolação, a fim de diminuir o sombreamento do solo e evitar as condições favoráveis, como temperatura e umidade, ao desenvolvimento de larvas de flebotomíneos), destino adequado do lixo orgânico, limpeza periódica dos abrigos de animais domésticos, manutenção de animais domésticos distantes do intradomicílio durante a noite (reduzindo a atração de flebotomíneos para este ambiente), manter faixa de segurança de 400 a 500 metros entre as residências e a mata, além da identificação de cães sorologicamente positivos, seguida pela eutanásia destes e atividades de educação em saúde, desta forma devem estar sempre integradas, para que se obtenha a eficiência desejada (GONTIJO; MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; BRASIL, 2014). A efetividade destas ações depende de mudança de comportamento, que levam a resultados alcançados de médio à longo prazo (OLIVEIRA et al., 2008).

Os reservatórios sinantrópicos da LV são as raposas (*Dusicyon vetulus e Cerdocyon thous*), os gambás (*Didelphis albiventris e Didelphis marsupialis*) e os roedores (*Rattus rattus, Nectomys squamipes, Thrichomys apereoides, Proechimys canicollis e Coendou prehensilis*), ainda que o papel epidemiológico desempenhado por este último na transmissão urbana permaneça incerto (LARA-SILVA et al., 2015).

Apesar da utilização da vacina, os enfoques de controle não devem ser abandonados. Sendo de suma importância cuidados ao entrar na mata, uso coleiras repelentes, inseticidas, armadilhas para insetos. Outras medidas também podem ser implementadas para prevenir a doença, como o controle da população canina errante, uma vez que os cães são o principal reservatório da doença em meio urbano e o uso de telas de malha fina em canis (BRASIL,

2006). O Ministério da Saúde vem incentivando a educação em saúde, para o controle da LV em áreas de risco, visando o desenvolvimento de atividades informativas, utilizando os sistemas de informações local, regional e municipal, oferecendo instruções para reconhecer os sinais clínicos em cães e humanos, para que a doença seja diagnosticada e tratada em tempo hábil (BRASIL, 2016).

2.4 Tratamento

No Brasil, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) estabelece que cães soropositivos para *Leishmania chagasi*, em áreas endêmicas sejam eutanasiados como medida de controle (LACERDA, 1994, BRASIL, 2014). No entanto, o impacto dessas medidas não tem surtido o efeito esperado na redução de casos humanos, determinando assim a necessidade de reavaliação das ações propostas (WHO, 2010). Diante disso, um correto diagnóstico é um importante passo para evitar a eutanásia desnecessária de cães e a transmissão da doença, desse modo impede-se que o cão infectado permaneça no ambiente como fonte de infecção (FERREIRA et al., 2008).

Atualmente, entrou em vigência uma Nota Técnica (Nº11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA), que legaliza o tratamento da leishmaniose com um medicamento a base de Miltefosina, mas ainda não se sabe os efeitos desta decisão, já que o tratamento apesar de levar a cura clínica, não elimina a carga parasitária. Corroborando com o estudo de Manna e colaboradores (2008), demonstraram que o tratamento apenas com miltefosina, reduz significativamente a carga parasitária, mas não é capaz de levar a uma cura parasitológica. Ainda que consiga uma boa eficácia clínica quando usado como monoterapia, os animais tratados apresentaram um aumento significativo na carga parasitária 6 meses após o tratamento ter sido descontinuado (ANDRADE et al., 2011; MATEO et al., 2009; WOERLY et al., 2009).

2.5 Importância em Saúde Pública

As leishmanioses são um grave problema de saúde pública, sendo que o número de casos vem aumentando anualmente (ALVAR et al., 2012). Essas doenças estão amplamente distribuídas por 98 países (WHO, 2014) e sua área de abrangência se enquadra com o mapa socioeconômico da pobreza pelo mundo (ALVAR et al., 2006). Segundo Werneck (2016) pessoas e animais que vivem em situações de pobreza e vulnerabilidade social são os mais afetados. Em todo o continente americano, têm caráter endêmico em 12 países, dentre os quais o Brasil corresponde a aproximadamente 96% dos casos nessa extensão territorial, havendo expansão também para países como Argentina, Colômbia e Paraguai (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

No Brasil, a LV é uma doença endêmica com registro de surtos frequentes e em franca expansão, ocorrendo registro de casos da doença em áreas antes consideradas livres, como na região Sul (KRAUSPENHAR, et al., 2007; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009).

O cão ainda é considerado o mais importante reservatório doméstico do agente etiológico da LV e tem sido responsabilizado pelo surgimento e manutenção de focos endêmicos e epidêmicos da doença nos grandes centros urbanos (SILVA et al., 2001). Os cães, por serem altamente susceptíveis à infecção, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo e também pelo seu convívio junto ao homem, preenchem as condições necessárias para serem reservatórios de *L. (L.) infantum* (DANTAS-TORRES et al., 2006). Vários questionamentos

ainda permanecem quanto ao verdadeiro papel do cão na urbanização do ciclo de transmissão da *L.(V). braziliensis* (REITHINGER; DAVIES, 1999; MADEIRA et al., 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), 60% das doenças infecciosas humanas têm sua origem em animais domésticos ou selvagens (ZANELLA, 2016). Devido à falta de conhecimento por parte da população quanto à prevenção e controle da LV e o desinteresse do poder público, a negligência se vê quando o poder público tem seu foco em eliminar cães reagentes (Silva et al., 2017). Com isso, sendo de suma importância, o auxílio do Médico Veterinário na Saúde Pública agregando conhecimentos voltados para a assistência à Saúde, intervenções relacionadas à agropecuária, ao meio ambiente, à clínica de animais de companhia, animais de produção e selvagens, tudo isso conectado à Vigilância Sanitária, Epidemiológica, Ambiental, Controle de Zoonoses e Educação em Saúde, entre outros (MONTEIRO & VIEIRA, 2017).

As visitas do agentes de endemias aos domicílios, discussões em instituições de ensino com o objetivo de educar a população sobre responsabilidade propriedade, bem-estar animal e também aspectos relacionados à prevenção da leishmaniose visceral em cães e em seres humanos são fundamentais.

3 METODOLOGIA

3.1 Princípios éticos

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pela CEUA/IV/UFRRJ (A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), sob o protocolo número 028/2014 e atende aos princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais. Todos os procedimentos foram realizados por uma equipe de médicos veterinários capacitados.

3.2 Animais

Foram avaliadas 166 amostras (112 fêmeas e 54 machos) obtidas de cães domésticos, coletadas por conveniência em onze abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro: Seropédica (4 abrigos), Mesquita (2 abrigos), Nova Iguaçu (1 abrigo), São Gonçalo (1 abrigo), Guapimirim (1 abrigo), Rio de Janeiro (2 abrigos) (Figura 1). Previamente a coleta de sangue, os responsáveis pelos animais foram devidamente esclarecidos sobre os termos do projeto, objetivos e importância do estudo e posteriormente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado permitindo a coleta do sangue e uso do material na pesquisa.

No momento da coleta de sangue foram observados dados relacionados ao hospedeiro (gênero, idade, histórico de brigas, acesso a rua, castração, histórico de pulgas, histórico de carrapatos, presença de pulgas, presença de carrapatos, animais contactantes), conforme (anexo

A). As amostras foram coletadas por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos responsáveis pelos abrigos.

Os cães foram contidos fisicamente com focinheira e posteriormente realizamos o exame clínico dos cães foi realizado antes da obtenção das amostras de sangue, sendo avaliados: comportamento, estado corporal, temperatura retal, pulso, movimentos respiratórios, tempo de preenchimento capilar, coloração das mucosas, presença de ectoparasitos e demais observações clínicas relevantes. Utilizou-se como base para determinar se o cão era suspeito de leishmaniose visceral, o Guia de Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina, (GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA DE ZONÓSES E ENTOMOLOGIA, 2018), sendo:

- Cão que apresenta pelo menos um dos três seguintes sinais: descamação; úlceras de pele; onicogribose; Associado(s) a dois ou mais dos seguintes sintomas: ceratoconjuntivite; coriza; apatia; emagrecimento/caquexia; diarreia; hemorragia intestinal; vômitos; edema dos membros; paresia dos membros posteriores.

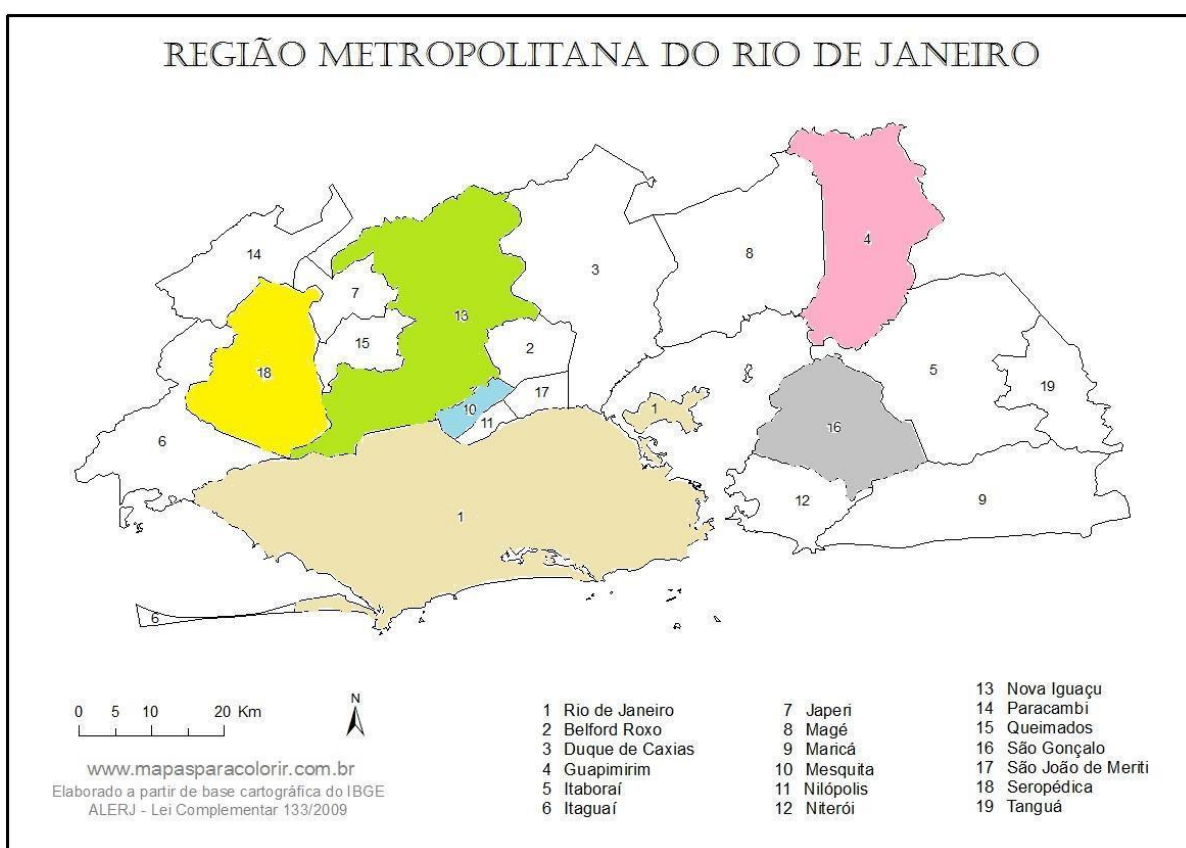


Figura 1: Municípios pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015. Locais de obtenção das amostras sanguíneas de cães para diagnóstico de *Leishmania* spp.

3.3 Estrutura dos abrigos

Os abrigos foram classificados de acordo com a sua condição estrutural e higiênico-sanitária em: ótimo, bom, razoável, ruim e péssimo (Fotos representando os abrigos anexo B). Sendo os abrigos considerados péssimos havia alimentação insuficiente, superlotação, não ocorria divisão dos animais em recintos diferentes, a maioria dos animais não eram castrados, não havia controle de ectoparasitas e endoparasitas. Abrigos considerados ruins apresentavam alimentação em quantidade suficiente no entanto de qualidade inferior, superlotação, poucos animais castrados, uma pequena separação dos animais por sexo distintos na maioria das vezes, sem controle de ectoparasitas e endoparasitas. Abrigos considerados de qualidade razoável apresentavam alimentação em quantidade suficiente no entanto de qualidade inferior, grande quantidade de animais por recinto, maior proporção de animais castrados correlacionado com os abrigos considerados inferiores na classificação, com controle de ectoparasitas e endoparasitas de forma insuficiente. Abrigos considerados bons possuíam alimentação suficiente e de qualidade, não havendo superlotação nos recintos, a maioria dos cães eram castrados e havia controle de ectoparasitas e endoparasitas na maioria dos cães. O abrigo considerado ótimo possuía alimentação de qualidade e suficiente, animais dispostos em recintos com poucos animais e respeitando afinidades e necessidades individuais, a castração era feita regularmente e havia controle de ectoparasitas e endoparasitas eficiente.

3.4 Coleta de Sangue

As amostras sanguíneas foram de volume aproximado a 3 mL e obtidas por venopunção cefálica ou jugular. O sangue foi dividido aproximadamente 1mL em um frasco contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e aproximadamente 2mL em outro sem anticoagulantes para posterior separação do soro sanguíneo por centrifugação. As amostras de soro foram preservadas a -20°C até a realização das determinações bioquímicas e testes sorológicos, conforme descrito abaixo. As amostras nos tubos contendo EDTA foram empregadas na análise hematológica e posteriormente armazenados à -80°C para posterior utilização nos ensaios de biologia molecular, conforme descrito abaixo.

Uma fração do sangue fresco coletado foi utilizada para a confecção de esfregaços sanguíneos a fim de realizar o diagnóstico direto de possíveis hemoparasitoses.

3.5 Análises Hematológicas

A análise hematológica foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABVET/UFRRJ). As análises foram realizadas em contador automático de células Poch100/Roche, segundo recomendações do fabricante e com auxílio de microscópio óptico comum. Os parâmetros hematológicos determinados foram contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas, determinação de hemoglobina, volume globular e índices hematimétricos CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e VCM (Volume Corpuscular Médio). A morfologia eritrocitária e leucometria específica foram realizadas com auxílio de microscópio (1000x) após coloração dos esfregaços sanguíneos por corante do grupo Método Romanowsky (Giemsa) (JAIN, 1993). A concentração de proteínas totais foi determinada pela técnica de refratometria.

3.6 Análises Bioquímicas

Perfis bioquímicos hepático e renal foram realizados no LABVET/UFRRJ através de analisador bioquímico semi-automático (Bioplus), utilizando-se *kits* comercialmente, de acordo com as recomendações do fabricante. Os parâmetros séricos avaliados foram: proteína total, albumina, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA).

3.7 Testes sorológicos

3.7.1 Teste Rápido Qualitativo para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*: TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos

O teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso (TR DPP®) foi realizado conforme instruções do fabricante. Foram colocados 5 µL de soro ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão” e, a seguir, adicionadas 2 gotas do tampão. Após 5 minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desaparecem. A seguir coloca-se 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados é realizada 10 a 15 minutos após esta etapa, quando se avalia o resultado: negativo, aparecimento de uma linha vermelha ou positivo, duas linhas vermelhas.

3.7.2 Testes sorológico de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. foi determinada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). O suprimento de antígeno e os soros controles positivo e negativo foram gentilmente fornecidos pela professora Dr^a. Rosangela Zacarias Machado, Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV), colaboradora do presente estudo.

A RIFI foi realizada segundo protocolo previamente descrito por Camargo (1974). As amostras de soro ou plasma dos cães domésticos, bem como dos soros controles foram diluídos a 1:40 em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em seguida, 10µL do soro ou plasma diluído foram transferidos para cada poço das lâminas contendo antígeno de *Leishmania*. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Em seguida, passaram por três lavagens de cinco minutos em solução salina de fosfato tamponada, PBS 10X pH 7,2, secas e adicionados a cada uma 10µL de conjugado (anti-IgG da espécie, marcado pelo isotocianato de fluoresceína), diluído em solução de PBS 1X pH7,2 com Azul de Evans conforme orientação do fabricante (Sigma-Alodrich®). As lâminas foram incubadas novamente por mais 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas por microscopia de luz ultravioleta (HUND WETVLAR®). A reação é considerada positiva quando observada fluorescência nas formas promastigotas em comparação as amostras de soro controles positivo e negativo.

3.8 Nested Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.8.1 Extração de DNA de sangue total

Uma amostra de 200 µL de sangue total dos cães foi submetida ao processo de extração de DNA total utilizando o Kit Relia PrepTM Blood gDNA Miniprep System (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total foi utilizado como controle negativo 200 µL de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®) em cada bateria de amostras processadas. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.8.2 Reações de amplificação para *Leishmania* sp. baseadas na porção do gene v7-v8 18S SSU rRNA

As amostras positivas na técnica de DPP foram submetidas à nested PCR para a amplificação de fragmento de 600pb da porção do gene v7-v8 18SSU rRNA. Para esta análise, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores na primeira reação: TRY927F e TRY927R. Na segunda reação: SSU561F e SSU561R, descritos por Smith et al. (2008). A primeira reação de amplificação foi realizada no termociclador (Veriti®, modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 10ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 100mM de Cloreto de magnésio, 1U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. Nas reações de nested-PCR, foram utilizados 1µL do produto amplificado da primeira reação de PCR, em um mix contendo os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos com 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos por extensão final de 72°C por 10 minutos.

3.8.3 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares

Os controles positivos que foram utilizados em todos os ensaios moleculares de *Leishmania* spp. foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado e Prof. Dr. Marcos Rogério André (UNESP/Jaboticabal), colaboradores do presente estudo. Água ultrapura livre de DNase e RNase (UltraPureTM, Invitrogen) foi utilizada como controle negativo das reações.

3.8.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 80 V, durante 90 minutos e corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de acordo com o tamanho do produto esperado (100pb/1Kb DNA Ladder, Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através do transiluminador de luz ultravioleta L-PIX Touch (Loccus biotecnologia), no qual as bandas observadas nas amostras foram comparadas ao peso molecular para confirmação da amplificação do fragmento esperado.

3.9 Análise estatística

O teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância foi utilizado para verificar a correlação entre infecção por *Leishmania* spp. e os dados obtidos, incluindo as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, bem como as variáveis gênero, raça e idade.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de *Lilliefors* e quando apresentaram normalidade foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste t de *Student*. Entretanto, quando apresentaram não normalidade foram submetidos ao teste *Mann-Whitney*. Para a realização de todos os testes estatísticos acima mencionados foi utilizado o programa de análise estatística Bioestat 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Testes sorológicos

4.1.1 Diagnóstico utilizando o Teste Rápido Qualitativo para a detecção de anticorpos de cão para *Leishmania*: TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos

Afim de realizar a triagem das 166 amostras de cães de abrigos para *Leishmania* spp., efetuou-se o teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso (TR DPP®), no qual 18 (10,84%) animais foram sorreagentes

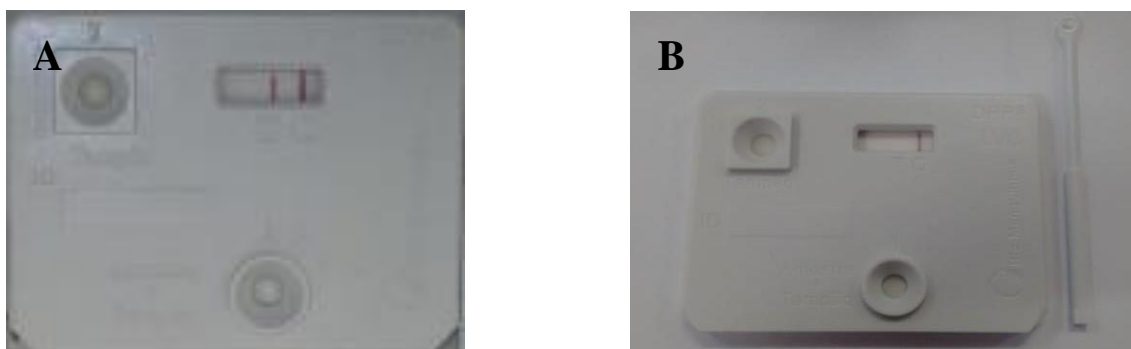


Figura 2. Imagem demonstrativa de resultado no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP®.

- a) Observação do teste positivo b) Observação do teste negativo

4.1.2 Diagnóstico utilizando a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

As 18 amostras positivas ao teste TR DPP® foram submetidas a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para confirmação dos resultados (Figura 3). Do total de amostras de soro analisadas através da RIFI, todas foram sororreagentes na titulação $\geq 1:40$.

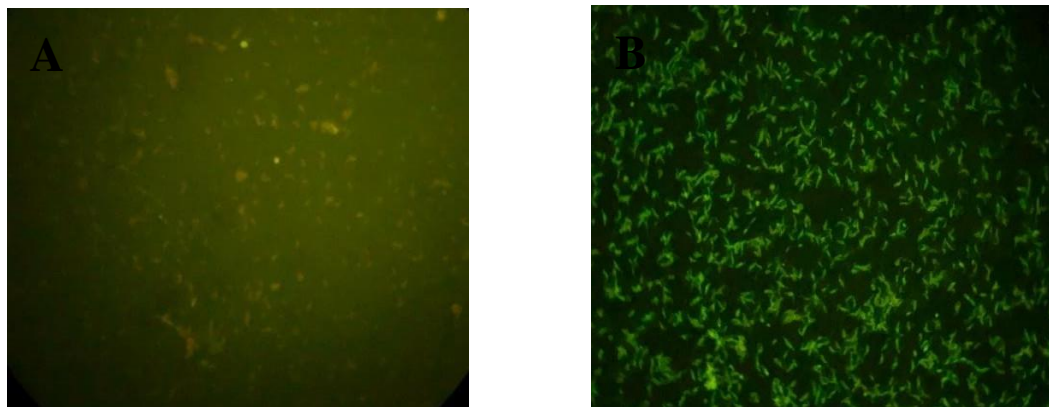


Figura 3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizando antígeno de formas promastigotas, na titulação 1:40 através da microscopia de imunofluorescência.

a) Observação de amostra não-reagente. b) Observação de amostra reagente.

4.2 Diagnóstico molecular utilizando as Reações de amplificação para *Leishmania* sp. baseadas no gene 18S SSU rRNA

Todas as amostras (n=18) que apresentaram sororreatividade nos testes diagnósticos TR DPP® e RIFI, foram submetidas a PCR baseada no gene 18S SSU rRNA. Três amostras (16,66%) apresentaram-se positivas na PCR.

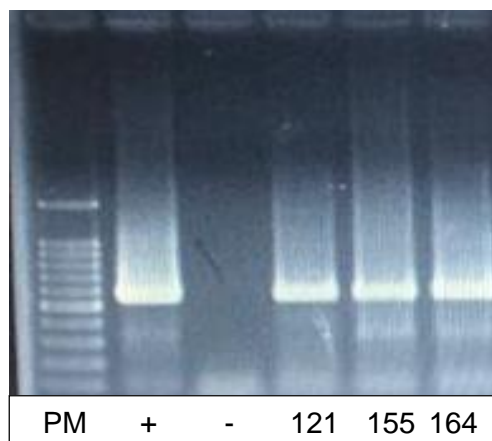


Figura 4. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 600 pares base do gene 18S SSU rRNA de *Leishmania* spp., por meio de Nested PCR, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com bormeto de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); +: Controle positivo; -: Controle negativo; 121 a 164: amostras positivas.

4.3 Distribuição de *Leishmania* na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro

Foram utilizadas 166 amostras de cães provenientes de abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. O número de amostras por município onde os abrigos estavam localizados e os resultados na técnica TR DPP® e RIFI estão descritos na Tabela 1. Devendo salientar que em todos os municípios pelo menos uma amostra foi sororreativa. Na Tabela 2, foram testadas pela técnica de PCR as 18 amostras que apresentaram-se pelas técnicas sorológicas. Adicionalmente as condições estruturais de cada abrigo e o número de animais coletados, o número de positivos em relação ao total e os animais contactantes estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 1. Frequência de cães domésticos positivos pelo teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp. oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015

Município	Positivo	Negativo	Total
Seropédica	4 (5,9%)	64 (94,1%)	68
Mesquita	1 (7,7%)	13 (92,3%)	14
Nova Iguaçu	3 (20,0%)	12 (80,0%)	15
Rio de Janeiro	8 (16,3%)	41 (83,7%)	49
São Gonçalo	1 (9,1%)	10 (90,9%)	11
Guapimirim	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9

Tabela 2. Frequência de cães domésticos positivos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leishmania* spp. oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015

Município	Positivo	Negativo	Total
Seropédica	0 (0,0%)	4 (100%)	4
Mesquita	0 (0,0%)	1 (100%)	1
Nova Iguaçu	0 (0,0%)	3 (100%)	3
Rio de Janeiro	2 (25,0%)	6 (75,0%)	8
São Gonçalo	0 (0,0%)	1 (100%)	1
Guapimirim	1 (100%)	0 (100%)	1

Tabela 3. Localização dos abrigos, condições estruturais, número de animias coletados, o número de positivos em relação ao total de animais contactantes

Cidade	Abrigo	Condição estrutural do abrigo	Número positivos/total	Animais contactantes
Guapemirim	A	Boa	1/9	Felinos e animais silvestres
Mesquita	B	Ótima	0/2	Felinos
	C	Ruim	0/12	Felinos
São Gonçalo	D	Boa	2/11	Felinos e animais silvestres
Nova Iguaçu	E	Ruim	0/15	Felinos
Rio de Janeiro	F	Péssima	6/35	Felinos, pombos, roedores, baratas
	G	Boa	2/14	Felinos, roedores
Seropédica	H	Péssima	0/9	Felinos, roedores, baratas, animais silvestres
	I	Razoável	0/4	Felinos e animais silvestres
	J	Razoável	1/8	Felinos e animais silvestres
	K	Razoável	3/47	Felinos, roedores, animais silvestres

As letras são apenas para demonstrar abrigos diferentes em cada cidade. Animais positivos nas técnicas sorológicas para *Leishmania* spp.

4.4 Análises de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de soropositividade para *Leishmania* spp.

Os valores médios do eritrograma, leucograma e complementos (proteína plasmática total e trombograma) dos cães domésticos negativos e soropositivos para *Leishmania* spp. estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Os parâmetros hematológicos não diferiram entre si a 5 % de significância. Vale ressaltar, que os eosinófilos apresentaram valores médios superiores aos determinados como referência para espécie em ambos os grupos.

Tabela 4. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos cães positivos e negativos no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® para *Leishmania* spp. e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Hematócrito (%)	Positivo	18	38,4 ^a	11,8	2,8	10,6	52,2	0,7979	37-55
	Negativo	148	37,9 ^a	7,8	0,6	18,0	61,1		
Hemácias (x10 ⁶ /µL)	Positivo	18	5,7 ^a	1,8	0,4	1,8	8,2	0,5112	5,5-8,5
	Negativo	148	5,7 ^a	1,2	0,1	2,8	8,9		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	18	12,3 ^a	4,3	1,0	3,0	17,8	0,9881	10-18
	Negativo	148	12,3 ^a	2,9	0,2	4,4	20,6		
VGM (fL)	Positivo	18	66,9 ^a	4,0	0,9	58,0	74	0,8741	60-77
	Negativo	148	67,1 ^a	4,6	0,4	42,0	79		
CHGM (%)	Positivo	18	31,7 ^a	2,6	0,6	27,0	37	0,4881	32-36
	Negativo	148	32,2 ^a	1,6	0,1	27,0	36		
Plaquetas (x10 ³ /µL)	Positivo	18	0,2 ^a	0,13	0,3	0,04	0,4	0,1540	200-500
	Negativo	148	1,9 ^a	1,57	1,3	0,03	184		
PPT (g/dl)	Positivo	18	7,3 ^a	1,0	0,2	5,0	9,0	0,3539	6-8
	Negativo	148	7,6 ^a	1,2	0,1	5,0	10,8		

^a Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. * Valores de referência segundo Jain (1993);** Valor de referência segundo Thall (2007).

Tabela 5. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)	Positivo	18	11,09 ^a	4,65	1,09	5,2	22,0	0,0929	6-17
	Negativo	148	12,66 ^a	5,02	4,12	0,32	33,6		
Bastões (x10 ³ /μL)	Positivo	18	0,03 ^a	0,02	0,06	0	0,01	0,5696	0-0,3
	Negativo	148	0,33 ^a	0,48	0,39	0	4,02		
Segmentados (x10 ³ /μL)	Positivo	18	5,92 ^a	2,33	0,55	2,90	12,01	0,0904	3-11,5
	Negativo	148	8,31 ^a	12,51	1,03	1,77	153,3		
Linfócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	18	2,63 ^a	2,29	0,54	0,50	10,4	0,1854	1-4,8
	Negativo	148	2,91 ^a	1,69	0,14	0,84	8,7		
Monócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	18	0,82 ^a	0,66	0,15	0	2,7	0,7240	0,15-1,35
	Negativo	148	0,87 ^a	0,64	0,05	0	4,3		
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	18	1,41 ^a	2,30	0,54	0	10,34	0,7475	0,1-1,25
	Negativo	148	1,31 ^a	1,34	0,11	0	7,07		

^aMédias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo Jain (1993).

De modo semelhante, as demais alterações hematológicas não foram associadas estatisticamente à infecção por *Leishmania* spp., incluindo as alterações leucocitárias (Tabela 6 e 7).

Tabela 6. Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) associadas à soropositividade por *Leishmania* spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Alteração hematológica		<i>Leishmania</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 18)	Negativos (n= 148)	
Anemia (He, Ht, Hg)	Sim	8 (44,4) ^a	69 (46,6) ^a	1,0000
	Não	10 (55,6)	79 (53,4)	
VGM reduzido	Sim	1 (5,6) ^a	14 (9,5) ^a	0,9713
	Não	17 (94,4)	134 (90,5)	
VGM aumentado	Sim	1 (5,6) ^a	6 (4,1) ^a	1,0000
	Não	17 (94,4)	142 (95,9)	
CHGM reduzido	Sim	8 (44,4) ^a	41 (27,7) ^a	0,1723
	Não	10 (55,6)	107 (72,3)	
CHGM aumentado	Sim	1 (5,6) ^a	0 (0) ^a	0,1084
	Não	17 (94,4)	148 (100)	
Hipoproteinemia	Sim	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1,0000
	Não	18 (100)	148 (100)	
Hiperproteinemia	Sim	2 (11,1) ^a	42 (28,4) ^a	0,1596
	Não	16 (88,9)	106 (71,6)	
Trombocitopenia	Sim	8 (44,4) ^a	37 (25,0) ^a	0,0948
	Não	10 (55,6)	111 (75,0)	
Trombocitose	Sim	0 (0) ^a	2 (1,4) ^a	1,0000
	Não	18 (100)	146 (98,6)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; n: Número de cães; VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média.

Tabela 7. Alterações no leucograma associadas à soropositividade por *Leishmania* spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Alteração hematológica		<i>Leishmania</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 18)	Negativos (n= 148)	
Leucopenia	Sim	2 (11,1) ^a	8 (5,4) ^a	0,2948
	Não	16 (88,9)	140 (94,6)	
Leucocitose	Sim	2 (11,1) ^a	23 (15,5) ^a	0,7442
	Não	16 (88,9)	125 (84,5)	
Neutropenia	Sim	1 (5,6) ^a	6 (4,1) ^a	0,9713
	Não	17 (94,4)	142 (90,5)	
Neutrofilia	Sim	1 (5,6) ^a	14 (9,5) ^a	0,7075
	Não	17 (94,4)	134 (90,5)	
Monocitose	Sim	3 (16,7) ^a	22 (14,9) ^a	0,9922
	Não	15 (83,3)	126 (85,1)	
Eosinofilia	Sim	8 (44,4) ^a	52 (35,1) ^a	0,4466
	Não	10 (55,6)	96 (64,9)	
Linfopenia	Sim	3 (16,7) ^a	13 (8,8) ^a	0,3867
	Não	15 (83,3)	135 (91,2)	
Linfocitose	Sim	2 (11,1) ^a	19 (12,8) ^a	1,0000
	Não	16 (88,9)	129 (87,2)	
Basofilia	Sim	0 (0) ^a	6 (4,1) ^a	0,6249
	Não	18 (100)	142 (95,9)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; n: Número de cães;

4.5 Análises de parâmetros bioquímicos correlacionados com a ocorrência de soropositividade para *Leishmania* spp.

Na avaliação dos valores médios dos parâmetros de bioquímica sanguínea, não se evidenciou diferença significativa (Tabela 8). O parâmetro proteína total apresentou valor médio inferior ao intervalo de referência estabelecido para espécie quando analisado ambos os grupos. O parâmetro bioquímico uréia apresentou o valor médio superior ao intervalo de referência estabelecidos em ambos grupos, mas não diferiram entre si a 5% de significância.

Tabela 8. Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos no teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania* spp, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Albumina (g/dl)	Positivo	18	2,61 ^a	0,58	0,14	1,3	3,3	0,9955	2,6-4,3
	Negativo	144	2,58 ^a	0,53	0,04	0,9	4,03		
Falc (U/L)	Positivo	18	66,1 ^a	66,8	15,75	16	302	0,9241	10-150
	Negativo	145	62,0 ^a	49,4	4,10	24	303		
Creatinina (mg/dl)	Positivo	18	1,0 ^a	0,35	0,082	0,3	1,5	0,2723	0,4-1,8
	Negativo	144	0,9 ^a	0,29	0,024	0,3	2,1		
Uréia (mg/dl)	Positivo	18	34,2 ^a	13,65	3,21	10	60	0,8043	7,0-27,0
	Negativo	144	34,3 ^a	13,42	1,12	7	89		
Proteína (mg/dl)	Positivo	13	4,55 ^a	0,69	0,19	3,0	5,8	0,6742	5,1-7,8
	Negativo	79	4,53 ^a	0,45	0,05	3,9	6,0		
ALT (U/L)	Positivo	18	45,8 ^a	51,80	12,21	20	244	0,2908	5-60
	Negativo	145	52,3 ^a	77,84	6,46	10	712		
AST (U/L)	Positivo	15	34,2	12,76	3,29	10	60	0,5131	5-55,0
	Negativo	104	35,9	15,25	1,49	15	108		

^a Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ($p > 0,05$). AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo JR. Smith & Tiley (2008).

Com relação a avaliação por frequência das alterações bioquímicas nos animais soropositivos e negativos (Tabela 9), não observou-se diferença estatística quanto à hipoproteinemia e azotemia (uréia elevada), apesar de ambos grupos de animais apresentarem essa alteração.

Tabela 9. Alterações na bioquímica sanguínea associadas à soropositividade por *Leishmania* spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Alteração bioquímica		<i>Leishmania</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos	Negativos	
Fosfatase alacalina elevada	Sim	1 (5,6) ^a	8 (5,5) ^a	0,9375
	Não	17 (94,4)	137 (95,5)	
ALT elevada	Sim	3 (16,7) ^a	26 (17,9) ^a	1,0000
	Não	15 (83,3)	119 (82,1)	
Albumina elevada	Sim	3 (16,7) ^a	21 (14,6) ^a	0,9931
	Não	15 (83,3)	123 (85,4)	
Albumina diminuída	Sim	6 (33,3) ^a	36 (25,0) ^a	0,5682
	Não	12 (66,7)	108 (75,0)	
Ureia elevada	Sim	13 (72,2) ^a	104 (72,2) ^a	0,9982
	Não	5 (16,7)	40 (30,7)	
Creatinina elevada	Sim	0 (0) ^a	3 (2,1) ^a	1,0000
	Não	18 (100)	141 (97,9)	
Creatinina diminuída	Sim	1 (5,6) ^a	1 (0,7) ^a	0,2105
	Não	17 (94,4)	143 (99,3)	
AST aumentada	Sim	2 (13,3) ^a	8 (7,7) ^a	0,6098
	Não	13 (86,7)	104 (92,3)	
Hiperproteinemia	Sim	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1,0000
	Não	13 (100)	79 (100)	
Hipoproteinemia	Sim	10 (76,9) ^a	70 (88,6) ^a	0,3664
	Não	3 (23,1)	9 (11,4)	
Hiperglobulinemia	Sim	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1,0000
	Não	1 (100)	16 (100)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5; n: Número de cães; AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina. O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros.

4.6 Fatores associados à soropositividade para *Leishmania* spp. utilizando a técnica TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Considerando-se as variáveis analisadas (sintomas, sexo, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinantrópicos, castração), não observou-se associação estatística com a infecção pelo agente (Tabela 10). Em relação ao sexo, observou-se um maior percentual de cães fêmeas associados à infecção. Quanto a faixa etária, evidenciou-se maior percentual de infecção por *Leishmania* spp. nos cães adultos.

Tabela 10. Associação entre os dados de sintomático, sexo, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinantrópicos, castração e o resultado pelo teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso TR DPP® e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para o agente *Leishmania* spp.

Fatores associados à infecção		<i>Leishmania</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 18)	Negativos (n= 148)	
Sintomático	Sim	3 (25,0) ^a	18 (10,8)	0,7014
	Não	15 (75,0) ^a	132 (89,2)	
Sexo	Fêmea	13 (72,2) ^a	99 (66,9)	0,7926
	Macho	5 (27,8) ^a	49 (33,1)	
Idade	Filhote	4 (22,2) ^a	12 (8,1)	0,0766
	Adulto	14 (77,8) ^a	136 (91,9)	
Contato com outras espécies	Sim	17 (94,4) ^a	129 (87,2)	0,4803
	Não	1 (5,6) ^a	19 (12,8)	
Contato com animais sinantrópicos	Sim	9 (50,0) ^a	70 (47,3)	1,0000
	Não	9 (50,0) ^a	78 (52,7)	
Castrado (a)	Sim	7 (38,9) ^a	36 (9,8)	0,2519
	Não	11 (61,1) ^a	112 (90,2)	

*Filhotes de 0 a 12 meses. Número de animais = n. A Valores seguidos de mesma letra, não diferem significativamente através do teste de Quiquadrado a 5% de significância ($p < 0,05$).

4.7 Análises de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de positividade para *Leishmania* spp. na técnica molecular

Os valores médios, máximo e mínimo do eritrograma, leucograma e complementos (proteína plasmática total e trombograma) dos cães domésticos negativos e positivos para *Leishmania* spp. pela PCR estão apresentados nas Tabelas 11 e 12. O parâmetro eosinófilo apresentou o valor médio superior ao intervalo de referência estabelecido para espécie quando analisado no grupo positivo. Não foi possível realizar a análise estatística devido ao número de animais positivos ser reduzido.

Tabela 11. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Parâmetros	Resultado	N	Média	Mín.	Máx.	Referência
Hematócrito (%)	Positivo	3	38,6	22,2	50,1	37-55
	Negativo	15	38,3	10,6	52,2	
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Positivo	3	5,7	3,2	7,2	5,5-8,5
	Negativo	15	5,7	1,8	8,2	
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	3	12,1	6,4	15,6	10-18
	Negativo	15	12,3	3	17,8	
VGM (fL)	Positivo	3	68,7	66	70	60-77
	Negativo	15	66,5	58	74	
CHGM (%)	Positivo	3	33,0	31	35	32-36
	Negativo	15	31,5	27	37	
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Positivo	3	325,7	210	411	200-500
	Negativo	15	187,2	39	400	
PPT (g/dl)	Positivo	3	7,4	7	8	6-8
	Negativo	15	7,2	5	9	

Tabela 12. Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente para *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Parâmetros	Resultado	N	Média	Mín.	Máx.	Referência
Leucócitos totais($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Positivo	3	15,2	10,0	10,3	6-17
	Negativo	15	10,3	5,2	19,7	
Segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Positivo	3	7,1	6,4	7,8	3-11,5
	Negativo	15	5,7	2,9	12,0	
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Positivo	3	3,07	1,0	4,8	1- 4,8
	Negativo	15	2,55	0,5	10,4	
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Positivo	3	0,75	0,4	4,8	0,15-1,35
	Negativo	15	0,84	0,0	2,8	
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Positivo	3	3,95	0,3	10,3	0,1-1,25
	Negativo	15	0,90	0,0	2,01	

Na análise de frequência das alterações hematológicas e leucocitárias (Tabela 13 e 14), não observou-se uma diferença significativa entre os grupos.

Tabela 13. Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp. em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Alteração hematológica		<i>Leishmania</i> spp. n (%)	
		Positivos (n= 3)	Negativos (n= 15)
Anemia (He, Ht, Hg)	Sim	1 (33,3)	7 (46,7)
	Não	2 (66,7)	8 (53,3)
VGM reduzido	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	3 (100,0)	14 (93,3)
VGM aumentado	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)
	Não	3 (100,0)	15 (100,0)
CHGM reduzido	Sim	1 (33,3)	7 (46,7)
	Não	2 (66,7)	8 (53,3)
CHGM aumentado	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	3 (100,0)	14 (93,3)
Hipoproteinemia	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	18 (100,0)	14 (93,3)
Hiperproteinemia	Sim	0 (0,0)	2 (13,3)
	Não	3 (100,0)	13 (86,7)
Trombocitopenia	Sim	0 (0,0)	8 (53,3)
	Não	3 (100,0)	7 (46,7)
Trombocitose	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)
	Não	3 (100,0)	15 (100,0)

Número de animais = n. Estatística não foi realizada devido ao N inferior ao mínimo.

Tabela 14. Alterações no leucograma associadas aos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp., oriundos abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Alteração hematológica		<i>Leishmania</i> spp. n (%)	
		Positivos (n= 3)	Negativos (n= 15)
Leucopenia	Sim	0 (0,0)	2 (13,3)
	Não	3 (100,0)	13 (86,7)
Leucocitose	Sim	1 (33,3)	1 (6,7)
	Não	2 (66,7)	14 (93,3)
Neutropenia	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	3 (100,0)	14 (93,3)
Neutrofilia	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	3 (100,0)	14 (93,3)
Monocitose	Sim	1 (33,3)	2 (13,3)
	Não	2 (66,7)	13 (86,7)
Eosinofilia	Sim	1 (33,3)	7 (46,7)
	Não	2 (66,7)	8 (53,3)
Linfopenia	Sim	0 (0,0)	3 (20,0)
	Não	3 (100,0)	12 (80,0)
Linfocitose	Sim	1 (33,3)	1 (6,7)
	Não	2 (66,7)	14 (93,3)
Basofilia	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)
	Não	3 (100,0)	15 (100,0)

Número de animais = n. Estatística não foi realizada devido ao N inferior ao mínimo.

4.8 Análises de parâmetros bioquímicos correlacionados com a ocorrência de positividade para *Leishmania* spp. na técnica molecular

Na avaliação dos valores médios dos parâmetros de bioquímica sanguínea (Tabela 15), observou-se, que no grupo de animais positivos, o parâmetro albumina foi inferior ao valor de referência. O parâmetro proteína total apresentou valor médio inferior ao intervalo de referência estabelecido para espécie quando analisado ambos os grupos. Uréia, por sua vez, apresentou o valor médio superior ao intervalo de referência estabelecido em ambos grupos. O parâmetro bioquímico proteína apresentou valor médio inferior ao valor de referência em ambos grupos.

Não foi possível realizar a análise estatística devido ao número de animais positivos ser reduzido.

Tabela 15: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Parâmetros	Resultado	N	Média	Mín.	Máx.	Referência*
Albumina (g/dl)	Positivo	3	2,43	2,0	3,1	2,6-4,3
	Negativo	15	2,65	1,3	3,3	
Falc (U/L)	Positivo	3	47,3	16	85	10-150
	Negativo	15	70,5	24	302	
Creatinina (mg/dl)	Positivo	3	1,0	0,8	1,3	0,4-1,8
	Negativo	15	1,0	0,3	1,5	
Uréia (mg/dl)	Positivo	3	34,2 ^a	10	60	7,0-27,0
	Negativo	15	33,0	10	60	
Proteína (mg/dl)	Positivo	3	4,6	4,4	4,9	5,1-7,8
	Negativo	10	4,5	3,0	5,8	
ALT (U/L)	Positivo	3	33,33	26	43	5-60
	Negativo	15	48,26	20	244	
AST (U/L)	Positivo	3	27,3	20	31	5-55,0
	Negativo	12	35,9	10	60	

Com relação a avaliação por frequência das alterações bioquímicas nos animais positivos e negativos (Tabela 16), observou-se que ambos grupos apresentaram frequência de hipoproteïnemia e azotemia (uréia elevada). O grupo positivo apresentou uma elevada frequência de hipoalbuminemia.

Tabela 16. Alterações na bioquímica sanguínea associadas aos cães positivos e negativos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente para *Leishmania* spp., oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

Alteração bioquímica		<i>Leishmania</i> spp. n (%)	
		Positivos	Negativos
Fosfatase alacalina elevada	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	3 (100,0)	14 (93,3)
ALT elevada	Sim	0 (0,0)	3 (20,0)
	Não	3 (100,0)	12 (80,0)
Albumina elevada	Sim	0 (0,0)	3 (20,0)
	Não	3 (100,0)	12 (80,0)
Albumina diminuída	Sim	2 (66,7)	4 (26,7)
	Não	1 (33,3)	11 (73,3)
Ureia elevada	Sim	3 (100,0)	10 (66,7)
	Não	0 (0,0)	5 (33,3)
Creatinina elevada	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)
	Não	3 (100,0)	15 (100,0)
Creatinina diminuída	Sim	0 (0,0)	1 (6,7)
	Não	3 (100)	14 (93,3)
AST aumentada	Sim	0 (0,0)	2 (16,7)
	Não	3 (100,0)	10 (83,3)
Hiperproteinemia	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)
	Não	3 (100,0)	10 (100,0)
Hipoproteinemia	Sim	3 (100,0)	7 (70,0)
	Não	0 (0,0)	3 (30,0)

4.9 Fatores associados a positividade para o agente *Leishmania* spp. utilizando a técnica molecular

Considerando-se as variáveis analisadas (sintomas, sexo, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinantrópicos, castração), observou-se a porcentagem de ocorrência no grupos positivos e negativos para *Leishmania* spp. (Tabela 17). Em relação ao sexo, observou-se, um maior percentual de cães fêmeas associados à infecção. Quanto a faixa etária, evidenciou-se maior percentual de infecção por *Leishmania* spp. nos cães adultos. Todos os animais positivos tiveram contato com animais sinantrópicos e outras espécies. Não foi possível realizar a análise estatística devido ao número de animais positivos ser reduzido.

O animal positivo sintomático pertencia a faixa etária de filhote. Constatamos em seu exame clínico as seguintes alterações: alopecia, lesões, secreção ocular, narinas ressecadas, linfonodos submandibulares aumentados e letargia.

Tabela 17. Associação entre os dados de sintomático, sexo, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinantrópicos, castração com o resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o agente *Leishmania* spp.

Fatores associados à infecção		<i>Leishmania</i> spp. n (%)	
		Positivos (n= 3)	Negativos (n= 15)
Sintomático	Sim	1 (33,3)	0 (0,0)
	Não	2 (66,7)	15 (100,0)
Sexo	Fêmea	2 (66,7)	11 (73,3)
	Macho	1 (33,3)	4 (26,7)
Idade	Filhote	1 (33,3)	3 (20,0)
	Adulto	2 (66,7)	12 (80,0)
Contato com outras espécies	Sim	3 (100,0)	14 (93,3)
	Não	0 (0,0)	1 (6,7)
Contato com animais sinantrópicos	Sim	3 (100,0)	6 (40,0)
	Não	0 (0,0)	9 (60,0)
Castrado (a)	Sim	1 (33,3)	9 (60,0)
	Não	2 (66,7)	6 (40,0)

*Filhotes de 0 a 12 meses.

5 DISCUSSÃO

No Brasil, os estudos de prevalência de leishmanias em cães domésticos devem ser intensificados, para facilitar a implementação de estratégias de controle da afecção. Acredita-se, que a presença do agente na população canina permanece subdiagnosticada por diversos fatores. Este trabalho caracterizou a ocorrência da infecção por leishmanias e as alterações hematológicas, bioquímicas e fatores de risco associados a esses agentes, na população canina de cães oriundos de abrigos localizados em municípios da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, constituindo-se em estudo pioneiro em abrigos na região, principalmente, por abranger seis municípios e um total de onze abrigos.

Ressaltamos que com a elevada demanda de animais abandonados nas ruas, cresce o número de pessoas mobilizadas para auxiliar na implementação de abrigos, auxiliando financeiramente ou até mesmo com o trabalho voluntário. A falta de efetividade das políticas públicas de controle de natalidade desses animais, falta de responsabilidade dos proprietários de animais que permitem a procriação indiscriminada, possibilitaram o aumento de cães abandonados nas ruas. Os abrigos são formados de uma maneira menos organizada, sendo responsabilidade de um proprietário ou grupos de voluntários o recolhimento dos animais abandonados e não possuem auxílio fixo de outras pessoas para mantê-los normalmente nas dependências de suas residências.

A Saúde Pública é um dever do Estado, porém cabe uma ação conjunta dos diversos segmentos da sociedade na prevenção, proteção e promoção da saúde da população, aliado aos recursos técnicos e participação das autoridades sanitárias, agrícolas e os profissionais envolvidos, tanto na clínica como na pesquisa, no setor público ou privado (MEDITSCH, 2006). A promoção da saúde animal, gera a promoção de saúde humana através de ações de controle de doenças dos animais, com ênfase em LV canina. Sendo de grande valia o diagnóstico da afecção para nortear suas ações preventivas dos órgãos governamentais e voluntários. Possibilitando a realizando inúmeras atividades direcionadas a populações em abrigos, situações de desastre, de abandono e maus-tratos, ofertando assim a possibilidade de atendimento clínico, práticas em medicina preventiva, controle populacional e educação da comunidade local.

A comunidade científica tem apresentado através de publicações, evidências que novos caminhos devem ser buscados para o controle de doenças e, nessa visão, as zoonoses devem ser compreendidas dentro do contexto de saúde única, buscando o bem estar animal para alcançar a saúde humana (DAY, 2010; ASSIS; RIBEIRO, 2015). A LV se encaixa nessa discussão onde, atualmente, ela tem sido um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil, envolvendo os cães, que têm sido nos últimos 50 anos as maiores vítimas das ações de controle que consistiam principalmente no abate canino e pouco em programas continuados de educação em saúde junto as populações humanas envolvidas. As ações sugeridas para o controle da LV canina e, conseqüentemente da LV, podem ser resumidas em ações de combate ao vetor, controle populacional dos animais, vacinação dos cães contra LV canina, tratamento dos animais e educação em saúde (RIBEIRO et al., 2013).

O controle vetorial e a vacinação apontadas, em estudos estatísticos, como as principais ferramentas para o controle da LV (DYE, 1996). O uso de inseticidas (coleiras, pipetas, sprays) em cães é essencial e deve ser incentivado pelo governo em áreas pobres. Ressaltamos que tais

medidas, não eram adotadas nos abrigos que realizamos as coletas do nosso estudo. Acreditamos que devido a falta de informações e ao alto custo das vacinas e inseticidas.

No presente estudo, as amostras foram obtidas de abrigos com condições estruturais e financeiras bem distintas. Havia alguns locais com disponibilidade frequente de atendimento veterinário, alimentação de qualidade, separação adequada dos animais, voluntários e controle de capacidade máxima de animais. No entanto, alguns abrigos apresentavam superlotação, ausência de auxílio veterinário e até mesmo alimentação escassa devido à dificuldades financeiras. Por mais que a intenção seja melhorar a qualidade de vida desses animais abandonados, não é a solução deixá-los aglomerados em locais sem condições para mantê-los. Consequentemente, há grande possibilidade de proliferação de doenças pela alta concentração de animais e dentre estas, inclui-se a leishmaniose. Principalmente, pelo acúmulo de matéria orgânica dos dejetos dos animais, favorecendo o desenvolvimento do vetor.

Conforme observado por Silva (2012), ambientes em condições de limpeza moderada à ruim estiveram mais associados à ocorrência de animais soropositivos à leishmaniose. Em relação ao recolhimento das fezes dos animais, pode-se dizer que houve associação entre o não recolhimento e sororreatividade dos animais à *Leishmania* spp., pois 44% dos animais em que seus donos não fazem o recolhimento das fezes foram reagentes nas técnicas sorológicas Imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático. Segundo estudo realizado em Montes Claros (MG) por Monteiro e colaboradores (2005) e em Belo Horizonte (MG) por Moreno e colaboradores (2005), a presença de animais domésticos, resultando em acúmulo de matéria orgânica e o armazenamento de lixo de forma inadequada, propicia o ambiente característico e propício para à ocorrência de leishmaniose visceral. No presente estudo, um terço dos animais sororreagentes encontravam-se em um abrigo com as condições estruturais e higiênico sanitárias classificado como péssima, com isso dando ênfase sobre uma tendência sobre a correlação ambiental e positividade. Ressaltando que não podemos afirmar que os animais foram infectados nos abrigos.

Ademais, é de suma importância a triagem dos cães para leishmaniose antes de entrar nos abrigos e principalmente antes da doação, especialmente em áreas endêmicas. Desta forma, diminuindo a propagação da afecção entre os animais e sua disseminação para locais não-endêmicos. No presente estudo, os resultados obtidos com a técnica diagnóstica para triagem das amostras, o Teste Rápido Qualitativo para a detecção de anticorpos de cão para *Leishmania* (TR DPP®), demonstraram que 10,84 % (18/166) das amostras foram positivas para *Leishmania* spp. As amostras positivas foram submetidas ao teste diagnóstico Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e todas foram sororreagentes na titulação $\geq 1:40$.

Silva (2012) analisou amostras de sangue de cães da microrregião de Itaguaí (RJ) e observou 28,24% (n=148/524) de soropositividade pela imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático para *Leishmania* spp. As mesmas amostras foram submetidas ao teste rápido (TR DPP®), sendo considerados positivos 18 (0,03%, n=18/524). Entretanto, somente oito desses animais, foram também reagentes na RIFI e no ELISA, considerando-os como reagentes para leishmaniose visceral. O nosso estudo apresentou uma soropositividade inferior, mas obtivemos 100% de correspondência entre as análises de (TR DPP®) com confirmação do resultado na RIFI.

No presente estudo, as amostras que apresentaram sororreatividade nos testes diagnósticos TR DPP® e RIFI foram utilizadas para o diagnóstico molecular baseadas no gene 18S SSU. Com isso, testou-se 18 amostras de sangue na Nested PCR que foram positivas em ambos testes supracitados, sendo 3 (16,66%) amostras positivas para *Leishmania* spp. Fisa e colaboradores (2001) demonstraram a elevada sensibilidade desta técnica ao utilizar células mononucleares de sangue periférico. Além disso, relataram resultados positivos para Nested

PCR em cães cujos níveis específicos de imunoglobulinas eram muito próximos aos do cut-off no ELISA, demonstrando ser uma ferramenta que a técnica sensível e específica para o diagnóstico da leishmaniose. A menor positividade observada pelo método molecular em detrimento dos testes sorológicos é previsível e pode ser explicado pelo fato dos testes sorológicos detectarem contato prévio com o agente, ao passo que a PCR detecta diretamente o parasito na circulação. Tal o fato, que a soroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem elevados por, pelo menos, dois anos (SCHIMMING; SILVA, 2012).

No entanto, é digno de nota, que a sorologia pode fornecer resultados negativos durante a primeira semana de infecção, uma limitação destes testes que não detectam a infecção em sua fase aguda (WALKER; DUMLER, 1996; WANER et al., 2001; PADDOCK; CHILDS, 2003) e também não diferenciam um quadro de infecção atual de um quadro de exposição sem infecção propriamente dita ou de uma infecção prévia (SHAW et al., 2001). Deve-se também levar em consideração a variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos e ao antígeno utilizado (SHAW et al., 2001).

Segundo Manna et al. (2007), a PCR é uma ferramenta extremamente importante em casos em que as técnicas sorológicas ou parasitológicas são inconclusivas. Diferentes tipos de amostras biológicas, tais como aspirados esplênicos, medula óssea, sangue total, camada leucocitária, de linfonodos, cultura e sangue coletado em papel-filtro podem ser utilizados como fonte de material para as reações (GONTIJO; MELO, 2004). Uma incompatibilidade de resultados relatada por diversos estudos e a imunodeficiência de alguns cães e a resultante inabilidade de produzir suficiente quantidade de anticorpos, podendo contribuir para os resultados positivos pela PCR dos casos que reagiram negativos pela RIFI (CABRAL, 2007; REALE et al. 1999; BERRAHAL et al. 1996).

Estudos têm demonstrado resultados mais favoráveis com amostras de pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos, com menor sensibilidade e especificidade quando o sangue periférico é utilizado como amostra, provavelmente devido ao número de parasitas presentes nesse tecido (FICHOUX et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; NUNES et al., 2007; FERREIRA et al., 2008). Alguns trabalhos observaram baixa sensibilidade da PCR quando foram utilizadas amostras sanguíneas, tendo como principal causa a possível interferência de inibidores da *Taq polimerase* (AL-SOUD et al., 1998; SANTOS et al., 2010; FARIA et al., 2012). Assim como a eficácia da técnica depende do primer, do método utilizado para extração do DNA (REITHINGER et al. 2000; LACHAUD et al. 2001; ALVAR et al., 2004; MAIA; CAMPINO, 2008), o resultado negativo no diagnóstico por PCR de um cão com suspeita clínica, não é suficiente para afastar a possibilidade de infecção. De fato, o grupo de estudo em leishmaniose LeishBrasil (2018), baseado em convenções internacionais, sugere que em casos com suspeita clínica elevada para leishmaniose canina mesmo com o resultado negativo na PCR, deve-se considerar outros métodos diagnósticos ou repetir exames a critério do clínico.

Entretanto, inúmeros grupos de pesquisa sugerem que amostras sanguíneas constituem material confiável para o diagnóstico da leishmaniose canina, apresentando coleta simples e alternativa pouco invasiva (REALE et al., 1999; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MANNA et al., 2004). O estudo realizado por Portella (2018), utilizou amostras de sangue coletadas de cães residentes na Região Oceânica de Itaipu, Município de Niterói (RJ), onde das 174 amostras, uma foi positiva pela PCR utilizando o alvo intergênico ITS 1 e quatro para o teste DPP (2,29%). A baixa sensibilidade evidenciada pode ser justificada por alguns fatores. De modo geral, há grande variação da sensibilidade do método de PCR particularmente no que se refere ao método de extração de DNA utilizado, da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores,

das amostras clínicas utilizadas bem como do tempo de infecção e parasitemia (QUINNELLB et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MANNA et al., 2004). Assim como no nosso estudo, Menezes (2014) utilizou a técnica de Nested PCR que apontou 26 cães positivos e DPP com 11 cães sororreagentes. Podemos considerar que a prevalência canina de uma área endêmica pode se revelar maior quando são combinadas técnicas sorológicas e moleculares no diagnóstico (ALVAR, et al. 2004). Diferindo do resultado do presente estudo, os resultados da análise molecular foi superior ao sorológico individualmente. Essa discrepância entre teste sorológico e molecular, pode ser explicada pela resposta imune heterogênea que os cães infectados por *L. (L.) infantum* desenvolvem devido à participação de diversos antígenos, os quais são reconhecidos de maneiras distintas nos diferentes indivíduos e estágios da doença (FALQUETO, et al. 2009). Por isso, é recomendável a utilização de testes em paralelo ou com múltiplos antígenos para identificar um maior número de animais infectados (FALQUETO, et al. 2009, DOMINGOS, 2012). Entretanto, ressalta-se que no nosso estudo, por questões financeiras, não foi possível realizar a Nested PCR de todos os animais. Desta maneira, não foi possível averiguar se haviam animais positivos apenas na análise molecular.

Lopes (2010), utilizando amostras de aspirado de medula óssea de 72 cães com sorodiagnóstico positivo na técnica RIFI, oriundos do município de Espírito Santo do Pinhal (SP), realizou a PCR com os *primers* 13A e 13B e observou apenas 24 cães positivos. Resultados semelhantes foram relatados por Nunes et al. (2007), no município de Poxoréo (MS), utilizando amostras de sangue na PCR e os mesmos *primers*, de modo que das 80 amostras positivas na RIFI, 44 permaneceram positivas na análise molecular. Ambos estudos demonstram que a PCR por ser uma técnica direta, usualmente apresenta menor positividade em detrimento dos ensaios sorológicos, os quais detectam anticorpos (contato prévio), conforme observado no presente estudo.

O estudo de Zanette e colaboradores (2014), demonstrou que os testes sorológicos apresentam limitações importantes, como reações cruzadas com os parasitas *Trypanosoma*, espécies de leishmaniose cutânea e outros hemoparasitas (*Anaplasma spp.*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*), bem como resultados falso-negativos em casos de baixos títulos. Assim, o uso de métodos sorológicos com baixos títulos de anticorpos para o diagnóstico de cães infectados por *Leishmania* como critério para a eutanásia deve ser reavaliados.

A combinação de diferentes técnicas diagnósticas reduz a possibilidade de resultados incorretos (falso-positivos e falso-negativos), aumentando as chances de um diagnóstico preciso para a leishmaniose. Diversos estudos demonstraram que a associação de testes distintos concorre para a obtenção de resultados mais seguros (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; LIRA, 2005; CARVALHO, 2009; QUEIROZ et al., 2010; MENEZES, 2014).

As análises hematológicas tem sido utilizadas amplamente com a finalidade de obter informações acerca de doenças que acometem uma ampla variedade de animais domésticos para facilitar e direcionar o diagnóstico e monitoramento clínico. Na análise hematológica foram avaliados o eritrograma, leucograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total) dos cães positivos para *Leishmania spp.* utilizando as técnicas de TR DPP® e RIFI e, posteriormente para técnica molecular. A avaliação hematológica foi representada por dois métodos estatísticos, possibilitando uma avaliação pelos valores médios entre os grupos positivos e negativos e pela frequência das alterações em cada grupo. No presente estudo, não foi observada correlação estatística entre a afecção e as análises hematológicas ($p > 0,05$).

Os valores médios de eosinófilos apresentaram-se acima do intervalo de referência em ambos grupos positivos e negativos para *Leishmania spp.*, mas não apresentou correlação com

a infecção por *Leishmania* spp. A eosinofilia está relacionada a funções anti-inflamatórias, distúrbios de hipersensibilidade devido ao prurido por picada de ectoparasitas e à infecções por helmintos (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Devemos salientar que nos abrigos que coletamos, devido a fatores financeiros e estruturais, é bastante difícil ter um controle adequado de ectoparasitas e endoparasitas, o que certamente esteja favorecendo a ocorrência da eosinofilia observada no presente estudo. O valor médio de eosinófilos também apresentou-se acima do intervalo de referência no grupo positivo para *Leishmania* spp. na técnica de PCR, mas não demonstrou diferença significativa.

A bioquímica sanguínea tem sido aplicada para obter informações sobre doenças que acometem uma ampla variedade de animais domésticos, dessa forma auxiliando e direcionando o diagnóstico clínico. No presente estudo, os parâmetros séricos avaliados foram: proteína total, albumina, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina. A avaliação bioquímica foi representada por dois métodos estatísticos, possibilitando avaliar os resultados pelos valores médios entre os grupos positivos e negativos e pela frequência das alterações em cada grupo.

Os valores médios dos cães positivos para *Leishmania* spp. pelas técnicas TR DPP® e RIFI, não demonstraram haver diferença significativa nos parâmetros bioquímicos. Ressalta-se, no que se refere a proteína total, que ambos os grupos de animais apresentaram valor médio inferior ao intervalo de referência estabelecido para espécie. Acredita-se, que no presente estudo, devido ao fato dos animais serem de abrigos, a hipoproteïnemia esteja associada a proteólise devido a necessidade do animal em manter seu metabolismo retirando das suas reservas corpóreas a sua fonte de energia, devido a falta de alimento de qualidade disponível (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Adicionalmente, a elevação dos valores de uréia (azotemia) em ambos grupos, representa um aumento de compostos nitrogenados não proteicos no sangue, sendo no presente estudo, um caso desidratação observada em alguns animais, pode também ter contribuído para essa azotemia pre-renal (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

No grupo de animais positivos, observou-se hipoalbuminemia, que pode estar associada a estados caquéticos (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Tal hipótese, corrobora com o achado de hipoproteïnemia evidenciada em alguns animais e é condizente com as condições de alimentação da maioria dos abrigos do presente estudo. Muitos dos abrigos visitados utilizavam ração de baixa qualidade nutricional e até mesmo alimento caseiro pobre em nutrientes, apresentando quadros de caquexia e inanição.

Devido ao número reduzido de animais positivos na técnica de PCR, não foi possível a realização da correlação estatística dos resultados entre o grupo de animais positivos e negativos para *Leishmania* spp.. Na análise de frequência, azotemia foi observada em todos os animais positivos e em 66,7% dos negativos. O parâmetro hipoproteïnemia ocorreu em 100% dos positivos e 70,0% nos negativos. O parâmetro hipoalbuminemia ocorreu em 66,7% dos animais positivos. As possíveis explicações para estas ocorrências são as mesmas já relatadas para a análise dos animais sorologicamente positivos, descrito acima.

O hemograma completo e a bioquímica sanguínea são instrumentos para avaliação do estado fisiológico, diagnóstico e monitoramento do animal, servindo para complementar o exame clínico e anamnese realizados pelo médico veterinário. As alterações hematológicas e achados bioquímicos são susceptíveis a oscilação de acordo com o estágio clínico da doença. Desta forma as alterações encontradas nesse estudo podem ocorrer em inúmeras patologias, devendo sempre ser correlacionada com outros dados para concluir o diagnóstico.

Os fatores associados à infecção levam em consideração aspectos clínicos juntamente com a anamnese e demonstram grande importância na questão do diagnóstico precoce de

doenças a fim de intervir na propagação da infecção. O exame clínico do animal pode ser subjetivo em alguns aspectos, devendo-se utilizá-lo em conjunto com exames laboratoriais.

Com relação aos fatores associados (sintomatologia, sexo, idade, contato com outras espécies, contato com animais sinatrópicos, castração), não apresentaram associação significativa a infecção por *Leishmania* spp. ($p > 0,05$) Analisando a frequência relacionada aos animais positivos nas técnicas de TR DPP® e RIFI as tendências foram: sexo feminino (72,2%), adultos (77,8%) e o contato de animais positivos com outras espécies (94,4%).

Em concordância com o nosso trabalho, os resultados obtidos por Inácio (2019), Portella (2018), Gontijo & Melo (2004) e Feitosa et al. (2000), verificaram que ambos os sexos e a correlação etária estão igualmente expostos ao risco de infecção por *Leishmania* spp. Assim como os estudos de Figueiredo et al. (2014) e Silva et al. (2013) que verificaram que ambos os sexos estão igualmente expostos ao risco de infecção por *Leishmania* spp. Em contrapartida o trabalho realizado por Silva e colaboradores (2017), constatou que fêmeas foram mais expostas ao risco de infecção. Tais resultados diferem de Silva et al. (2016), Belo et al. (2013), Miranda et al. (2008), Julião et al. (2007) e Dantas-Torres et al. (2006), e observaram que cães machos apresentaram maior chance de infecção por *L. infantum*.

Na análise dos dados da variável faixa etária, Silva e colaboradores (2017) observaram que os animais acima de 12 meses estavam mais expostos ao risco de infecção. Esses dados estão corroborando com os de Almeida et al. (2010), que verificaram maior frequência de soropositivos na faixa etária entre um e três anos de idade. Dantas-Torres, Brito e Brandão-Filho (2006), observaram que no Estado de Pernambuco, os cães jovens, com idade inferior a um ano, apresentaram alto risco de infecção por *L. infantum chagasi*.

Moreira Jr et al. (2003) sugeriram aumento do risco de infecção por *Leishmania* spp. após o primeiro ano de vida do cão. Possivelmente isso pode estar associado ao tempo de exposição destes animais ao vetor e ao período de incubação da doença, que varia de 3 meses a vários anos com média de 3 a 7 meses (Ministério da Saúde 2006).

O estudo de Oliveira e colaboradores (2005) encontrou espécimes de roedores infectados por espécies dos complexos *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. Em vários exemplares de *R. rattus* foi detectado o DNA de espécies pertencentes aos três complexos de *Leishmania*, indicando que ela possa participar do ciclo peridoméstico das leishmanioses, devido aos seus hábitos sinatrópicos. Salientamos que nos abrigos que realizamos as coletas, observamos a presença de fezes de roedores e alguns ficavam próximos à áreas com vegetação. Cabrera et al. (2003) observaram que a proximidade dos cães com animais silvestres, como os marsupiais, foi considerado um fator de risco para infecção por *Leishmania* spp. Silva (2012), observou associação entre soropositividade para *Leishmania* spp. e o contato com outras espécies animais. O conhecimento da ocorrência da leishmaniose em abrigos da região Metropolitana do Rio de Janeiro, auxilia o clínico veterinário na investigação desse agente infeccioso. Possibilita o desenvolvimento de ações de controle da afecção. A utilização de técnicas moleculares esta sendo expandida e aprimorada, com isso possibilitando ao clínico veterinário uma ferramenta diagnóstica que deve ser associada com sinais clínicos e achados de bioquímica e hematologia para melhor compreensão da infecção pelos agentes.

6 CONCLUSÕES

A leishmaniose canina ocorre em cães de abrigos da região metropolitana do Rio de Janeiro, conforme demonstrado pelos resultados sorológicos e moleculares.

Constatamos que pelo menos um animal, foi sororreativo em cada município amostrado. Ressaltando a prevalência da afecção na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

A partir dos dados de soropositividade apresentados em animais de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, pode-se nortear medidas de controle e prevenção da propagação da afecção. Ressaltando que os animais após a adoção, podem ir para áreas livres da doença.

As análises hematológicas e bioquímicas, são de grande valia para avaliar o estado clinico do animal. No entanto, não apresentaram efetividade na detecção da infecção.

É muito importante que o Brasil adote medidas de saúde pública voltadas para as zoonoses devem priorizar programas que busquem gerar saúde e bem estar animal, por conseguinte a saúde humana. Devendo fomentar, pesquisas por novos métodos de diagnóstico, protocolos de tratamento e ferramentas para controle e prevenção (vacinação e controle de vetores), programas para redução de animais errantes (castração) devem ser incentivados, financiados por órgãos públicos de desenvolvimento e priorizados pelas autoridades competentes. Por meio da educação e medidas eficazes, será possível reduzir o impacto da leishmaniose no Brasil.

7 REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.13, p.537-550, 1991a.
- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G.; Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, p.557-561; 1991b.
- AGUIAR, G. M.; VILELA, M. L.; SCHUBACK, P.; SOUCASAUX, T.; AZEVEDO, A. C. R. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, n. 4, p. 465-482, 1985.
- AGUILLAR, C. M.; FERNÁNDEZ, E.; FERNÁNDEZ, R.; CANNOVA, D. C.; FERRER, E.; CABRERA, Z.; SOUZA, W. J.; COUTINHO, S. G. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 15- 16, 1998.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz, cap. 3, p. 207-255, 2003.
- AKHAVAN, A. A.; MIRHENDI, H.; KHAMESIPOUR, A.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; RASSI, Y.; BATES, P.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G.; ARANDIAN, M. H.; ABDOLI, H.; JALALI-ZAND, N.; JAFARI, R.; SHAREGHI, N.; GHANEI, M.; YAGHOUBI-ERSHADI, M. R. Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 552-556, 2010.
- ALAM, M. Z.; KHAIR, A.; SHAMSUZZAMAN, M.; KUHL, K.; SCHÖNIAN, G. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine & International Health**. v. 14, n. 5, p. 499–503, 2009.
- AL-SOUD, W. A.; RADSTROM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, p. 3748-3753, 1998.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; ANDRÉS, M. S.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; ANDRÉS, M. D. S.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, p. 371-378, 1994.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVAR, J.; YACTYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**. v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, ed. 5, 2012.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos; o caso da epidemia em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil 1993-1997. **Caderno de saúde pública**, v. 20, n. 1, p. 259-25, 2004.

ALBUQUERQUE, A. R.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Revista Clínica Veterinária**, n. 71, p. 78-80, 2007.

ALEXANDER, B. et al. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus os *Leishmania (Viannia) braziliensis* in northeastern Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 387-395, 1992.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**. v. 127, p. 227–232, 2005.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

AMORIM, I. F. G.; SILVA, S. M.; FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; CASTRO, R. S.; LIMA, T. K. S.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; GOLLOB, K. J.; TAFURI, W. L. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **Plos One**, v.6, n.11, p.E27679, 2011.

AMORIM, T. B.; FELICIOS, L. G. R.; FARIAS, M. D.; TORRES, A. P. C. Perfil epidemiológico de Leishmaniose Visceral Canina no município de Selveria/MS de 2011 a 2015. **Revista Conexão Eletrônica**. v. 14, p. 339-347, 2017.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, p.147-156, 2003.

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P.; PINHEIRO, M. B.; GUIMARÃES, T. M.; OLIVEIRA, N.C.; CASTRO, J. A.; SILVA, R. N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R. M.; YOKO, M.; SILVA, A.S.; DUMONT, K.; RIBEIRO, JR. M. L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S. J.

Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.181, n. 2-4, p. 83-90, 2011.

ANTONIALLI, S. A. C.; TORRES, T. G.; PARANHOS, A. C. F.; TOLEZANO, J. E. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. **Journal of Infection**, v. 54, p. 509-514, 2007.

ASHFORD, R.W.; BATES P. A.; Leishmaniasis in the Old World. In: COX FEG, KREIER JP, WAKELIN D, editors. **Topley & Wilson microbiology and microbial infections**. New York: Wiley Blackwell; p.215-40, 1998.

ASSIS, J.C.A.; RIBEIRO, V.M. Programas de Bem-Estar Animal como instrumentos de controle de Zoonoses com ênfase em Leishmaniose Visceral. **Revista V&Z em Minas**, v. 124, p. 8-18, 2015.

AZEVEDO, A. C. R.; LUZ, S. L. B.; VILELA, M. L.; RANGEL, E. F. Studies on the sandfly fauna of Samuel ecological station, Porto Velho Municipality, Rondônia state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 88, n. 4, p. 509-512, 1993.

BARATA, R. A.; FRANÇA, J. C. S.; COSTA, R. T.; FORTES-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DE PAULA, E. V.; PRATA, A.; MONTEIRO, E. M.; DIAS, E. S. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, na Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 481-487, 2004.

BELO, V. S.; STRUCHINERA, C. J.; WERNECKA, G. L.; BARBOSA, D. S.; OLIVEIRA, R. B.; NETO, R. G. T.; SILVA, E. S. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. . **Veterinary Parasitology**. v. 195, p. 1-13, 2013.

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

BOWMAN, D. D. GEORGIS. **Parasitologia Veterinária**. Elsevier, p. 432, 2010.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Canine leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy). **European Journal of Epidemiology**, v. 8, p. 273-276, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, Brasília, DF. p. 122, 2006.

BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília-DF: 2ª edição, p.179, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília-DF: 6ª edição, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; (Nota Técnica Conjunta nº 1), 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica. Conjunta 01/2011 CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS de 29 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Guia de Vigilância em Saúde, Leishmaniose Visceral/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 120, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica** 1 ed. 5 reimp.- Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância, Prevenção e Controle de Zoonoses: normas técnicas e operacionais. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis-** Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Secretaria de Vigilância em Saúde Versão eletrônica, 2017.

BRASILEISH (Dados ainda não publicados), In: **XVIII Simpósio Internacional da Leishmaniose Visceral Canina**, 2017.

BRASILEISH. **Diretrizes para o Diagnóstico, Estadiamento, Tratamento e Prevenção da Leishmaniose Canina**, versão eletrônica, 2018. http://brasileish.com.br/assets/files/DIRETRIZES_Brasileish_2.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. **Biologia de flebotomíneos neotropicais**. In: Rangel, E. F.; Lainson, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p.257-274, 2003.

CABRAL, A. W. D. **Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp.** p. 56, 2007. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo.

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.** p. 90, 1999. Tese (Magister Scientiae) - Escola de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CABRERA C, GIMÉNEZ R, LÓPEZ MC. **Determination of tea components with antioxidant activity.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. v. 51, n. 15, p. 4427-4435, 2003.

CAMARGO, M. E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, São Paulo, n.1, v.10, p.143-169,1974.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; POLETTTO, D. W.; GOMES, A. C. Feeding habit of *Lutzomyia longipalpis* in Araçatuba country, state of São Paulo, Brazil. **Entomology and Vectors.** v. 9, p. 63, 2002.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 546. 2006.

CÂNDIDO, T.C.; PERRI, S.H.V.; GERZOSCHKWITZ, T.O.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 175–181, 2008.

CARVALHO, J. K. M. R. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e de diagnóstico.** Campo Grande; Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009.

CAVALCANTI, M. P. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães** - Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Recife. Pernambuco, 2008

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p. 330-334, 1999.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on continuing education for the practising veterinarian-north american**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

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

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; MICHALICK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis:

Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, London, v. 174, p. 636-643, 2007.

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

CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; NIETO, J.; BAILO, B.; CAÑAVATE, C.; FIGUERAS, M. C.; ALVAR, J. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2343-2347, 2006.

DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DE SOUZA, E. P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN), **Vaccine**, v. 19, p. 1082-1092, 2000.

DA COSTA, R. T.; FRANÇA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the Paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

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

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniosis in brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**. v. 48, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; PAIVA-CAVALCANTI, M. & OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; SALES, K. G. S.; SILVA, L. G.; OTRANTO, D. & FIGUEREDO, L. A. Leishmania FAST15: a rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, p - 3165-3169, 2017.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 839-847, 2001.

DAVIES, C. R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL, L.; LENDRUM, D. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Caderno de Saúde Pública**, n.16, p.925-950, 2000.

DAY, M. J. One health: the small companion animal dimension. **Veterinary Record**, v. 167, p. 847- 849, 2010.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; ALENCAR, J. E. Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, n.7, p.131-41, 1955.

DE QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V. D; NORONHA, A C. F. D; OLIVEIRA, T. M.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 1–8, 2011. Elsevier B.V.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.27, n.5, p. 305-318, 2004.

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

DOMINGOS, H. I. **Teste rápido TR-DPP no controle do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina**, 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

DUPREY, Z.; STEURER, F.; ROONEY, J.; KIRCHHOFF, L.; JACKSON, J.; ROWTON, E.; DCHANTZ, P. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 440–446, 2006.

DYE, C. The logic visceral leishmaniasis control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p.125-130, 1996.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária, Doenças do Cão e do Gato**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, p. 2156, 2004.

FARIA, A. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.3, n.2, p. 47-57, 2012.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; SANTOS, C. M. V.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G. JR.; Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral

infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, p. 559– 565, 2009.

FAYET, G. **Canine leishmaniasis in Europe**; Part 2: Pathogenesis – Clinical signs – Diagnosis, *Medical Biological Technical Bulletin*, 1999.

FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R. & PERRI, S. H. V. Clinical aspects of dogs with visceral leishmaniasis from Araçatuba-São Paulo State (Brazil). **Clínica Veterinária**, v.5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FELICIANO, M. A. R.; AQUINO, A. A.; COUTINHO, L. N.; VICENTE, W. R. R. Imunologia na gestação de cadelas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 158-162, 2012.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71- 80, 2004.

FERNANDES, M. A.; LEONEL, J. A. F.; ISAAC, J. A.; BENASSI, J. C.; SILVA, D. T.; SPADA, J. C. P.; PEREIRA, N. W. B.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; SOARES, R. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.28, n.2, p.194-202, 2019.

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

FERREIRA, S. A.; ITUASSU, L. T.; MELO, M. N.; ANDRADE, A. S. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 257–263, 2008.

FIGUEIREDO, F. B.; Figueiredo, F. B.; Vasconcelos, T. C. B.; Madeira, M. F.; Menezes, R. C.; Maia-Elkhoury, A. N. S.; Marcelino, A. P.; Werneck, G. L. Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 113(11), e180260, 2018.

FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Os parasitas e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. p. 259-273, 2014.

FICHOUX, Y. L.; QUARANTA, J. F.; AUFEUVRE, J. P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, 1999.

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

FORATTINI, O. P. Entomologia médica: Psychodidae, Phlebotominae. Leishmanioses, bartonelose. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., v. 4, 1973.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 7, p.181-184, 1973.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica IV. **Psychodidae: Phlebotominae, Leishmaniose e Bartonelose**. Edgard Blucher Ltda, São Paulo. p. 658, 1983.

FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; COSTA, R. T.; MONTEIRO, E. M.; MACHADO-COELHO; G. L. L.; VIEIRA E. P.; PRATA, A.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; FORTES-DIAS, C. L.; SILVA, J. C.; DIAS, E. S. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 131, p. 213-220, 2005.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

FREHSE, M. S. **Vigilância ativa da leishmaniose visceral canina no município de São José dos Pinhais – PR**, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.

FUNED. **Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**. Instituto Octávio Magalhães - Lacen - MG, p. 1-20, 2013.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América**. Flebotomíneos do Brasil, Editora Fiocruz. p. 176, 2003.

GALIMBERTTI, M. Z.; Katz, G.; Camargo-Neves, V. L. F. “Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo,” **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32 (Supl 1),p. 217, 1999.

GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; COSTA, C. A. da; MELO M. N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 43, 1988.

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

GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA DE ZOOSE E ENTOMOLOGIA. GUIA DE ORIENTAÇÃO PARA VIGILÂNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC). 2018. 40p. Acesso em: <https://saude.itajai.sc.gov.br/download.php?id=281>

GIUNCHETTI, R.C., MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; OLIVEIRA, R. C.; FILHO, O. A. M.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA; AGUIAR-SOARES, R. D.; DE SOUZA, J. V.; DAS DORES MOREIRA N.; MALAQUIAS, L. C.; MOTA E CASTRO, L. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, p. 7674-7686, 2007.

GOMES, A. C.; GALATI, E. A. B.; CASANOVA, C. Analysis of the geographical distribution of Leishmaniasis Vectors in State of São Paulo. **Bol Direc Malariol y San Amb**, v. 35, p. 143-146, 1995.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; ANDRADE, L. R.; DIETZE, R.; LEMOS, E; BELLI, A.; JÚNIOR, S. F.; MARCELO SIMÃO FERREIRA. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 135-141, 2008.

GOMES, A. H.; FERREIRA, I. M.; LIMA, M. L.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234-41, 2007.

GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, 2003.

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

GONTIJO, B. B.; PAVÃO, F. F.; SILVA, F. S. A.; SILVA, F. D.; TAVARES, G. C. & COELHO, G. L. Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **PUBVET**, p. 51245-1250, 2011.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; SINCLAIR, D.; FIROOZ, A.; ENK, C.; VÉLEZ, I. D.; ESTERHUIZEN, T. M.; TRISTAN, M.; ALVAR, J. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 8, p. CD008736, Aug 2015.

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

GRADONI, L.; POZIO, E.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 74, n. 3, 421-422. 1980.

GRIMALDI, G.; TESH, R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

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

GRIMALDI, G. Jr.; TEVA, A.; DOS-SANTOS, C. B.; SANTOS, F. N.; PINTO, Id-S.; FUX, B. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLoS ONE** v.12, n.9, 2017.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 229-243, 2001.

IESBICH, M. M. P. **Avaliação de amostras de soro canino para leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas de baixa endemicidade/Porto Alegre/RS através de métodos diagnósticos laboratoriais imunológicos e biomoleculares**. Rio Grande do Sul - RS. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), UFRGS.

IKEDA, F. A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M. M.; GONÇALVES, M. E.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F. Perfil hematológico de cães infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária**, v. 47, p. 42– 48, 2002.

IKEDA-GARCIA, F. A.; LOPES, R. S.; MARQUES, F.J.; DE LIMA, V. M.; MORINISHI, C. K.; BONELLO, F. L.; ZANETTE, M. F.; PERRI, S. H.; FEITOSA, M. M. Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 254-259, 2007.

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**. v. 12, p. 34-42, 2007.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, VG. Molecular diagnosis of Leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**. v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

INÁCIO, G. B. A. **Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina e distribuição do vetor no Município de Araçatuba, São Paulo, Brasil**. Araçatuba, São Paulo, 2019. 90 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, p. 417, 1993.

JR. SMITH, F.W. K.; TILEY, L. P. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécie Canina e Felina**. 3 ed. São Paulo: Manole, p. 1427, 2008.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANJEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA, J. R. E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.

KAZIMOTO, T. A. **Uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% em cães no controle da leishmaniose visceral**. Mossoró, 2016. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A.J. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog-I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, p.74-79, 1984a.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A. J. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. **Veterinary Pathology**, v.21, p.80-86, 1984b.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIERGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 105-111, 1997.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old world canine leishmaniasis, **Compendium**. v. 15, p. 949- 959, 1993.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; DA SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Visceral leishmaniasis in a dog in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, south Brazil. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

LACERDA, M. The Brazilian leishmaniasis control program. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.489-495, 1994.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 613-617, 2001.

LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, JP.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 11, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; New World leishmaniasis. In COX FEG, WAKELIN D, GILLESPIE SH, DESPOMMIER DD, editors. **Topley & Wilson microbiology and microbial infections**. London: Hodder Arnold; p.313-49, 2005.

LAMOTHE, J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, p. 170-175, 2001.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Ann Parasitol Hum Comp**, v.54; p. 277-295, 1979.

LARA-SILVA, F. E. O.; MICHALSKY, É. M.; FORTES-DIAS, C. L.; FIUZA, V. O.; PESSANHA, J. E.; REGINA-SILVA, S.; DE AVELAR, D. M.; SILVA, M. A.; LIMA, A. C.; DA COSTA, A. J.; MACHADO-COELHO, G. L.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128-36, 2015.

LARA-SILVA, F. O.; MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; FIUZA, V. O. P.; DIAS, E. S. Evaluation of chemical spraying and environmental management efficacy in areas with minor previous application of integrated control actions for visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 176, p. 109–113, 2017.

LIMA, L. C., Ruralização da *Lutzomyia intermedia*, um provável caso de pré-adaptação. **Revista de Saúde Pública**, n. 20, p. 102-104, 1986.

LIMA, V. M. F.; FATTORI, K. R.; MICHELIN, A. F.; NETO, L. S.; VASCONCELOS, R. O. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 330–333, 2010.

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. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

LOPES, E. G. **Atributos diagnósticos da reação em cadeia de polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp.** São Paulo, 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

MANCIANTI, F.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PIERI, S.; MARCONCINI, A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 37, p. 110-112, 1986.

MADEIRA, M. F.; UCHOA, C. M. A.; LEAL, C. A.; SILVA, R. M. M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SERRA, C. M. B. *Leishmania (viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 551-555, 2003.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; LEAL, C. A.; MARZOCHI, M. C. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.

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

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C. A.; MELO, C. X.; CONFORT, E. M.; MARZOCHI, M. C. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.138, n. 3-4, p. 366-370, 2006b.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142-144, 2009.

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

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, LM.; MORTE, RD.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v. 125, n. 3, p. 251-262, 2004.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; PAVONE, L.; GRAVINO, A. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 279- 282, 2007.

- MANNA, L.; REALE, S.; PICILLO, E.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 1, p. 64-67, 2008.
- MARCONDES, M. Leishmanioses. In: Larsson e Lucas, **Tratado de Medicina Externa**. 1. ed. São Paulo. Interebook Editorial. p. 313-344, 2016.
- MAROLI, M.; MIZZON, V.; SIRAGUSA, C.; D'OORAZI, A.; GRADONI, L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 15, p. 358-363, 2001.
- MARSELLA, R.; GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis: A re-emerging zoonosis. **International Journal of Dermatology**. v. 37, n. 11, p. 801-814, 1998.
- MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P. M.; TOLEDO, L. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, p. 432-446, 1985.
- MARZOCHI, M. C. A; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthrozoosis and Possibilities for Their Control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-75, 1994.
- MARY, C.; FRANÇOISE, F.; LASCOMBE, L. F.; DUMON, H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5249-55, 2004.
- MATEO, M.; MAYNARD, L.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P.; MIRÓ, G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. **Parasitology Research**. v.105, p.155–162, 2009.
- MENEZES, J. A. **Leishmanioses: estudos epidemiológicos e o conhecimento da população de Formiga, Minas Gerais, Brasil**. Belo Horizonte, 2014. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz.
- MEDITSCH, R. G. M. **O médico veterinário na construção da Saúde Pública: um estudo sobre o papel do profissional da clínica de pequenos animais em Florianópolis, Santa Catarina**. CFMV, Brasília/DF, n. 38. ano XII, 2006.
- MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**. v. 47, p. 67-76, 2007.
- MIRANDA, S.; ROURA, X.; PICADO, A.; FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 35-38, 2008.

- MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. **Vetores das leishmanioses nas Américas**. In.: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose tegumentar nas Américas*. v.1, p. 55-64, 2011.
- MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R.T. COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V. MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F. FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. D. *Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Monles Claros, Minas Gerais*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.147-152, 2005.
- MONTEIRO,F.; VIEIRA, A.M.L. Saúde Única. Disponível em: [http://portal.cfmv.gov.br/portal/uploads/- %20Palestra%20Sa%C3%BAde% 20% C3%9Anica%20-%20Fred%20Monteiro%20e% 2 0Adriana%20Vieira.pdf](http://portal.cfmv.gov.br/portal/uploads/-%20Palestra%20Sa%C3%BAde%20C3%9Anica%20-%20Fred%20Monteiro%20e%20Adriana%20Vieira.pdf) .
- MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES,M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491- 493, 1994.
- MOREIRA JR, E.D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N. L.; BARRETO, R. B.; CARVALHO, L. P. 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, p. 393-397, 2003.
- MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D.C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 181-195, 1999.
- MORENO, E. C.; MELO, M. N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, JR.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S.; ANTUNES, C. M.; CARNEIRO, M. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 456-463, 2005.
- MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-52, 2007.
- NARDI, M. S. Pesquisa de *Leishmania* sp. em flebotomos e mamíferos silvestres de fragmentos florestais na região do Pontal do Paranapanema, SP. São Paulo, 2010. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.9, p.754-765, 2008.

NUNES, C. M. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

NUNES, C. M.; PIRES, M. M. P.; DA SILVA, K. M.; ASSIS, F. D.; GONÇALVES, F. J.; PERRI, S. H. V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 131–133, 2010.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 219-227, 2005.

OLIVEIRA, C. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: Challenges for control. **Reports in Public health**, v. 24, n. 12, p. 2953-2958, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; FERNANDES, C. E.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL, R. P. **Ecological Aspects of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in Endemic Area of Visceral Leishmaniasis**, Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, n. 49, p. 43-50, 2012.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OPAS/OMS), **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses nº6, 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informeih-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=yi>.

PALTRINIERI, S.; RAVICINI, S.; ROSSI, G.; ROURA, X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v.186, n.3, p.393-395, 2010.

PADDOCK, C.D.; J.E. CHILDS. *Ehrlichia chafeensis*: a prototypical emerging pathogen.. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.37-64, 2003.

PORTELLA, M. F. **Diagnóstico diferencial e comparativo através de métodos sorológicos e moleculares da infecção por *Leishmania* spp. em cães residentes na região oceânica de Itaipu, município de Niterói, Rio de Janeiro**, 2018. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz.

PUMAROLA, M.; BREVIK, L.; BADIOLA, J.; VARGAS, A.; DOMINGO, M.; FERRER, L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 105, p. 279–286, 1991.

QUEIROZ, P. V. S.; MONTEIRO, G. R. G.; MACEDO, V. P. S.; ROCHA, M. A. C.; BATISTA, L. M. M.; QUEIROZ, J. W.; JERÔNIMO, S. M. B.; XIMENES, M. F. F. M. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 267–273, 2009.

QUEIROZ, N. M.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-8, 2010.

QUEIROZ-JÚNIOR, E. M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido dual path platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina**. 2011, p.77 - Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Ceará, 2011.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**. v. 122, n. 3, p. 253- 261, 2001a.

RAY, D. S. Conserved Sequence Blocks in Kinetoplast Minicircles from Diverse Species of Trypanosomes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 3, p. 1365-1367, 1989.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLOSRIOSOS, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REBÊLO, J. M. M. Flebótomos vetores das leishmanioses (**Manual para técnicos e profissionais de Saúde**) São Luis: Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde; 1999.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, p. 68-75, 2006a.

REIS, L. L.; BALIEIRO, A. A. S.; FONSECA, F. R.; GONÇALVES, M. J. F. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p.638-645, 2017.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 530–541, 1999.

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

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

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REY, L. Leishmania e leishmaníases: Os parasitos. In: **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 214 – 226, 2001.

REY, L. Leishmaníase visceral. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RIBEIRO, V. M.; SILVA, S. M.; MENZ, I.; TABANEZ, P.; NOGUEIRA, F. S.; WERKHAÜSER, M.; FONSECA, A. L. S.; DANTAS-TORRES, F. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, p. 6-8, 2013.

ROCHA, M. A. N.; Matos-Rocha, T. J.; Ribeiro, C. M. B.; Abreu, S. R. O. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p.609-614, 2018.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A. D.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 1, p. 41-45. 2010.

SCHIMMING, B; SILVA, J; PINTO R; Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 19, p. 1-17, 2012.

SEVÁ, A. P.; OVALLOS, F. G.; AMAKU, M.; CARRILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E. A. B.; ESTELA, G.; SOARES, L. R. M.; FERREIRA, F. Correction: Canine-based strategies for prevention and controle of visceral leishmaniasis in Brazil. **Plos One**. v. 11, n. 9, e0161853, 2016.

SCHUBACH, E. Y. P. **Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplopercurso para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro**. Dissertação de Mestrado – 2012, 74 p, Universidade Federal de Brasília. Faculdade de Medicina, Brasília, 2012.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, KIdlington, v.3, n.4, p.193-209, 2001

SILVA E. S.; GONTIJO C. M. F.; PACHECO R. S.; FIUZA V. O. P, BRAZIL R. P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Satate of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. n. 96, p. 285-291, 2001.

SILVA, A. V.; LANGONI, H. The detection of Toxoplasma gondii by comparing cytology histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v.97, p.199-207, 2001.

SILVA, D. A.; PERIÉ, C. S. F. S.; MENDES JÚNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Leishmaniose visceral canina em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – relato de caso. **Clínica Veterinária**, v.18, n.95, p.64-68, 2011.

SILVA, C. B. **Diagnóstico Sorológico e Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Canina na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado) – 74 p, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

SILVA, C. B.; VILELA, J. A. R.; PIRES, M. S.; SANTOS, H. A.; FALQUETO, A.; PEIXOTO, M. P.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, F. N.; SILVA, V. L.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C. L. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 39-45, 2013.

SILVA, R. B. S.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUSA, H. C.; RAMOS, C. P. S.; SOUSA, A. P.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 625-629, 2016.

SILVA, J. D.; MELO, D. H. M.; COSTA, J. A. G.; COSTA, D. F.; SILVA, R. B. S.; MELO, M. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Leishmaniose visceral em cães de assentamentos rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1292-1298, 2017.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v. 10, p.1–16, 1988.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: MILLS, L.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders co., p.769-777, 1990.

SMITH, A., CLARK, P., AVERIS, S., LYMBERY, A.J., WAYNE, A.F., MORRIS, K.D., THOMPSON, R.C.A., Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v. 135, p. 1329–1335, 2008.

SOLANO-GALLEGU, L.; P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGU, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGU, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTIÇEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001.

SOUZA, M. B.; M. C. A. MARZOCHI; R. W. CARVALHO; P. C. RIBEIRO; C. S. PONTE; CAETANO, J. M.; MEIRA, A. M. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.1881–1885, 2003.

TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. V.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S.; SANTOS, A. R.; OLIVEIRA, O.; KÜHL, J. B.; ALBERTON, D. Influência da organização, da limpeza do peridomicílio em da desinsetização de edificações na densidade poopulacional de flebotomíneos no município de Doutor Camargo, Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 19, p. 1801-1813, 2003.

SILVA, J.D.; MELO, D.H.M.; COSTA, J.A.G.; COSTA, D.F.; SILVA, R.B.S.; MELO, M.A.; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J. Leishmaniose visceral em cães de assentamento rurais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1292-1298, 2017.

STEINDEL, M.; MENIN, A.; EVANGELISTA, T.; STOCO, P. H.; MARLOW, M. A.; FLEITH, R. C.; PILATI, C.; GRISARD, E. C. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p.490-496, 2013.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Proteínas In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 303-339, 2011.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Sistema urinário In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 342-411, 2011.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L.M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n.3, p.46-51, 2009.

TROTZ-WILLIAMS, L.; GRADONI, L. Disease risks for the travelling pet: Leishmaniasis. **In Practice**, v. 25, n. 4, p. 190-197, 2003.

VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R. Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary Record**, v. 137, p. 252, 1995.

VIANNA, E. N.; MORAIS, M. H. F.; ALMEIDA, A. S.; SABROZA, P. C.; REIS, I. A.; DIAS, E. S.; CARNEIRO, M. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 302–310, 2016.

VIÑUELAS, J.; GARCÍA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C. G. Meningeal leishmaniosis induced

by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 23-27, 2001.

VITALE, F. R. S.; VITALE, M.; PETROTTA, E.; TORINA, A.; CARACAPPA, S. TaqMan-Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. **Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 139-143, 2004.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, n.1, p.18-29, 1996.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v.95, n.1, p.1-15, 2001.

WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, 2016.

WILSON, T. M.; MAGALHÃES, L. F.; MEDEIROS, A. A. & FURQUIM, M. E. C. Alterações macroscópicas em cães sororreagentes para *Leishmania chagasi* e sua correlação com teste parasitológico. **Veterinária Notícias Veterinary News**, v. 18. n. 2, p. 20-25, 2012.

WOERLY, V.; MAYNARD, L.; SANQUER, A.; EUN, H. M. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology Research**.v. 105, p.463-469, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the Leishmaniasis**, WHO Tech Rep Serp.793, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO** Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, p. 22-26, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis**. (Technical report series; no. 975), 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis - Epidemiological Report of the Americas**, 2014 Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html

XIMENES, M. F. F.; SOUZA, M. F.; GUILHERMO, C. E. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p.427-432, 1999.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, West Indies, Central and South America. **Memoirs of the American Entomological Institute**, v.54, p. 1-881, 1994.

ZANELLA, J.R.C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.51, n.5, p.510-519, 2016.

ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A.; MARCONDES, M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, 2014.

8 ANEXOS

ANEXO A - Questionário epidemiológico e avaliação clínica, referente aos cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

ANEXO B - Fotos demonstrando as diferentes condições estruturais, higiênico-sanitárias e presença de animais contactantes observadas nos abrigos.

ANEXO – A:



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

IDENTIFICAÇÃO

Canino nº (Registro):	Data:		
Nome do canino:	Sexo:	Raça:	Idade:
Endereço:	Tels:		

HISTÓRICO:

- 1) Castrado: () Sim () Não
- 2) Histórico de brigas: () Sim () Não
- 3) Animal já recebeu transfusão ou qualquer derivado até o momento da coleta? () Sim () Não
- 4) Histórico de ectoparasitas: () Sim () Não. Quais? _____
- 5) Local de moradia: () Casa () Apartamento () Abrigo () Gatil () Rua () Sítio
- 6) Acesso à rua: () Sim () Não
- 7) Convívio com outros caes? () Sim () Não. Quantos? _____
- 8) Convívio com outras espécies () Sim () Não. Qual(is)/Quantos? _____
- 9) Presença de ectoparasitos? () Sim () Não.
Quais: () Pulgas () Carrapatos () Piolhos () Sarna () Intensidade: _____
- 10) Uso de ectoparasiticida? () Sim () Não. Qual: _____
- 11) Animal é vermifugado? () Sim () Não. Qual a frequência? _____
- 12) Animal é vacinado? () Sim () Não. Qual(is)? _____
- 13) Faz uso de alguma medicação? () Sim () Não. Qual(is)? _____

SINAIS CLÍNICOS:

- 1) Estado corporal: () Normal () Magro () Obeso
- 2) Comportamento: () Receptivo/carinhoso () Apático/ Quietos () Agressivo () Medo
- 3) Anorexia: () Sim () Não
- 4) Letargia/Depressão: () Sim () Não
- 5) Mucosas: () Normal () Hipocorada () Ictérica () Azulada
 - a. Intensidade: () Discreta () Moderada () Intensa

- 6) Frequência respiratória: _____ Frequência cardíaca: _____ Temperatura retal: _____
- 7) Turgor cutâneo
- 8) Linfonodos: () Normais () Aumentados _____
- 9) TPC:
- 10) Histórico de doenças e demais observações clínicas relevantes: _____

ANEXO - B:



