



Letícia Maria Molla
Jonas Moraes Filho

**Avaliação diagnóstica de
Leishmaniose visceral canina
em animais provenientes da
zona sul de São Paulo/ SP –
participantes de campanha
de esterilização cirúrgica**



Letícia Maria Molla
Jonas Moraes Filho



**Avaliação diagnóstica de
Leishmaniose visceral canina
em animais provenientes da
zona sul de São Paulo/ SP –
participantes de campanha
de esterilização cirúrgica**



Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2021 Os autores

Copyright da edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Jayme Augusto Peres – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Avaliação diagnóstica de Leishmaniose visceral canina em animais provenientes da zona sul de São Paulo/ SP – participantes de campanha de esterilização cirúrgica

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Gabriel Motomu Teshima
Revisão: Os autores
Autores: Letícia Maria Molla
Jonas Moraes Filho

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M726 Molla, Letícia Maria
Avaliação diagnóstica de Leishmaniose visceral canina em animais provenientes da zona sul de São Paulo/ SP – participantes de campanha de esterilização cirúrgica / Letícia Maria Molla, Jonas Moraes Filho. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-5983-477-8
DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.778211110>

1. Leishmaniose visceral. 2. Cães. 3. PCR. I. Molla, Letícia Maria. II. Moraes Filho, Jonas. III. Título.
CDD 616.9364

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Moraes Filho, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções, atividades e incentivos. Todos os professores,, profissionais e estagiários que participaram desse estudo no auxílio das atividades de campo e laboratoriais.

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

Meus agradecimentos aos amigos que me ensinaram a gostar e a buscar mais ensinamentos a respeito do tema dessa dissertação, bem como meus amigos de coração que sempre me apoiaram nessa jornada!

APRESENTAÇÃO

O presente livro faz uma breve revisão bibliográfica sobre a Leishmaniose visceral canina (LVC) e, aborda um estudo de campo realizado com o intuito de identificar possíveis animais com parâmetros clínicos e/ou laboratoriais que sugerissem infecção ativa ou subclínica. Estes animais foram provenientes de dois bairros da Zona Sul da cidade de São Paulo-SP, dentre eles haviam animais de comunidades que possuíam tutores e animais errantes. Os animais foram escolhidos aleatoriamente para o estudo, porém todos participaram da campanha de esterilização eletiva promovida pela Universidade de Santo Amaro (UNISA) em parceria com a sub-prefeitura regional. Para uma ampla abordagem e, sabendo-se que o diagnóstico de LVC é complexo e depende de diversos fatores, todos os animais participantes passaram por exame clínico minucioso e coleta de material biológico para realização de exames sorológicos, bioquímicos e moleculares. Como parte dos resultados, observou-se que a região não demonstrou risco epidemiológico para a LVC, porém os animais que tiveram alterações laboratoriais, sugeriu-se acompanhamento clínico com um médico-veterinário.

M.V. Msc. Letícia Maria Molla

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMO | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| INTRODUÇÃO..... | 5 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 6 |
| História da Leishmaniose..... | 6 |
| Epidemiologia das Leishmanioses | 6 |
| Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea..... | 7 |
| Leishmaniose Visceral..... | 7 |
| Leishmaniose Visceral Canina | 13 |
| Epidemiologia..... | 13 |
| Vetor | 15 |
| Protozoários..... | 17 |
| Sinais Clínicos | 18 |
| Testes Diagnósticos..... | 20 |
| Exame Bioquímico | 20 |
| Sorologia..... | 21 |
| PCR..... | 22 |
| Exame Parasitológico..... | 23 |
| A Cidade de São Paulo..... | 24 |
| Grajaú | 25 |
| Ilha do Bororé | 25 |
| Legislações sobre Tratamento e Eutanásia no Brasil | 25 |
| OBJETIVOS..... | 26 |
| Objetivo geral | 26 |
| Objetivos específicos | 26 |

| | |
|--|-----------|
| JUSTIFICATIVA | 27 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| Local do estudo..... | 28 |
| População do Estudo..... | 28 |
| Randomização..... | 28 |
| Amostras coletadas..... | 28 |
| Exame Físico dos animais..... | 29 |
| Procedimento de colheita..... | 29 |
| Avaliações laboratoriais..... | 29 |
| Proteínas Plasmáticas..... | 29 |
| Sorologia..... | 30 |
| TR DPP® (Teste Rápido Dual Path Platform)..... | 30 |
| Teste Elisa..... | 31 |
| Reação de Imunofluorescência Indireta (R.I.F.I.)..... | 31 |
| PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)..... | 32 |
| RESULTADOS | 33 |
| DISCUSSÃO | 36 |
| CONCLUSÃO | 40 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| APÊNDICES | 47 |
| APÊNDICE A – TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)..... | 47 |
| APÊNDICE B – Ficha de avaliação clínica..... | 49 |
| APÊNDICE C – Tabelas de resultados dos exames DPP® e Elisa..... | 50 |
| APÊNDICE D – Tabela de resultados do exame R.I.F.I..... | 54 |
| APÊNDICE E – Tabela de resultados de Proteínas Plasmáticas..... | 56 |
| APÊNDICE F – Tabela de resultados de PCR..... | 57 |
| APÊNDICE G – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais..... | 59 |
| SOBRE OS AUTORES | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| A:G | Relação Albumina Globulina |
| Ac | Anticorpos |
| ALB | Albumina |
| Apa | Área de Proteção Ambiental |
| BA | Bahia |
| °C | Graus <i>Celsius</i> |
| CE | Ceará |
| Ceua | Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPP | Exame Imunocromatográfico (<i>Dual Path Platform</i>) |
| Elisa | Teste Imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>) |
| FMVZ-USP | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo |
| g/dl | Gramas por decilitro |
| GLO | Globulina |
| Kdna | DNA do cinetoplasto |
| Km² | Quilômetros quadrados |
| <i>L. infantum</i> | <i>Leishmania infantum</i> |
| <i>Lu. Longipalpis</i> | <i>Lutzomyia longipalpis</i> |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| LVC | Leishmaniose Visceral Canina |
| MA | Maranhão |
| Mapa | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MG | Minas Gerais |
| MI | Mililitros |
| MS* | Mato Grosso do Sul |
| MS | Ministério da Saúde |
| OMS (WHO) | Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>) |
| ONG | Organização não governamental |
| PA | Pará |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PI | Piauí |
| R.I.F.I. | Reação de imunofluorescência indireta |
| RJ | Rio de Janeiro |

| | |
|--------------|--|
| RN | Rio Grande do Norte |
| Sc | Subcutâneo |
| SP | São Paulo |
| SRD | Sem raça definida |
| SVS | Secretaria de Vigilância em Saúde |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TO | Tocantins |
| µg/dl | Micrograma por decilitro |
| Unisa | Universidade de Santo Amaro |

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma doença sistêmica, de curso crônico e grave. É uma zoonose de grande importância em diversos países do mundo, causada nas Américas por um protozoário (*Leishmania infantum chagasi*) parasita intracelular obrigatório e transmitido ao homem e aos animais pela picada de flebotômíneos, sendo no Brasil *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetora. Com o objetivo de avaliar a ocorrência de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em regiões não endêmicas da cidade de São Paulo, foram coletadas e analisadas 153 amostras de sangue de cães de ambos os sexos, com idade a partir de 3 meses, com ou sem de raça definida e com ou sem sintomatologia clínica sugestiva da doença, animais estes participantes de campanha de esterilização cirúrgica eletiva promovida pelas subprefeituras regionais dos bairros do Grajaú e Ilha do Bororé em parceria com ONG (Organização Não Governamental). Foi realizada sorologia empregando-se os métodos DPP® (ensaio imunocromatográfico) e Elisa (teste imunoenzimático), que atualmente são utilizados como triagem diagnóstica para LVC; a R.I.F.I. (Reação de Imunofluorescência Indireta) também foi realizada como teste sorológico complementar na investigação sorológica para LVC. Também foi realizado o teste bioquímico de relação A:G (Albumina/ Globulina) para verificação de alteração das proteínas séricas. Como diagnóstico molecular foi realizado o PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de sangue, com o uso dos primers LITSR e L5.8S do gene ITS. No exame físico realizado encontraram-se alterações dermatológicas em 13 dos 153 animais, o que equivale a 8,5% dos casos. Nos exames sorológicos foi encontrado resultado positivo em um animal, para R.I.F.I. e no exame molecular um animal foi positivo no PCR, os dois animais pertencentes à mesma região (Grajaú). Os resultados bioquímicos demonstraram alteração da relação A:G em 8 animais de todos avaliados. Os resultados puderam demonstrar que, nos animais e regiões avaliadas, não há risco epidemiológico, mas que alguns animais devem manter acompanhamento clínico e laboratorial periódico.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose. Visceral. Canina. DPP®. PCR.

ABSTRACT

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

KEYWORDS Canine. Visceral. Leishmaniasis. DPP®. PCR.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de caráter zoonótico e considerada uma doença negligenciada no Brasil e em diversos países do mundo, a qual faz milhares de vítimas anualmente. É uma doença em expansão e em urbanização, sendo que há alguns anos atrás era considerada doença de caráter rural. Têm maior incidência em países subdesenvolvidos, indivíduos de áreas mais carentes (baixa renda, locais sem saneamento básico, baixo acesso à assistência à saúde, etc.), crianças e pessoas imunossuprimidas¹⁻².

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

Há alguns anos vêm sendo relatados diversos casos de abandono de animais, especialmente cães, na região da Ilha do Bororé, o problema é algo constante o que já rendeu o apelido de “Ilha do Abandono” a ela. Segundo site da prefeitura de São Paulo³, em 2016 a gerente da Vigilância Ambiental da Suvis (Supervisão em Vigilância à Saúde) Capela do Socorro, Patrícia Placoná Diniz, explicou que:

Se os animais são abandonados em vias públicas, podem trazer problemas como atropelamento, acidentes com mordeduras e arranhaduras. Além de esses animais servirem de reservatórios para algumas zoonoses, como raiva e leishmaniose (doença transmitida por insetos) e abrigarem vetores como carrapatos e pulgas.

Uma reportagem no site da CBN (Central Brasileira de Notícias) em agosto de 2016⁴, abordou o tema sobre a população que habita moradias irregulares às margens da Represa Billings e a falta de saneamento básico na região. O Grajaú é o bairro mais populoso de São Paulo, cerca de 80% da área está coberta por Mata Atlântica preservada e há muitos problemas em relação à saúde, segurança e saneamento. Segundo senso do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a região possui cerca de 360 mil habitantes e ocupa a posição de número 90 no IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) entre os 96 distritos da cidade⁵.

O IBGE em parceria com o Instituto Pasteur fez um levantamento em 2016, baseado na série histórica de animais vacinados e, contabilizou uma população canina de 1.119.385 animais somente no município de São Paulo⁵.

Nesse estudo os animais foram submetidos a exames de sangue para verificação da possível ocorrência de positividade para Leishmaniose Visceral em cães residentes da região, sendo eles pertencentes a tutores ou animais errantes e/ou resgatados por protetores animais.

REVISÃO DE LITERATURA

1 | HISTÓRIA DA LEISHMANIOSE

A Leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas no mundo e, afeta milhares de pessoas ao redor do mundo. Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, independentemente, no século XIX identificaram os parasitas que causam Leishmanioses, a cada, Ronald Ross deu o nome genérico de *Leishmania*. Em 1904, Cathoire e Laveran encontraram *Leishmania* em crianças com anemia esplênica. Nicolle nomeou o parasita de *L. infantum* e identificou cães como reservatórios em Tunis em 1908. Carini identificou *Leishmania* em lesões mucosas de pacientes no Brasil em 1912. No início dos anos 40, Swaminath, Shortt e Anderson na Índia e, Adler e Ber na Palestina demonstraram a transmissão de *L. donovani* e *L. tropica* (provavelmente *L. major*) por flebotomíneos⁶.

Características clínicas e geográficas da doença em humanos vêm sendo suplementadas pelos estudos em animais reservatórios e vetores, o comportamento da *Leishmania* em animais e a ecologia natural dos ciclos da *Leishmania* fortalece as bases de classificação das espécies e o conhecimento sobre a transmissão e a doença. A partir da década de 70 foram introduzidas as análises de isoenzimas e na década de 80 os estudos do DNA⁶.

Técnicas parasitológicas diretas, como: aspirados de linfonodo, de baço e de lesões de pele ainda são métodos diagnósticos de referência. A partir de 1990 introduziu-se o diagnóstico por PCR (reação em cadeia de polimerase) o qual identifica o kDNA do parasita, o qual aumentou a possibilidade de diagnósticos a partir de diversas amostras de tecidos e até mesmo o sangue. O diagnóstico laboratorial complementar também é usado como auxiliar, pois apresenta, geralmente, anemia e hiperglobulinemia^{1,6}.

2 | EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

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

Essas doenças são consideradas problemas de saúde pública devido a sua magnitude e complexidade clínica, biológica e epidemiológica. Afeta principalmente regiões mais pobres e países em desenvolvimento, o que corrobora para que seja realizado um esforço coletivo entre países, organizações, governos, instituições e as sociedades para o controle⁷.

As Leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, o qual há mais de 30 espécies catalogadas e sua transmissão se dá através da picada da fêmea de flebotomíneo contaminada, há mais de 90 espécies de flebotomíneos conhecidas

como potenciais transmissores de Leishmanioses. Existem três principais formas de Leishmaniose, sendo elas²:

2.1 Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea

- Leishmaniose Cutânea – é a forma mais comum entre as Leishmanioses, causando lesões cutâneas, principalmente ulcerações em áreas do corpo expostas. Caracteriza-se por grandes cicatrizes. Estima-se que ocorram entre 0,6-1 milhão de novos casos ao ano no mundo. Em média de 95% dos casos ocorre nas Américas, bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Central da Ásia. Mais de 2/3 dos novos casos ocorrem em seis países: Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Iran e República Árabe da Síria^{2,7}.

- Leishmaniose Mucocutânea – é a forma que causa total ou parcial destruição das membranas mucosas no nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos ocorre na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru^{2,7}.

Nas Américas, as formas: cutânea e mucosa, ocorrem em 20 países, sendo endêmica em 18 deles, com diferentes intensidades de transmissão. Entre os anos de 2001 a 2015 foram reportados à Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 840 mil novos casos, com uma média anual de mais de 56 mil casos distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos. Nos últimos cinco anos observou-se uma diminuição no número de casos e em 2015, 17 dos 18 países endêmicos, reportaram uma média de 46 mil casos. Do total de casos da região das Américas, 70% foram reportados no Brasil, Colômbia e Peru. A taxa de incidência das Américas foi de 18.35 casos por 100 mil habitantes e, as maiores incidências foram registradas no Suriname e Nicarágua^{2,7}.

2.2 Leishmaniose Visceral

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

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou que em 2012 a leishmaniose visceral distribuía-se por 102 países, áreas ou territórios pelo mundo. Na maioria dos países o estudo refere-se a um número de casos reportados até 2010 (desde 2008), a OMS estimou que 90% dos casos de leishmaniose visceral humana (LV) ocorreu em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sul do Sudão e Sudão⁸. Já, em outro levantamento feito, estimou-se que em 2012 houve 300 mil casos de LV, com mais de 20 mil casos de morte no mundo, esse senso demonstrou que o Brasil reportou mais de 1.000 novos casos de LV em 2012⁸.

Nas figuras abaixo, publicadas no site *World Health Organization* (WHO)⁸, nos anos de 2013 e 2015 respectivamente, observa-se que alguns países em 2013 representados pela coloração cinza claro (dados não aplicáveis) ou cinza escuro (sem dados), no ano de

2015 mudaram de classificação para a coloração rósea (até 100 casos reportados no ano), como por exemplo: Iêmen e Omã. Em outra situação observa-se que a China, por exemplo, era classificada em 2013 como país com reporte de 100 a 499 casos/ ano (coloração vermelho fosco no mapa) e, em 2015 essa classificação aumentou para 500 a 999 casos reportados/ ano (coloração vermelha no mapa). A mesma situação ocorre no Quênia. Já na Somália observa-se nos mapas que, em 2013 (coloração vermelha) reportaram-se de 500 a 999 casos/ ano e em 2015 esse reporte aumentou para >1.000 casos/ ano (representação em coloração vinho no mapa). Em contrapartida há situações de diminuição do *status* endêmico da doença em, por exemplo, Bangladesh que no ano de 2013 estava classificada com reportes de >1.000 casos/ ano e em 2015 diminuiu sua classificação para 500 a 999 casos/ ano. Situação semelhante verifica-se no Paraguai onde em 2013 estava classificado com 100 a 499 casos/ ano e em 2015 diminuiu para <100 casos/ ano.

Já no Brasil, os dois períodos demonstram a preocupante situação de >1.000 casos/ ano reportados, assim como na Índia, Sudão e Etiópia.

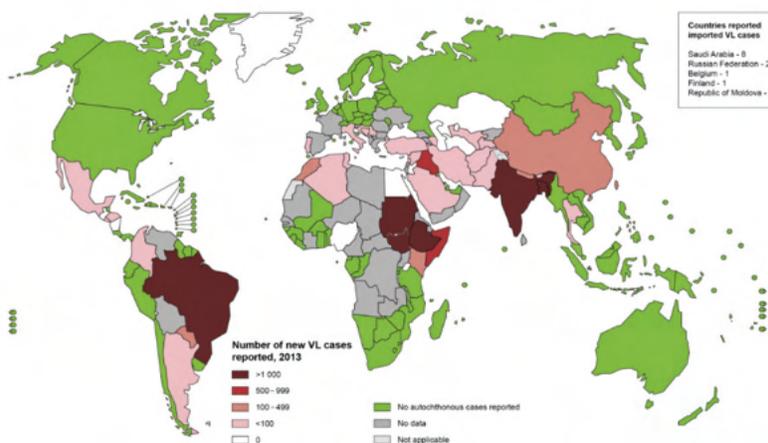


Figura 1 - Estado da endemidade da LV no mundo, 2013.

Fonte: (WHO, 2013)⁸.

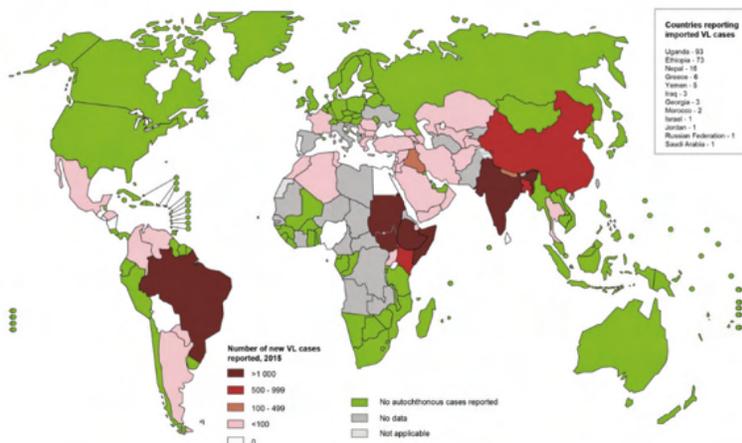


Figura 2 - Estado da endemicidade da LV no mundo, 2015.

Fonte: (WHO, 2015)⁸.

Nas Américas os casos de Leishmaniose Visceral estão presentes em 12 países, no entanto 96% dos casos ocorrem no Brasil. No período de 2001 a 2015 foram reportados mais de 52 mil casos nas Américas e, observou-se que entre 2004 e 2011 houve uma tendência estável no número de casos, com média anual de cerca de 3.800 casos. Em 2012 houve redução de 1.000 casos no número anual e, a partir de 2013 houve incremento de casos atingindo um número de quase 3.500 no ano. Em 2015 reportou-se uma taxa de 2,27 casos por 100 mil habitantes, o que resultou em 3.456 casos de Leishmaniose Visceral nas Américas. Esses casos ocorreram em oito países e dos casos reportados, 95% ocorreram no Brasil⁷.

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

Apesar de ser conhecida como doença de caráter eminentemente rural, os desmatamentos e os processos migratórios somados ao crescimento urbano desordenado, têm sido apontados como os principais determinantes para a expansão e alteração do perfil epidemiológico da LV no Brasil, o que facilitou a urbanização do vetor em municípios de médio e grande porte. Na década de 90, em média 89% dos casos se concentravam na região Nordeste e estavam distribuídos em quatro regiões brasileiras. Em meados da década de 2000, a média dos casos registrados no Nordeste, caiu para 53% e, a partir de 2009 a doença passou a ocorrer em todas as regiões do país, demonstrando a urbanização

da LV. No ano de 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos no país. Dados dos últimos 10 anos demonstram surtos de LV no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS*), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e epidemias ocorridas em Três Lagoas (MS*), Campo Grande (MS*) e Palmas (TO). É importante ressaltar que a principal condição de transmissibilidade nesses novos ambientes está relacionada à adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* ao peridomicílio, favorecida por diversos fatores e pela presença de animais domésticos⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

A [figura 3](#), abaixo, demonstra a estratificação dos casos de LV no Brasil, segundo média de casos reportados entre 2005 e 2007.

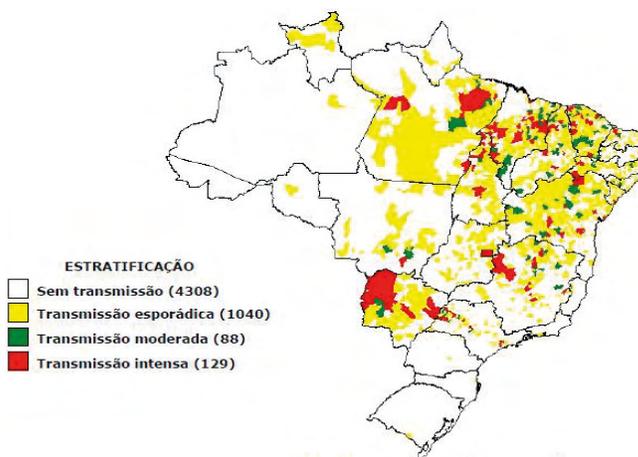


Figura 3 - Estratificação de casos de LV, Brasil, segundo média de casos reportados entre 2005 e 2007.

Fonte: (SVS/MS, 2015)¹².

A [figura 4](#), abaixo, demonstra a estratificação dos municípios segundo média de casos de LV no Brasil, entre 2013 e 2015.

Na comparação entre as figuras 3 e 4 podemos observar uma diminuição percentual de 1,8% nas áreas sem transmissão da doença e, em contra partida, um aumento de casos nas regiões de transmissão esporádica, moderada e intensa; com maior percentual de aumento nas áreas de transmissão moderada, atingindo assim, 44,3% de aumento de casos; seguido por 16,2% de aumento nas regiões de transmissão intensa e 2,1% de aumento nas regiões esporádicas. Com esses dados podemos concluir que a LV está em expansão de casos pelo Brasil e devem ser tomadas medidas de controle e tratamento adequados a seres humanos e animais. A minimização da expansão de casos será eficiente somente quando governo e população trabalharem juntos em prol da saúde do país.

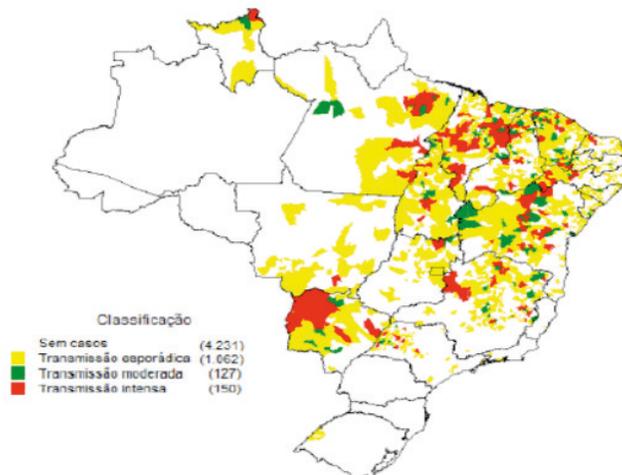


Figura 4 - Estratificação dos municípios segundo média de casos de LV, Brasil, 2013 a 2015.

Fonte: (SVS/MS, 2015)¹².

Um estudo realizado por Cavalcante e Vale¹³, demonstrou que a LV é uma doença endêmica no estado do Ceará e, os casos avaliados no período de 2007 a 2011, revelaram que em 162 dos 184 municípios houve notificação de casos, com uma média anual de 597 ± 29 casos, o que correspondeu a 15% dos casos no país, revelando assim, uma incidência de seis casos por 100 mil habitantes.

Em um estudo epidemiológico retrospectivo descritivo no município de Aracajú (SE), também realizado entre os anos de 2007 a 2011, por Góes et al.¹⁴, apresentou 128 novos casos de LV notificados, o que representou uma média de 25 casos anuais, tendo o predomínio de casos em pessoas do sexo masculino (65%) e crianças de até 4 anos de idade (26%) e, o coeficiente médio de incidência foi de 23 casos para cada 100 mil habitantes.

No ano de 2016 foram notificados ao Ministério da Saúde 3.626 casos de LV em humanos e 275 mortes pela doença no país, desses casos, o Estado de São Paulo notificou 119 casos confirmados e 11 óbitos¹⁵.

O Portal da Saúde – SUS fez um levantamento de casos confirmados entre os anos de 1990 a 2015, nas grandes regiões e unidades federadas, destes dados observa-se que a região de maior prevalência em todos os anos é a Nordeste, seguida pela região Norte e Sudeste. Já no ano de 2015 a prevalência sofreu uma leve alteração, com relação às regiões, desta forma a região Sudeste ultrapassou a Norte em número de casos. A respeito da região Sudeste o estado de Minas Gerais é o de maior prevalência de casos de LV em todos os anos avaliados, a partir de 2000 iniciaram as notificações de casos em São Paulo colocando o estado no segundo lugar do *ranking* dentre os quatro estados do Sudeste (MG, SP, ES e RJ), sendo então, a partir do ano de 2002 um estado com mais de 100 casos/ ano registrados¹⁶.

A figura abaixo demonstra o *ranking* de casos de LV no Brasil, dividido por regiões,

entre os anos de 2006 e 2015.

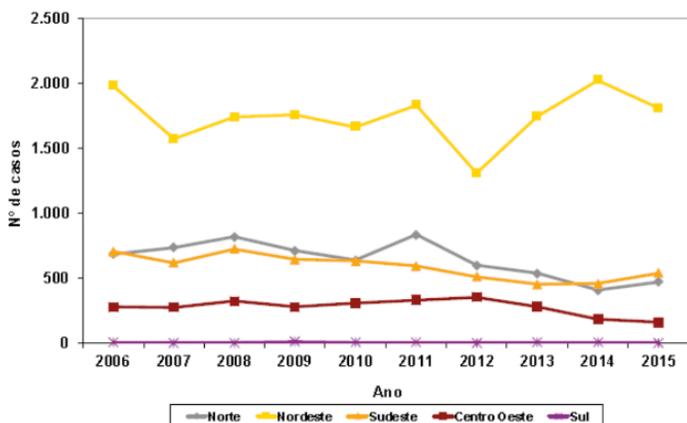


Figura 5 - Casos de Leishmaniose Visceral por regiões brasileiras, 2006 a 2015.

Fonte: (SVS/MS, 2015)¹².

Com os dados vistos no gráfico apresentado na figura acima, observar-se que o Nordeste se mantém como principal região em prevalência de LV, seguido pelas regiões Norte e Sudeste, que alternam de posição no decorrer dos anos.

Em estudo realizado no estado de São Paulo entre 1999 e 2011 detectou-se que 73 municípios têm potencial transmissão da doença para humanos, as primeiras ocorrências foram em locais de maiores temperaturas e menos úmidas, mas as ocorrências conseguintes também se deram em regiões menos quentes e mais úmidas. A expansão da LV humana demonstrou eixo de disseminação do noroeste para o sudeste e eixo secundário de norte a sul do estado, possíveis fatores determinantes para essa expansão foram à rodovia Marechal Rondon e a construção do gasoduto Brasil-Bolívia. Os municípios detectados com maior taxa de incidência e mortalidade incluíram Araçatuba, Presidente Prudente e Marília¹⁷. Outro estudo conduzido na mesorregião de Presidente Prudente (SP) e publicado em 2017, também concluiu que o gasoduto Bolívia-Brasil, a rodovia Marechal Rondon, as altas temperaturas anuais e fatores econômicos são os principais fatores de risco na dispersão da LV no estado de SP¹⁸.

Na edição de 2015 do Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)¹⁹ foram publicados os dados analisados durante o ano de 2014 que revelaram 132 municípios do estado de São Paulo com transmissão de LV, sendo que destes, 76 municípios apresentaram casos humanos e animais autóctones, 47 municípios apresentaram casos caninos não autóctones e 9 apresentaram casos autóctones somente em humanos. No estado de São Paulo, durante o período de 1999 – 2014 foram notificados 5.798 casos suspeitos de LV, sendo 2.467 casos autóctones, distribuídos em 85 municípios, e com índice de mortalidade de 8,7%. O ano de maior incidência foi o ano de 2008 (294 casos) e o ano com maior taxa de letalidade foi 2003 (14%). A [figura 6](#) abaixo, demonstra o mapa do estado de São Paulo e a distribuição de municípios, em dezembro de 2014.

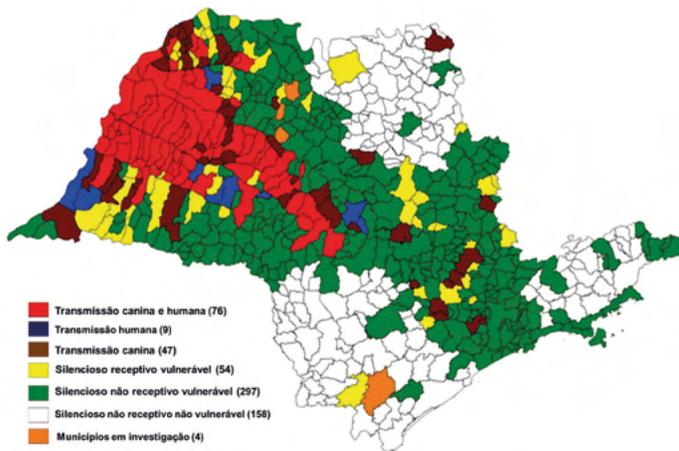


Figura 6 – Distribuição de municípios segundo a classificação epidemiológica para Leishmaniose Visceral em dezembro de 2014, Estado de São Paulo.

Fonte: (BEPA, 2015)¹⁹

3 | LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

3.1 Epidemiologia

O Centro de Controle de Zoonoses de Presidente Prudente (SP) confirmou, em reportagem publicada no dia 06/03/2017 pelo portal G1²⁰, 46 novos casos de LVC, sendo que, esses registros são referentes ao ano de 2016 e destes, 45 casos são autóctones. Com essa nova informação, a cidade registra a soma de 256 casos de LVC em 2016 sendo que, 16 deles importados e os demais autóctones. Em nova publicação ocorrida em 25/06/2017, o Diário Oficial – DHOJE Interior¹⁵, registra que já foram confirmados, nessa região, mais de 140 casos caninos no primeiro semestre de 2017.

Em 25/06/2017 a matéria intitulada “São Paulo em alerta contra a Leishmaniose” - Diário Oficial DHOJE Interior¹⁵, informa que já foram registrados seis casos de leishmaniose canina em Rio Preto (SP) no primeiro semestre de 2017; durante todo o ano de 2016 foram notificados 42 casos, mas até o momento não foram registrados casos autóctones em humanos. Já na cidade de Votuporanga (SP) houve registro de 135 cães positivos em 2017¹⁵.

Na cidade de Araçatuba (SP), no primeiro semestre de 2016, foram registrados 340 casos de cães positivos com Leishmaniose Visceral, o que equivale a quase metade dos casos reportados no ano todo de 2015 (733 cães positivos). Segundo o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) esse número pode ser pelo aumento de exames realizados. Equipes fazem trabalho de conscientização e orientação em residências e, o CCZ recebe tutores com seus animais para a realização de exames diagnósticos; reportagem publicada em 14/08/2016, pelo portal G1²¹.

No dia 29/06/2017, o portal G1²², publicou nota em que a prefeitura de Valinhos (SP) confirmou 24 casos de LVC, destes já houve cinco mortes, sendo uma delas por eutanásia,

devido estado avançado da doença no animal e, ainda estão sendo investigados 61 casos suspeitos na mesma região. Em novo levantamento feito pela Prefeitura de Valinhos e, publicado pelo portal G1 em 10/07/2017²³, houve a confirmação de 44 casos de LVC e seis mortes, todos provenientes da zona rural da cidade.

A Prefeitura de Indaiatuba (SP) confirmou ao portal G1²³, em 10/07/17 que há sete casos confirmados de LVC e um dos animais veio a óbito. Nessa mesma reportagem, a prefeitura de Campinas (SP) confirmou um caso positivo canino e outros três animais estão em investigação; a doença começou a causar atenção a essa região após surto de LVC na cidade de Valinhos (SP), até o momento não há reporte de casos humanos nas regiões²³.

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

D'Andrea et.al.²⁵ fizeram um levantamento da mesorregião de Presidente Prudente e Montalvão (SP), o Estado de São Paulo possui uma distribuição espacial de *L. longipalpis* e LVC em 148 municípios, onde o vetor foi encontrado em 32 dos 45 municípios da mesorregião de Presidente Prudente e, LVC foi encontrada 15 dos 45 municípios desta mesma mesorregião.

Na publicação de 2015 do Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)¹⁹ foi apresentado o levantamento entomológico do *Lu. longipalpis* no estado de SP o qual detectou a presença da espécie em 177 municípios paulistas, conforme mapa apresentado na [figura 7](#) abaixo. Todos os locais grifados em vermelho, são municípios com presença de *Lu. longipalpis*.

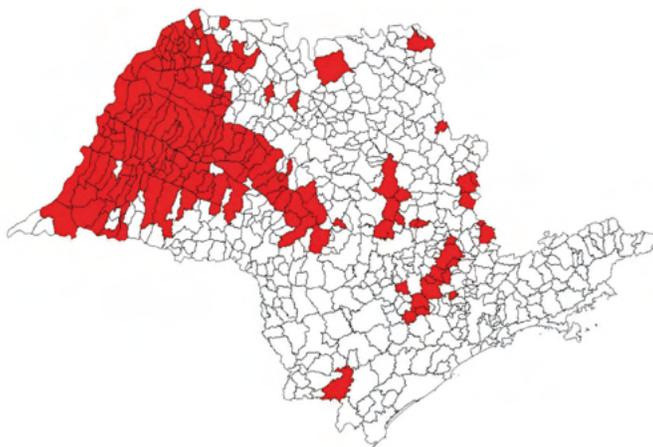


Figura 7 – Distribuição de municípios com presença de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo, dezembro de 2014.

Fonte: (BEPA, 2015)¹⁹.

3.2 Vetor

Os vetores da doença são insetos voadores conhecidos como flebotomíneos e são de grande importância médica, pois são vetores de diversos patógenos, incluindo os responsáveis pela Leishmaniose. Apesar de não haver um consenso universal sobre a classificação genérica dos flebotomíneos, o posicionamento das espécies no Velho Mundo é, geralmente, mais aceito do que a classificação dada no Novo Mundo. Durante muitos anos somente 3 gêneros têm sido reconhecidos: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*⁶. No caso dos flebotomíneos neotropicais, há diversos conceitos e divergências entre autores, uma classificação publicada por Galati, et al.²⁶, apresentam 464 espécies em 22 gêneros, 20 subgêneros, 3 grupos de espécies e 28 séries.

O principal vetor envolvido na transmissão da Leishmaniose, ao cão e ao homem, é da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O cão é o principal reservatório doméstico do protozoário *Leishmania*^{1,26}. Entretanto após a ocorrência de casos de LVC em uma cidade da grande São Paulo, onde as espécies de flebotomíneos predominantes são *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei*, Galvis-Ovallos et al.²⁸, fizeram um estudo experimental com essas três espécies de flebotomíneos, onde foram avaliados: hábito alimentar, atratividade ao cão, expectativa de vida após repasto sanguíneo e a susceptibilidade ao *L. infantum*. Com os resultados obtidos nesse estudo pôde-se concluir que as duas espécies têm atratividade pelo cão, porém varia conforme a intensidade de ocorrência de cada espécie na região. O hábito alimentar das três espécies demonstrou que o *Lu. longipalpis* têm, significativamente, maior proporção de alimentação por sangue canino. A frequência de repasto sanguíneo do *Lu. longipalpis* é maior do que das outras duas espécies estudadas; quanto à sobrevivência após repasto sanguíneo, as três espécies, mesmo em baixa densidade, são passíveis de manter o ciclo de transmissão, pois têm longa vida infectiva. E no experimento da susceptibilidade ao *L. infantum* concluiu-se que, após contaminação experimental, o *Pi. Fischeri* teve susceptibilidade no desenvolvimento do *L. infantum* em seu organismo, porém, o *Pi. Fischeri* tem eficiência mais baixa na transmissão da *L. infantum* do que o *Lu. longipalpis*, entretanto na ausência da principal espécie de vetor, o *Pi. fischeri* apresenta potencial para ser vetor da *Leishmania*²⁸.

No ciclo de vida do flebotomíneo as fases de ovo, larva e pupa desenvolvem-se em microambientes úmidos e ricos em matéria orgânica. Os tempos precisos de desenvolvimento de cada fase não são fixos, pois a temperatura ambiente influencia nesse tempo, sendo que baixas temperaturas aumentam o tempo de desenvolvimento e altas temperaturas encurtam esse tempo. Em condições laboratoriais os ovos desenvolveram-se em média de 7 – 10 dias, larvas demoram, pelo menos 3 semanas para transformarem-se em pupas e o adulto emerge da pupa depois 10 dias, sendo que os machos emergem mais rápido que as fêmeas; os estágios imaturos são difíceis de encontrar na natureza e os locais de alimentação da maioria dos vetores são desconhecidos^{1,6,29}. O ciclo de vida do flebotomíneo é mostrado esquematicamente na figura abaixo.

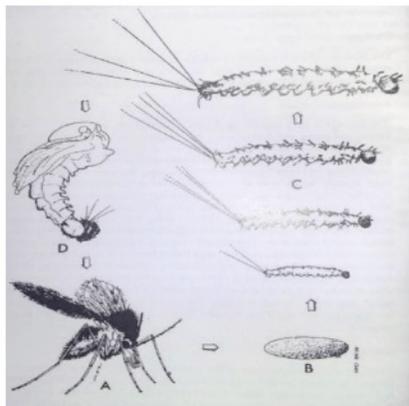


Figura 8 - Ciclo de vida esquemático do flebotomíneo.

Fonte: (WHO, 2010)⁶

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

As fêmeas de praticamente todas as espécies se alimentam de sangue do hospedeiro para ter o desenvolvimento dos ovos. Durante o dia os flebotomíneos ficam alojados e protegidos em locais frescos e úmidos, como: vegetação densa, buracos em paredes, latrinas, celeiros, estábulos, dentre outros. A atividade alimentar dos flebotomíneos é crepuscular e noturna^{6,29}.

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

Nas regiões norte e nordeste o vetor encontra-se, originalmente, em áreas de mata, porém com a expansão demográfica esses insetos adaptaram-se a área rural e sua adaptação deu-se, principalmente, pela presença de animais sinantrópicos e silvestres. Na região sudeste verificou-se, no final da década de 80, uma adaptação desse inseto aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, podendo assim ser encontrado em peri domicílio, galinheiros, chiqueiro, canil, paiol e ambiente intra domicílio. O *Lu. longipalpis* adapta-se facilmente ao peri domicílio e a variações de temperatura, podendo ser encontrado no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos, há indícios de que o maior período de transmissão ocorra durante a estação chuvosa, quando há aumento populacional do inseto¹.

3.3 Protozoários

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

Lainson e Shaw (2005 [*apud* Lainson, 2010]) propuseram uma importante mudança na classificação do subgênero *Leishmania*, essa mudança consistia em dividir a espécie *L. infantum* em duas subespécies: *L. infantum* (Velho Mundo) e *L. infantum chagasi* (Novo Mundo); além disso, a nova classificação incluiria a *L. forattinii*, espécie encontrada em gambá (*Didelphis marsupialis*) e roedor (*Proechimys iheringi denigratus*) no Brasil. A distribuição geográfica da *L. infantum chagasi* ocorre na maior parte do continente latino-americano, incluindo: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Martinica, México, Nicarágua, Paraguai, Suriname e Venezuela³⁰. O principal vetor conhecido é o *Lu. longipalpis*, porém o *Lu. evansi* também foi incriminado na Colômbia e Venezuela³¹⁻³².

Abaixo, o quadro 2 apresenta as principais espécies de *Leishmania* patogênicas para seres humanos e a doença associada à espécie, quadro adaptado de tabela apresentada no estudo de Steverding³⁴, demonstrando somente as espécies de importância no Brasil.

| Leishmaniose Tegumentar Americana | | Leishmaniose Visceral Americana |
|---|-----------------------------|---|
| Cutânea | Mucocutânea | |
| Subgênero <i>Leishmania</i> | Subgênero <i>Leishmania</i> | Subgênero <i>Leishmania</i> |
| <i>L. (L.) amazonensis</i> | <i>L. (L.) amazonenses</i> | <i>L. infantum</i> (*sin. <i>L. chagasi</i>) |
| <i>L. infantum</i> (*sin. <i>L. chagasi</i>) | | |
| Subgênero <i>Viannia</i> | Subgênero <i>Viannia</i> | |
| <i>L. braziliensis</i> | <i>L. braziliensis</i> | |
| <i>L. guyanensis</i> | <i>L. guyanensis</i> | |
| <i>L. lainsoni</i> | <i>L. panamensis</i> | |
| <i>L. lindenbergi</i> | | |
| <i>L. naiffi</i> | | |
| <i>L. panamensis</i> | | |
| <i>L. shawi</i> | | |

*sin. = sinônimo.

Quadro 1 - Espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose humana.

Fonte: (Steverding, 2017)³⁴.

As espécies *L.(V) braziliensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) guyanensis* e *L. infantum chagasi* também são as espécies responsáveis pelas doenças, cutânea / mucocutânea e visceral respectivamente, em animais domésticos, mais frequentemente nos cães; porém recentes estudos apontam diversos casos de LV em gatos domésticos³⁵⁻³⁶⁻³⁷⁻³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰.

As Leishmanias são protozoários que possuem ciclo biológico heteroxênico, ou seja, necessitam de 2 hospedeiros diferentes para conseguir cumprir sua evolução. Sua forma promastigota (flagelada) desenvolve-se no sistema intestinal do vetor (flebotomíneo), já no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigotas (sem flagelo), na classe de hospedeiros vertebrados enquadram-se os canídeos silvestres e domésticos, roedores e humanos. São parasitas intracelulares obrigatórios, penetrando e se multiplicando em células do sistema mononuclear fagocitário¹⁻⁴¹.

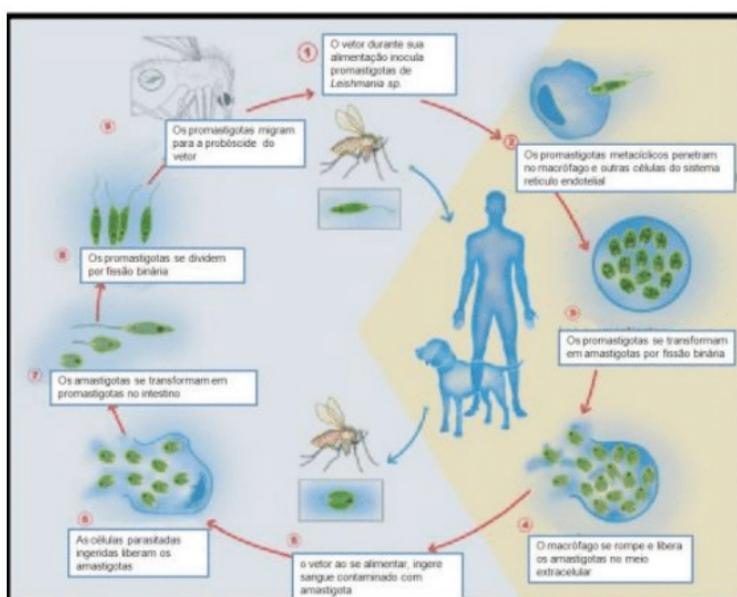


Figura 9 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: (Montalvo, *et.al.* 2012)⁴².

3.4 Sinais Clínicos

A LVC é uma doença sistêmica, crônica e grave, de evolução lenta e início insidioso, pode levar o cão à morte em caso de falha diagnóstica ou tratamento não adequado^{1,36,43}. Acomete diversos órgãos e sistemas, aparentemente, exceto o sistema nervoso central, sua manifestação clínica tem um amplo espectro de sinais que variam de assintomáticos e sinais brandos a sinais severos. A idade é um fator importante demonstrando que a maior prevalência encontrada é em cães de até 3 anos de idade ou acima de 8 anos^{36,43}.

Devido à alta taxa de cães assintomáticos, o diagnóstico clínico da LVC é muito complexo e nos casos sintomáticos a apresentação clínica da doença se assemelha a

diversas outras enfermidades^{1,36-37}.

Os principais sinais clínicos que são comumente encontrados em cães sintomáticos estão listados no quadro 2.

| | |
|--------------------------------------|--|
| Manifestações clínicas gerais | Linfadenomegalia |
| | Perda de peso |
| | Diminuição do apetite |
| | Letargia |
| | Esplenomegalia |
| | Palidez de mucosas |
| | Poliúria ou polidipsia |
| | Febre |
| | Êmese |
| | Diarreia |
| Manifestações cutâneas | Dermatite esfoliativa com ou sem prurido |
| | Dermatite ulcerativa |
| | Dermatite nodular |
| | Dermatite papular |
| | Dermatite pustular |
| | Onicogrifose |
| Manifestações oculares | Blefarite e conjuntivite |
| | Ceratoconjuntivite |
| | Uveíte |
| Outras manifestações | Lesões ulcerativas em mucosas |
| | Lesões nodulares em mucosas |
| | Epistaxe |
| | Claudicação (poliartrite, polimiosite) |
| | Atrofia muscular |
| | Desordens vasculares (vasculite) |
| Desordens neurológicas | |

Quadro 2 - Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral Canina.

Fonte: (Solano-Galleno, et al., 2011)³⁶.

A doença renal pode ser a única manifestação clínica da doença e há alta prevalência desse tipo de lesão em cães acometidos com LV, essas lesões podem progredir de leve proteinúria até síndrome nefrótica ou estágio final de falência renal. A falência renal crônica é o resultado da progressão da doença e a principal causa de morte de cães infectados³⁶.

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

Estágio I (doença leve): exames citológicos, histológicos, parasitológicos e

molecular são geralmente negativos, pode haver baixos títulos de anticorpos (Ac) anti-Leishmania; os animais podem ser clinicamente saudáveis ou apresentar leves sinais como dermatite e/ou linfadenomegalia generalizada, que podem estar associadas a outras doenças. Os exames laboratoriais hematológicos, bioquímicos e perfil renal encontram-se normais nesse estágio^{35-36,44}.

Estágio II (doença moderada): os animais apresentam resultados confirmatórios de parasitose por exames como: parasitológico direto, cultura parasitológica ou PCR, mesmo quem tenha apresentado baixos títulos de Ac. Esses animais podem apresentar-se saudáveis ou com sinais clínicos sugestivos da doença, como: lesões esfoliativas, dermatite, onicogribose, úlceras (plano nasal, patas, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxis. Os exames hematológicos e bioquímicos podem apresentar leve anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e, o perfil renal pode estar normal ou com proteinúria^{35-36,44}.

Estágio III (doença severa): os animais nesse caso apresentam citologia positiva e, de médios a altos títulos de Ac. Os sinais clínicos como: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite podem estar somados aos sinais clínicos citados nos estágios anteriores. Exames laboratoriais como os estágios citados anteriormente associados à doença renal crônica em estágio I ou II^{35-36,44}.

Estágio IV (doença muito severa): parasitológico direto positivo e de médio a altos títulos de Ac. Além dos sinais clínicos mencionados nos estágios anteriores, também há evidência de proteinúria severa, síndrome nefrótica, doença renal crônica em estágio III ou IV ou, até mesmo falência renal, concomitantemente, tromboembolismo pulmonar, problemas oculares severos, doenças articulares que dificultam a mobilidade e, a presença de doenças concomitantes e/ou co-infecções também são comuns nesse estágio^{35-36,44}.

3.5 Testes Diagnósticos

3.5.1 Exame Bioquímico

No exame bioquímico pode ser realizada a análise das proteínas plasmáticas, que vão auxiliar no diagnóstico de algumas doenças de caráter infeccioso. As proteínas plasmáticas totais (PPT) são sintetizadas principalmente no fígado e são constituídas de aminoácidos obtidos após quebra e absorção intestinal. Os dois principais tipos de proteínas plasmáticas são a albumina e a globulina⁴⁵⁻⁴⁶.

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, é sintetizada no fígado, contribui para o equilíbrio da pressão osmótica e participa do transporte de diversas substâncias (por exemplo: hormônios, ácidos graxos, bilirrubina não conjugada), sendo que uma diminuição do seu valor sérico pode ser decorrente de doença hepática (devido a menor produção), má nutrição ou absorção e/ou doença glomerular, o que leva a uma maior perda desta proteína. A hipoalbuminemia também pode estar relacionada a um decréscimo recíproco associada com a hiperglobulinemia⁴⁵⁻⁴⁶.

Na LVC as alterações hepáticas estão associadas à evolução da doença em função da multiplicação das formas amastigotas nos macrófagos, assim a LVC pode levar à hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. O aumento das concentrações séricas de proteínas totais é consideravelmente importante em cães com LVC, podendo alcançar valores acima de 10 g/dl, e esse aumento exacerbado se dá, principalmente, pela hiperglobulinemia⁴⁸.

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

- Hematológica - leve à severa anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia e hemostase ou fibrinólise secundária³⁵⁻³⁶.
- Bioquímica - diminuição na relação albumina: globulina (A:G), leve à moderada proteinúria, azotemia renal e aumento nas atividades das enzimas hepáticas³⁵⁻³⁶.

3.5.2 Sorologia

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

Pensando em um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade e com o intuito de evitar o uso de métodos invasivos, o MS preconizou um protocolo de diagnóstico por métodos sorológicos; assim, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos para o diagnóstico canino. Mesmo com a alta diversidade de testes sorológicos disponíveis, o Brasil no ano de 2006, optou por trabalhar com os testes de Elisa (do inglês: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) e R.I.F.I. (reação de imunofluorescência indireta), disponíveis em kits específicos produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e autorizados pelo Mapa, estes são recomendados e distribuídos pelo MS para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos. O teste de Elisa era recomendado para a triagem de cães e o teste R.I.F.I. usado para confirmar os resultados reagentes do Elisa¹.

Em 2011, por meio de uma Nota Técnica Conjunta 01/2011, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico da LVC, sendo que, a partir de então, seria utilizado o teste DPP® (do inglês: *Dual Path Platform*) como triagem e o Elisa como confirmatório nos casos positivos da triagem, porém falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um alto e desconhecido número de animais não infectados e, em contrapartida, não detectar precisamente cães positivos; com isso pode-se observar que, apesar de diversos tipos de métodos diagnósticos disponíveis, o Brasil ainda não possui um método de diagnóstico sensível, específico e de fácil execução para a LVC⁴⁹.

3.5.2.1 DPP

O DPP® é uma tecnologia inovadora de ensaio imunocromatográfico para diagnósticos rápidos, foi desenvolvido pela empresa norte americana *Chembio Diagnostic System* em parceria com a empresa brasileira Bio-Manguinhos® - Rio de Janeiro/ RJ⁵⁰⁻⁵¹. Esse teste rápido para diagnóstico da LVC oferece resultados em um período de ± 15 minutos, sem a necessidade de estruturas e equipamentos laboratoriais, o que facilita seu uso a campo. Possui tecnologia de alta sensibilidade, o que traz precisão ao diagnóstico de LVC em sangue ou plasma sérico. É um teste de triagem no qual em casos de resultados positivos, o material deverá ser enviado para testes confirmatórios⁵¹.

O DPP® trata-se de um teste imunocromatográfico qualitativo para a detecção de antígenos anti-*Leishmania*. Esse teste utiliza a proteína recombinante rK39 como antígeno, essa proteína é uma sequência de 39 aminoácidos clonados da região quinase específica da *L. chagasi*, e tem sido amplamente avaliada no diagnóstico da LV⁵²⁻⁵³.

3.5.2.2 Elisa

A técnica Elisa permite a detecção de baixos títulos de Ac, inclusive em casos assintomáticos de LVC. Os resultados são expressos como: reagente e não reagente, o antígeno utilizado (bruto ou recombinante) é um dos fatores que influencia na variabilidade da sensibilidade e especificidade, por exemplo, a utilização de Ag bruto ou total limita a especificidade do teste Elisa e pode proporcionar resultados falsos por reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, porém o uso de Ag recombinante específico para *Leishmania*, melhora as duas variáveis – especificidade e sensibilidade⁵³⁻⁵⁴.

3.5.2.3 R.I.F.I.

O R.I.F.I. é utilizado para a detecção de anticorpos contra *Leishmania* (IgG anti-*Leishmania*) em soros de cães e consiste na reação de soros com parasitas fixados em lâminas de microscopia, na etapa seguinte utiliza-se conjugado fluorescente para evidenciar a reação⁵⁵. A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerados reagentes os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

É importante a realização do diagnóstico diferencial da LVC com outras doenças infecciosas, inclusive a Leishmaniose Tegumentar que proporciona resultados sorológicos com títulos mais baixos na R.I.F.I. (1/40 ou 1/80). Diferentes métodos diagnósticos são descritos para a detecção da infecção por *Leishmania* sp., entretanto, testes diagnósticos validados são essenciais para essa detecção, mesmo que não apresentem sensibilidade e especificidade de 100%³⁵⁻³⁶.

3.5.3 PCR

O PCR é um método de diagnóstico molecular que, apresentou desenvolvimento de novas técnicas de identificação e detecção de material genético de parasitas do gênero

Leishmania, após a década de 80. Uma das vantagens dessa técnica é a identificação gênica do parasita sem a necessidade de isolamento do mesmo em culturas. O PCR é baseado na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência genética conhecida do parasita, é uma técnica versátil que pode ser aplicada em diversas amostras biológicas, tais como: aspirados de medula óssea, aspirados de linfonodos, sangue, urina e biópsias de pele; o que o torna um método diagnóstico menos invasivo. A sensibilidade do PCR é bastante variável e depende da amostra utilizada e do marcador empregado⁵⁶.

Nas últimas décadas o PCR tem se mostrado um exame com alta sensibilidade e uma importante ferramenta no diagnóstico da LVC⁵⁷.

No estudo publicado por Schönian et al.⁵⁷, foi descrito o método universal de PCR para o diagnóstico direto de diferentes estágios de manifestação clínica. O método foi aplicado em áreas não endêmicas e em regiões com importância epidemiológica. A sensibilidade e especificidade foram comparadas com duas diferentes combinações de amplificação de *primers*: 1- parte variável do gene *ssu rRNA* e, 2- o espaçador transcrito interno ribossômico (ITS1-PCR). Usando a combinação 1 (*ssu rRNA*) foram identificados somente os complexos *L. donovani* e *L. braziliensis*. Contudo, as espécies de maior importância médica puderam ser distinguidas pela análise de enzimas de restrição da região ITS1 que se situam entre os genes que codificam o *ssu* e o 5.8S do rRNA. Os dois ensaios de PCR feitos usaram diferentes partes ribossômicas da *Leishmania* para as amplificações: 1- parte do gene de *ssu rRNA* utilizando *primers* R221 e R332 (técnica descrita em 1992 por Van Eys, *et.al.*) e, 2- espaçador transcrito interno ribossômico 1 (ITS1) separando os genes que codificam para *ssu rRNA* e 5.8S rRNA utilizando os *primers* LITSR e L5.8S.

A região ITS1 que separa os genes *ssu rRNA* e 5.8S rRNA variam entre espécies de *Leishmania* pelo tamanho e sequência de nucleotídeos; a maior vantagem desse método é que a identificação das espécies pode ser conseguida através da digestão do produto PCR com a enzima de restrição *HaeIII*⁵⁷.

3.5.4 Exame Parasitológico

Já os exames parasitológicos diretos detectam a presença do parasita na amostra, porém devem ser realizados por pessoas muito experientes para que não haja resultados falsos ou falhas na interpretação. A cultura também é um teste parasitológico, que pode ser realizado na detecção e identificação da *Leishmania* em meios de cultura específicos. Por fim, os exames moleculares são os que detectam fragmentos de DNA do parasita e podem ser quantificados³⁵⁻³⁶.

Abaixo são apresentadas as vantagens e desvantagens de cada método diagnóstico. Quadro adaptado para a língua portuguesa, da tabela apresentada no *Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis* e publicado por Solano-Gallego, et al.³⁶.

| Método | Vantagem | Desvantagem |
|-------------------------------------|---|---|
| Sorologia | Determinação do nível de anticorpos (Ac), essencial para diagnóstico e estabelecer prognóstico. | Não detecta a presença do protozoário no momento do exame e há possibilidade de reação cruzada com outros tripanossomídeos. |
| Qualitativo | Teste rápido de ser feito em clínica. | Emite resultado positivo ou negativo, sensibilidade variável e possibilidade de falsos negativos e um resultado positivo deve ser comprovado com um método quantitativo. |
| Quantitativo | Determina nível de Ac (altos níveis de Ac associado às manifestações clínicas são conclusivos da infecção). | A realização depende de um laboratório especializado, pode haver diferença diagnóstica entre laboratórios, métodos não são padronizados e baixos níveis de Ac exigem novas provas. |
| Citologia ou Histopatológica | Permitem a direta detecção do parasita, permite a exclusão de outros diagnósticos diferenciais e é rápido e pouco invasivo (citologia). | Baixa sensibilidade para a detecção de amastigotas de <i>Leishmania</i> em tecidos ou fluídos requer a realização de outros métodos diagnósticos quando não encontrado o parasita, não revela o estado imunológico do animal e precisa de especialista para a leitura. |
| PCR | Permite a detecção do DNA do parasita, alta sensibilidade e especificidade (kDNA) e quantifica a carga parasitária (PCR <i>Real Time</i>). | É possível obter falsos positivos se houver contaminação do DNA, diferentes métodos e padronizações entre laboratórios, não revela o estado imunológico do animal, não pode ser realizado como único diagnóstico porque um resultado positivo confirma a infecção e não a doença. |
| Cultura parasitária | Permite o isolamento do parasita e facilita a identificação isoenzimática do parasita. | Técnica requer laboratório e tempo para a execução, pode demorar um mês para obter o resultado e só é realizado em laboratórios especializados. |

Quadro 3 - Vantagens e desvantagens dos métodos diagnósticos comuns para a detecção da infecção por *L. infantum* em cães.

Fonte: (Solano-Galleno, et al. 2011)³⁶.

4 | A CIDADE DE SÃO PAULO

A Cidade de São Paulo é a capital do estado, de mesmo nome, mais populoso do Brasil, situa-se sob as coordenadas, ao paralelo 23°32'52" sul e do meridiano 46°38'09" oeste. Possui uma área total de 1.522.986 km², sendo o nono maior em extensão territorial. De toda área do município cerca de 968.324 km² são de área urbanas, sendo então considerada a maior área urbana do país. O clima é considerado subtropical úmido, com diminuição de chuvas no inverno e a temperatura anual média é em torno de 19,2°C, os períodos de verão costumam ser com temperaturas moderadamente altas e com fortes chuvas⁵⁸.

4.1 Grajaú

O bairro do Grajaú está localizado na região sul da cidade de São Paulo e há diversos anos convive com promessas de melhorias na infraestrutura. Esse distrito nasceu entre as décadas de 50 e 60⁵⁹. Seu nome, Grajaú, sinônimo de garajau está relacionado a um tipo de cesto oblongo e fechado usado para o transporte de animais (galinhas e peixes)⁶⁰. O distrito do Grajaú possui uma elevada taxa de crescimento, uma das maiores de São Paulo e também é o distrito mais populoso, sendo que a maior parte de sua população vive em comunidades carentes, estima-se que são mais de 50 mil pessoas vivendo em barracos e pequenas casas de alvenaria, em áreas improvisadas⁵⁹.

4.2 Ilha do Bororé

Bororé é um bairro peculiar da cidade de São Paulo, o seu acesso se dá por uma balsa que atravessa a represa Billings e esse isolamento proporcionou a esse bairro, também conhecido como Ilha do Bororé, o local é ideal para a visualização de pássaros e para realizar passeios de barco. Essa região possui alta relevância ecológica, sendo uma das últimas grandes áreas verdes de São Paulo, porém está bastante ameaçada pelo crescimento populacional desordenado, o que faz com que a proteção da região seja extremamente importante, para garantir a preservação de recursos naturais. A APA (área de proteção ambiental) da ilha de Bororé incentiva práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente, através de programas de capacitação e assistência técnica especializada, valorizando os sistemas agroflorestais e a agricultura orgânica e biodinâmica. Essa colônia foi fundada em 1829 com o nome de Colônia Alemã e é um dos mais antigos focos de colonização europeia do Brasil⁶¹.

5 | LEGISLAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E EUTANÁSIA NO BRASIL

A Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008 proíbe o tratamento de Leishmaniose Visceral Canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O tratamento não autorizado incidiria em infrações com penalidades previstas em Lei e pelo Código de Ética do Médico Veterinário⁶².

Em Setembro de 2013 foi deferido parcialmente o pedido de suspensão da decisão recorrida, permitindo a utilização da Portaria 1.426/2008, desde que a eventual eutanásia canina a ser praticada seja precedida da realização de dois testes laboratoriais comprobatórios da infectividade do cão: R.I.F.I. ou DPP® e Elisa; e também da criteriosa avaliação do Médico Veterinário, pertencente aos quadros públicos⁴⁹.

Em 2016 por meio de Nota Técnica Conjunta entre o Mapa e MS foi autorizado o registro e comercialização de um produto à base de Miltefosina de propriedade da Virbac Saúde Animal, para o tratamento da LVC. O registro do produto foi concedido respeitando a Lei Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, que proíbe o tratamento de cães com produtos de uso humano ou não registrados no Mapa. A miltefosina, por não ser um medicamento de escolha para o tratamento humano da LV, foi aprovada mediante análise das evidências científicas apresentadas pela empresa, para o tratamento de cães⁶³.

OBJETIVOS

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

1 | OBJETIVO GERAL

Identificar, através de exame hematológico, sorológico e molecular, cães com resultado positivo para a Leishmaniose visceral, na cidade de São Paulo.

2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar possíveis cães portadores da Leishmaniose visceral, na zona Sul da cidade de São Paulo.
- Analisar a possível taxa de ocorrência de cães positivos sintomáticos e não sintomáticos em uma área não endêmica.
- Correlacionar os resultados obtidos com os exames realizados no diagnóstico da LVC.

JUSTIFICATIVA

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

MATERIAIS E MÉTODOS

1 | LOCAL DO ESTUDO

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

2 | POPULAÇÃO DO ESTUDO

2.1 Randomização

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

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

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

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

2.2 Amostras coletadas

As amostras foram coletadas em três datas das campanhas de castração, ocorridas nos meses de Abril, Junho e Agosto do ano de 2016. Foram armazenadas em congelamento, após a centrifugação e separação do soro e concentrado de hemácias em *ependorfes* identificados com o número de registro do animal na campanha e a data de coleta.

As amostras de concentrado de hemácias foram processadas pelo procedimento de extração de DNA de forma individual, utilizando o kit de extração “*Dneasy Tissue Kit*” (Qiagen, Chatswoth, CA), conforme as instruções do fabricante e, preparadas para a realização do PCR, entre os meses de setembro e dezembro de 2016. O PCR foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em parceria com o Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e Prof. Dr. Arlei Marcili.

As amostras sorológicas foram processadas da seguinte maneira: **a)** testes DPP® e Elisa no Instituto Adolf Lutz - SP; **b)** R.I.F.I. na Universidade Estadual do Maranhão; **c)** Proteinograma (Proteínas totais, Albumina e Globulina) no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Anhembi-Morumbi – SP.

O processamento das amostras foi realizado em parceria com o Prof. Msc. Márcio

Antônio Batistela Moreira da Universidade Anhembi Morumbi – *Campus* Mooca - docente e responsável pelo Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário Universitário da mesma instituição; com o professor Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto do Instituto Adolf Lutz e responsável pelo laboratório de sorologia da instituição e, com a Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa da Universidade Estadual do Maranhão.

2.3 Exame Físico dos animais

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

3 | PROCEDIMENTO DE COLHEITA

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em uma sala de atendimento pós-cirúrgico onde os médicos veterinários e alunos do programa de extensão universitária, voluntários do projeto de esterilização, realizaram limpeza, curativo da ferida cirúrgica e aplicação de medicamentos pela via SC.

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

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

4 | AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

4.1 Proteínas Plasmáticas

Para o perfil bioquímico desta dissertação, foram analisados: albumina (ALB) e globulina (GLO). Os valores de referência em cães para Albumina são considerados fisiológicos entre 2,5 a 4,0 g/dL e para Globulina o limite de referência é entre 2,5 e 5,4 g/dl; como valor de referência para a relação A:G foi utilizado o intervalo entre 0,59 – 1,1 μ g/dl^{48,64}.

4.2 Sorologia

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

Cada amostra foi testada utilizando o protocolo do Ministério da Saúde na seguinte seqüência: DPP®CVL teste rápido (Bio-Manguinhos/Fiocruz) para triagem e Elisa (*Canine Leishmaniasis EIE Kit*; Bio-Manguinhos/Fiocruz) como confirmatório. Como teste adicional foi realizado o R.I.F.I. (*Indirect fluorescent antibody test*), conforme descrito por Da Costa et al.⁶⁵.

4.2.1 TR DPP® (Teste Rápido Dual Path Platform)

Esse dispositivo é um teste rápido que pode ser aplicado facilmente à campo e sua reação é baseada na reatividade de partículas de ouro coloidais acompanhadas de proteínas com antígenos ligados à anticorpos, os quais podem ser visualizados através da coloração de uma banda do teste⁶⁵.

Para a realização do teste DPP® é feita a adição de 5 µl de sangue total (amostra) ao poço #1 (amostra + tampão) e em seguida adiciona-se o tampão. Após 5 minutos as duas linhas de coloração azul, controle (C) e teste (T), desaparecem e então, se coloca a solução tampão no poço #2 (tampão); após ± 15 minutos é possível fazer a leitura visual das linhas vermelhas que aparecerão. Se tiver somente 1 linha – resultado negativo; se aparecerem 2 linhas – resultado positivo⁵³.

No presente estudo foi realizada a leitura visual e a concentração das amostras, por meio do uso de um leitor de teste rápido DPP®, chamado DPP™-Reader, da *ChemBio Diagnostic System* que, a partir de um valor numérico (concentração), demonstra a intensidade da banda, ou seja, o quanto de Ac foi fixado a Ag. O valor de *cut-off* utilizado é 5,000000; o que significa que valores obtidos abaixo desse *cut-off* são considerados não reagentes e valores acima são considerados reagentes.



Figura 10 - Foto dos Kits DPP® com as amostras do estudo.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2 Teste Elisa

O teste Elisa consiste na reação de anticorpos presentes no soro ou plasma, com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Esse Ag é adsorvido em microplacas (fase sólida), faz-se a adição dos soros controle positivo e negativo e das amostras previamente diluídas. Na próxima etapa é adicionado o substrato, anti-imunoglobulina, que, na presença de Ac específicos ocorre a ligação entre conjugado-anticorpo, o qual poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena; essa junção formará um composto colorido, o que indica que é um resultado “reagente”. As cavidades que não tiverem Ac específicos, não haverá a ligação, portanto, a reação não produz coloração, sendo assim considerada “não-reagente”. Os resultados são lidos por meio de um espectrofotômetro, essa metodologia foi transcrita da bula do kit EIE – Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos⁶⁶, a qual deve ser consultada para informações mais detalhadas sobre a técnica.

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

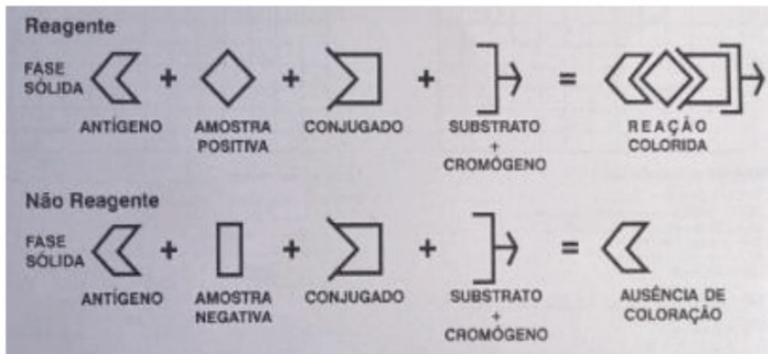


Figura 11 - Sequência esquemática de um teste Elisa.

Fonte: (Bula do Kit, 2008)⁶⁶.

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

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada nesse estudo de acordo com o procedimento descrito por Oliveira, et al.⁶⁷ e da Costa, et al.⁶⁵. No presente estudo a R.I.F.I. foi executada considerando a titulação $\geq 1:80$ como resultado positivo para LVC. Os resultados obtidos com titulação 1:40 são resultados duvidosos e que devem ser repetidos com outras técnicas diagnósticas³⁶.

Amostras reagentes

Aqueles soros que, a partir da diluição 1:40, inclusive, apresentarem fluorescência na membrana dos parasitas, mais intensa que o *back-ground* observado no orifício do controle negativo.

Amostras não reagentes

Os soros teste que não apresentarem fluorescência.

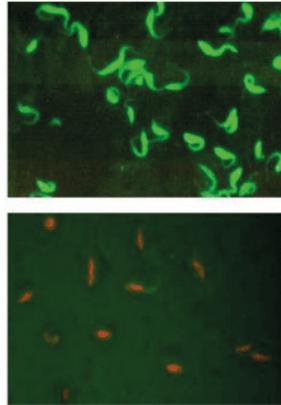


Figura 12 - Foto de reações positiva e negativa – R.I.F.I.

Fonte: (Bula do Kit IFI, 2008)⁶⁸.

4.3 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

O diagnóstico molecular utilizado nesta dissertação foi através do gene ITS (Espaçador intergênico transcrito), utilizando os primers LITSR e L5.8S. Os ensaios foram realizados conforme Schönián, et al.⁵⁷.

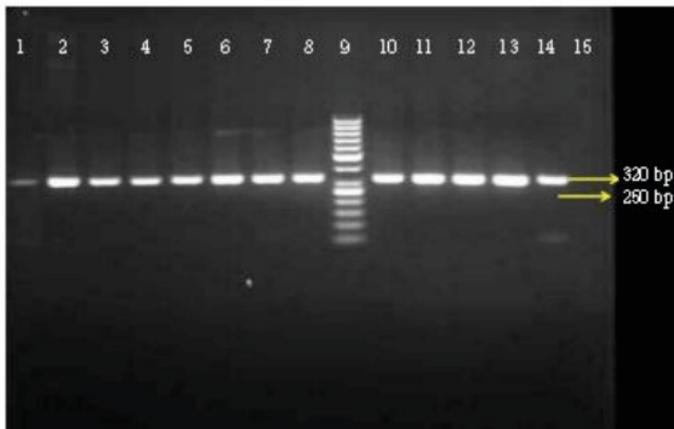


Figura 13 – Gel de Eletroforese de produtos isolados de *Leishmania* em PCR ITS usando primers LITSR e L5.8S. Linhas 1-8 e 10-12: isolados de *Leishmania* sp.; linha 9: marcador de DNA; linha 13: cepa de referência *L. tropica*; linha 14: cepa de referência *L. major* e linha 15: controle negativo.

Fonte: (Ghasemloo, et al. 2016)⁶⁹.

RESULTADOS

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

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

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

Fonte: Arquivo pessoal.

No exame físico realizado, não foram observadas alterações no tamanho dos linfonodos axilares ou poplíteos em nenhum dos animais. Um animal apresentou caquexia e um animal com magreza, seis animais apresentaram mucosas hipocoradas e, 13 dos 153 animais (8,49%) apresentaram algumas lesões de pele, sendo elas localizadas ou generalizadas e as mais comuns encontradas foram alopecia, dermatite nodular e crostas; dentre as lesões dermatológicas, as regiões de maior prevalência foram membros, tórax e orelhas. Destes 13 animais, sete são pertencentes ao Grajaú (Gaivotas do Céu) e a principal lesão encontrada foi dermatite nodular localizada com alopecia, dois desses animais apresentaram também palidez de mucosa oral e um apresentou magreza. Os demais 6 animais foram atendidos na Ilha do Bororé e a principal lesão encontrada também foi dermatite, com maior incidência de alopecia generalizada, 4 animais com palidez de mucosa oral e 1 animal em estado de caquexia, com atrofia muscular em região de membros e tórax.

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

Tabela 2 - Resultados dos exames físicos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os 8 animais que apresentaram alteração de escore corporal ou de mucosa, também apresentaram algum sinal dermatológico, portanto a quantidade total de animais avaliados com sinais foi de 13 cães.

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



Figuras 14 e 15 – Animal de identificação número 69, atendido na Ilha do Bororé em 09/04/2016.

Fonte: Arquivo pessoal.



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

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto aos resultados sorológicos, estes demonstram que no exame DPP® nenhum dos animais estudados apresentou resultado reagente à leitura visual. No resultado do DPP™-Reader observou-se que nenhuma das amostras apresentou concentração acima do limiar utilizado como *cut-off* (5,000000), na verdade, nenhum dos animais apresentou concentração acima de 4,000000. No teste Elisa nenhum dos animais apresentou resultado reagente, desta forma, podemos dizer que 100% das amostras analisadas pelos testes oficiais preconizados pelo MS em inquéritos sorológicos, resultaram como **não reagente**. Os resultados de todos os animais e suas devidas concentrações encontram-se nas tabelas 5, 6 e 7 no Apêndice C desta dissertação.

No teste R.I.F.I. um animal apresentou resultado **positivo**, com titulação de 1:80, as demais amostras avaliadas resultaram negativas. Esse animal positivo foi atendido no Grajaú (Travessa Acácia). Os resultados do R.I.F.I. de todos os animais do estudo, encontram-se na tabela 8, Apêndice D dessa dissertação.

Na avaliação proteica do soro dos animais obtiveram-se os seguintes resultados:

na região da Ilha do Bororé 12 (7,8%) dos animais apresentaram hipoalbuminemia e um animal (0,6%) com hiperglobulinemia (este é um dos animais dentre os 12 citados acima); na região do Grajaú (Gaivota do Céu) verificou-se 4 animais (2,6%) com hipoalbuminemia e um animal (0,6%) com hiperglobulinemia (este animal é um dos 4 animais citados acima) e, no Grajaú (Travessa Acácia) um animal (0,6%) apresentou hipoalbuminemia e nenhum com hiperglobulinemia. Já na análise da relação A:G, pôde ser observado que 8 dos 153 animais (5,2%) apresentaram valor abaixo de 0,59 g/dl (limite mínimo do intervalo de referência usado). Destes 8 animais com queda na relação A:G, 6 são pertencentes à Ilha do Bororé e 2 pertencentes ao Grajaú (Gaivotas do Céu), os resultados completos de todos os animais, encontram-se na tabela 9 no final dessa dissertação, Apêndice E.

No PCR ITS um animal apresentou resultado **positivo**, as demais amostras avaliadas resultaram-se negativas. Esse animal positivo foi atendido no Grajaú (Travessa Acácia) e a tabela 10 com todos os resultados do PCR encontra-se no Apêndice F.

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

| Local | DPP | | Elisa | | R.I.F.I. | | PCR | | A:G |
|------------------------|-----|-----|-------|-----|----------|------|-----|------|-----|
| | R | NR | R | NR | + | - | + | - | |
| Ilha do Bororé | 0 | 53 | 0 | 53 | 0 | 53 | 0 | 53 | 6 |
| Gaivotas do Céu | 0 | 54 | 0 | 54 | 0 | 54 | 0 | 54 | 2 |
| Travessa Acácia | 0 | 46 | 0 | 46 | 1 | 45 | 1 | 45 | 0 |
| Total | 0 | 153 | 0 | 153 | 1 | 152 | 1 | 152 | 8 |
| Porcentagem % | - | 100 | - | 100 | 0,6 | 99,4 | 0,6 | 99,4 | 5,2 |

Tabela 3 - Resultados dos exames laboratoriais.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 4, abaixo, demonstra a identificação dos animais com resultados positivos ou reagentes e suas devidas regiões, para que seja realizada a correlação entre os exames realizados nesse estudo.

| Local | Sinais clínicos | ≤ A:G | DPP | Elisa | R.I.F.I. | PCR |
|------------------------|------------------------------|--------------------------|-----|-------|----------|-----|
| Ilha do Bororé | 6, 52, 58, 68, 69, 122 | 14, 21, 25, 51, 52 e 114 | - | - | - | - |
| Gaivotas do Céu | 4, 36, 50, 81, 110, 122, 123 | 93 e 110 | - | - | - | - |
| Travessa Acácia | - | - | - | - | 71 | 92 |

Tabela 4 – Identificação numérica dos animais com resultados positivos / reagentes nos exames realizados.

Fonte: Arquivo pessoal.

DISCUSSÃO

Dentre os animais que apresentaram sinais dermatológicos nesse estudo, os sinais mais evidentes foram alopecia e dermatite nodular ou crostosa, apresentando-se de forma generalizada ou localizada. Segundo Solano-Gallego, et al.³⁶ descrevem na tabela de manifestações clínicas, as dermatites esfoliativas associadas ou não a alopecia e as dermatites nodulares como sinais relacionados à LVC. Baneth, et al.³⁷ e Paltrinieri, et al.³⁵ também apontam que as alterações dermatológicas são as manifestações mais frequentes dentre as alterações generalizadas possíveis de se encontrar em cães com Leishmaniose Visceral e, podem ser vistas em conjunto com demais anomalias causadas por essa doença.

Alguns dos animais avaliados apresentaram estado nutricional comprometido com emagrecimento severo e palidez de mucosas. Dentre as manifestações clínicas mais comuns da Leishmaniose a perda de peso e palidez de mucosas, além das dermatológicas, também são manifestações descritas por diversos autores, como Silva⁴¹, Paltrinieri, et al.³⁵ e Solano-Gallego, et al.³⁶.

Na avaliação das proteínas plasmáticas puderam ser observadas, em oito animais, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia o que causou alteração da relação dessas proteínas, resultando em valores abaixo do limite de referência utilizado (A:G 0,59 – 1,1 µg/dl). A inversão da relação A:G revela uma diminuição na concentração sérica de albumina e aumento na concentração de globulina, que pode ser devido ao aumento de Ac anti-Leishmania, o que está relacionado com a sintomatologia da doença, havendo então, uma relação importante entre o agravamento dos sinais clínicos e o aumento da globulina sérica⁴⁸. A hipoalbuminemia também pode ser secundária a um comprometimento hepático, no qual pode ocorrer devido à proteinúria ou desnutrição em casos de animais nefropatas e/ou anoréxicos⁴⁸. E a hiperproteinemia, na LVC, pode ser decorrente da ativação dos linfócitos B e consequente produção elevada de anticorpos (γ globulina)⁶⁴.

Os sinais clínicos verificados em dois dos animais do estudo puderam ser relacionados com a alteração na relação das proteínas Albumina e Globulina (A:G ≤ 0,59 µg/dl), desta forma, esses resultados podem ser relativos à Leishmaniose, como também, à outra doença de caráter infeccioso ou mesmo lesões hepáticas que comprometam a fração proteica. Em um estudo realizado por Castro, et al.⁴⁸ onde se avaliou 40 cães sorologicamente reagentes para Leishmaniose, no estado de MG, observou-se que, a queda na relação A:G foi estatisticamente significativa em cães com sintomatologia de LVC, porém os três grupos de estudo (animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) apresentaram relação A:G abaixo dos valores de referência, entretanto algumas enzimas avaliadoras da função hepática mantiveram-se dentro dos parâmetros fisiológicos, sendo assim, os resultados deste estudo, demonstraram que a LVC pode levar a alterações nos parâmetros proteicos independentemente da sintomatologia apresentada pelos cães. Já em um estudo publicado por Medeiros, et al.⁷¹ foi realizada a avaliação do perfil hematológico de cães sorologicamente reagentes e não reagentes no exame R.I.F.I., neste, analisaram 290 amostras biológicas, sendo 145 reagentes e 145 não reagentes para R.I.F.I. e, na avaliação da proteína plasmática total foi observado que hiperproteinemia ocorreu em cães sorologicamente reagentes.

Na avaliação sorológica dessa dissertação, não houve nenhum resultado positivo

nos animais avaliados nos testes DPP® e Elisa, entretanto estes testes sorológicos têm ampla faixa de variação em relação à sensibilidade e especificidade e, em sua execução pode haver contaminação de amostras, bem como reações cruzadas com outros agentes etiológicos. Alguns estudos demonstram a sensibilidade e especificidade dos testes DPP® e Elisa, como por exemplo, Lima, et al.⁷² que avaliaram testes imunocromatográficos que utilizam o antígeno rK39 e verificaram uma ampla faixa variável de sensibilidade (72-97%) e especificidade (61-100%). Os resultados do DPP em animais sintomáticos demonstraram sensibilidade de 91,5%, porém em relação aos animais assintomáticos essa sensibilidade apresentou resultado bem menor - 52,9%⁵³. Já em estudo realizado por Moreira (2007) citado por Queiroz-Júnior⁵³ no teste Elisa utilizando o antígeno bruto de *L. chagasi*, foi demonstrada sensibilidade de 95,6% em animais assintomáticos, 87,8% em animais sintomáticos e 68% em animais oligossintomáticos, porém a especificidade foi de 100% em todos os grupos. No teste Elisa, que é utilizado como confirmatório em inquéritos epidemiológicos do Ministério da Saúde, é utilizado um antígeno solúvel e lisado de *Leishmania major-like*, o qual possui sensibilidade de 72% e especificidade de 87,5%⁷³. No ano de 2008, Lemos, et al.⁷⁴ publicaram um estudo comparativo de teste imunocromatográfico rK39 com o Elisa, este foi realizado com 2 cenários: no primeiro foi utilizado soro de cães sem considerar o estágio clínico da doença, neste obtiveram os resultados de sensibilidade para rK39 de 83% e para Elisa 95% e especificidade para os dois testes de 100%; no segundo cenário o soro dos animais foi analisado separando os grupos em assintomático, oligossintomático e sintomático nessa condição o teste Elisa também demonstrou sensibilidade mais alta do que o teste rK39. Com esse estudo os autores acreditaram que, mesmo com a menor sensibilidade do teste rK39 em relação ao Elisa, esse kit diagnóstico é uma importante ferramenta de triagem para o programa de controle de LVC do Ministério da Saúde.

O teste R.I.F.I. realizado nesta dissertação, apresentou um animal positivo (0,6%), porém o mesmo não apresentou demais resultados positivos que pudessem ser correlacionados a esse exame, sendo assim, esse resultado pode ser indicativo de infecção por *Leishmania* ou resultado falso positivo (reação cruzada com outro agente etiológico ou contaminação da reação), o que somente poderá ser confirmado através de exames parasitológicos e acompanhamento clínico deste animal. Para o teste R.I.F.I., alguns dos estudos já realizados reportaram uma ampla faixa variável de sensibilidade; em 2007, em um estudo conduzido por Maia e Campino⁷⁵, testaram animais positivos, sintomáticos e assintomáticos, em uma área endêmica para LVC, e o teste demonstrou 85,5% de sensibilidade e 94,7% de especificidade. Oliveira, et al.⁷⁶ realizaram uma análise comparativa entre os testes sorológicos R.I.F.I. (IFI Bio-Manguinhos), Elisa (EIE Bio-Manguinhos) e DPP® Bio-Manguinhos, para todos os exames foi utilizado soro sanguíneo de cães e, como resultado, puderam observar que a concordância entre EIE e IFI foi de 72,6%; entre EIE e DPP® foi de 74,5% e entre DPP® e IFI de 81,9%. Além disso, 65,8% das amostras apresentaram resultados compatíveis nos 3 exames. Ainda correlacionando os testes sorológicos, DPP®, Elisa e R.I.F.I., Da Costa, et al.⁶⁵ e de Lima, et al.⁷⁷ apresentaram trabalhos que demonstraram essa correlação entre os exames. No estudo de Da Costa, et al.⁶⁵ foram coletadas amostras de 960 cães de seis municípios, com seis diferentes ecossistemas no estado do Maranhão, Brasil. Este estudo resultou com positividade para LVC em 59,1% dos animais no Elisa; 14,5% no DPP® e 13,1% no R.I.F.I., sendo o

ecossistema Amazônia o de maior incidência de animais positivos. No estudo de De Lima, et al.⁷⁷ foram coletados soro sanguíneo de 327 cães residentes dos vilarejos de Urubu Branco e Tapirapé Karajá (tribos indígenas da região Amazônica), áreas não endêmicas e, de todas as amostras analisadas, 13 animais apresentaram positividade no Elisa, dois animais positivos no R.I.F.I. e nenhum positivo no DPP®.

A respeito dos testes sorológicos realizados nesta dissertação (DPP, Elisa e R.I.F.I.), apesar de serem amplamente utilizados como métodos de triagem e diagnóstico primário da Leishmaniose, são testes que possuem uma ampla faixa de variabilidade sobre os parâmetros sensibilidade e especificidade, e essa variação pode ser maior relacionando-a a sintomatologia apresentada pelos animais, sendo assim, não é recomendável o uso de somente um ou dois exames para concluir um diagnóstico positivo ou negativo de Leishmaniose Visceral Canina. O mais indicado é a realização de mais de um exame sorológico associado a exames moleculares e/ ou parasitológicos e correlacionados com a sintomatologia apresentada pelo animal e a área em que ele vive (se endêmica ou não).

Os resultados do PCR ITS indicaram positividade em 1 (um) animal, entretanto, este não apresentou outros exames reagentes, tampouco alterações nas proteínas plasmáticas. Os resultados do estudo realizado por Escobar, et al.⁷⁸ apresentaram eficiência no diagnóstico molecular por PCR, na detecção da presença de DNA do parasita em sangue periférico, com o uso de marcadores moleculares que codificam a região ITS2 das espécies de *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani*, os autores concluem que o uso do PCR ITS2 pode ser uma ferramenta auxiliar no aumento da especificidade dos diagnósticos sorológicos de Leishmaniose. Já em um estudo publicado por Schönian, et al.⁵⁷ verificaram a sensibilidade de duas técnicas diferentes de PCR que amplificaram parte do gene ssu rRNA e o ITS, foram utilizados como amostras sangue humano e canino semeados com promastigotas de *Leishmania*. O gene ssu rRNA-PCR foi mais sensível que o ITS1-PCR, entretanto não foi possível a identificação das espécies. Contudo quando testaram o gene ITS1-PCR aninhado, a sua sensibilidade se igualou à do gene ssu rRNA-PCR e, quando testada a digestão da amplificação do gene ITS1-PCR com a enzima de restrição *HaeIII* foi possível diagnosticar casos de relevância médica.

A despeito da abordagem utilizada acima sobre a associação diagnóstica e correlação entre os exames clínicos e laboratoriais que são realizados para detecção da LVC, Assis, et al.⁷⁹ avaliaram 34 cães da região de Ilha Solteira – SP, com relação à sintomatologia e exames laboratoriais, nesse estudo os cães foram separados em 3 grupos, sendo eles, assintomáticos (apresentavam aparência saudável), oligossintomáticos (até 3 sinais clínicos) e polissintomáticos (cl clinicamente comprometidos) e foram realizados testes sorológicos, molecular e parasitológico. Dos animais assintomáticos 100% apresentaram resultado positivo no PCR; dos cães oligossintomáticos 50% apresentaram resultado positivo nos exames Elisa e R.I.F.I.; 21% apresentaram resultado negativo nos exames e, 29% apresentaram discordância entre esses exames e, no grupo polissintomático 91% dos animais apresentaram resultado positivo nos exames sorológicos e demonstraram diversas lesões dermatológicas. Portanto nesse estudo de Assis, et al.⁷⁹ foi feita uma correlação entre os exames e sinais clínicos, que os levaram a conclusão de que, possivelmente, animais com mais sintomatologia clínica (seja dermatológica ou de órgãos internos) possam ter maior resposta positiva nos exames laboratoriais sorológicos.

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

CONCLUSÃO

Conforme já discutido acima, a LVC é uma doença de alta complexidade diagnóstica, possui uma ampla diversidade de sinais clínicos e os resultados laboratoriais podem divergir, portanto, com os resultados obtidos nos exames físicos, laboratoriais e avaliação proteica, apesar de 2 animais resultarem positivos (R.I.F.I. e PCR), não se pôde concluir que estes são animais positivos para a Leishmaniose Visceral Canina.

Como a ocorrência de resultados laboratoriais positivos e animais com sinais clínicos foi, relativamente baixa e, não houve correlação entre os exames realizados, concluímos até o presente momento que a região estuda pode ser classificada como não endêmica para a doença.

Foi possível relacionar alguns animais com sinais clínicos à queda na relação A:G, porém sem demais exames reagentes, conclui-se, portanto, que os cães citados devem ser avaliados por um médico veterinário quanto a ocorrência de outras doenças.

Desta forma, conclui-se que, os animais que obtiveram resultados positivos ou reagentes e alterações nos exames físicos e proteicos, devem ser monitorados clinicamente e com novos exames, inclusive parasitológicos, para a constatação da real infecção por Leishmaniose Visceral Canina ou outra doença que acarrete prejuízo à saúde destes animais.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
2. Leishmaniasis Fact Sheet [Internet]. World Health Organization, Inc. 2017 – [acesso em 01 jul 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
3. Ilha do Bororé tem mais de 200 animais castrados [Internet]. São Paulo: Prefeitura de São Paulo, Inc. 2016 – [acesso em 04 jul 2017]. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/noticias/?p=216081>.
4. Bairros do Grajaú às margens da *Billings* convivem com esgoto à céu aberto [Internet]. São Paulo: Central Brasileira de Notícias, Inc. 2016 – [acesso em 04 jul 2017]. Disponível em: <http://cbn.globoradio.globo.com/grandescoberturas/seu-bairro-nossa-cidade-sp/2016/08/25/BAIRROS-DO-GRAJAU-AS-MARGENS-DA-BILLINGS-CONVIVEM-COM-ESGOTO-A-CEU-ABERTO.htm>.
5. Populações Canina e Felina [Internet]. São Paulo: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Inc. 2016 – [acesso em 11 jun 2017]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/dados-estatisticos/populacoescaninaefelina2016final.pdf>.
6. World Health Organization (United States of America), Committee on the Control of Leishmaniasis. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting. Geneva: WHO, 2010.
7. Informe de Leishmanioses [Internet]. Washington: 2017, Inc. 2017 – [acesso em 25 jun 2017]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.
8. Leishmaniasis [Internet]. World Health Organization, Inc. 2017 – [acesso em 03 jun 17]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
9. Brasil. Prefeitura de Goiânia. Nota Técnica nº. 013/2011/CIEVS/DE/DVS/SMS. Leishmaniose Visceral [Internet]. Secretaria Municipal de Saúde, Centro de Informações Estratégicas e Resposta em Vigilância em Saúde. 2011 [acesso em 03 jun 2017]. Disponível em: http://www.saude.goiania.go.gov.br/ev_docs/nota_tecnica_leishmaniose.pdf.
10. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
11. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento de Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. 1ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
12. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. [acesso em 10 jun 2017]. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>.
13. Cavalcante IJM, Vale MR. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. Rev. Bras. Epidemiol. 2014 Out-Dez; 17(4): 911-924.
14. Góes MAO, Jeraldo VLS, Oliveira AS. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracajú, Sergipe, Brasil. Rev. Bras. Med. Fam. Comunidade. 2014 Abr-Jun; 9(31): 119-126.

15. São Paulo em alerta contra Leishmaniose [Internet]. São Paulo: Diário Oficial, Inc. 2017 – [acesso em 04 jul 2017]. Disponível em: <https://dhojeinterior.com.br/sao-paulo-em-alerta-contra-leishmaniose/>.
16. Situação Epidemiológica dados [Internet]. São Paulo: Secretaria de Vigilância em Saúde – Portal da Saúde SUS, Inc. 2014 – [acesso em 15 jun 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/sao-paulo/sao-jose-do-rio-preto-aracatuba/noticia/2016/08/aracatuba-registra-mais-de-300-caes-com-leishmaniose- apenas-neste-ano.html>.
17. Cardim MFM, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti F Neto. Introdução e expansão da Leishmaniose Visceral Americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. Rev. Sau. Pública. 2013; 47(4): 691-700.
18. Sevá AP, Mao L, Galvis-Ovallos F, Lima JMT, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. PLOS Negl Trop Dis. 2017 Feb; 11(2).
19. Ciaravolo RMC, Oliveira SS, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Viviani A Jr, et al. Classificação Epidemiológica dos Municípios Segundo o Programa de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo, dezembro de 2014. BEPA. 2015; 12(143): 9-22.
20. Casos de Leishmaniose Canina sobem para 24 em Valinhos [Internet]. São Paulo: Portal Globo-G1; Inc. 2017 [acesso em 05 jul 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/casos-de-leishmaniose-canina-sobem-para-24-em-valinhos-afirma-prefeitura.ghtml>.
21. Araçatuba Registra mais de 300 cães com Leishmaniose apenas neste ano. São Paulo: Portal Globo-G1; Inc. 2016 [acesso 13 jun 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/sao-paulo/sao-jose-do-rio-preto-aracatuba/noticia/2016/08/aracatuba-registra-mais-de-300-caes-com-leishmaniose- apenas-neste-ano.html>.
22. Valinhos confirma 16 casos de leishmaniose canina e tem 114 em investigação; veja cuidados [Internet]. São Paulo: Portal Globo-G1, Inc. 2017 – [acesso em 05 jul 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/valinhos-confirma-16-casos-de-leishmaniose-canina-e-tem-114-em-investigacao-veja-cuidados.ghtml>.
23. Campinas e Indaiatuba confirmam casos de leishmaniose em cães; um morreu [Internet]. São Paulo: Portal Globo-G1, Inc. 2017 – [acesso em 18 jul 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/campinas-e-indaiatuba-confirmam-casos-positivos-de-leishmaniose-em-caes-e-uma-morte.ghtml>.
24. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Sevá AP, Galati EAB. Ecological parameters of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis* complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. Parasites & Vectors. 2017; 10:269.
25. D'Andrea LAZ, Fonseca ES, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN, et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its special dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. BMC Veterinary Research. 2015; 11:273.
26. Galati EAB. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF & Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p.179-82.
27. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Checklist of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) from São Paulo State, Brazil, with notes on their geographical distribution. Biota Neotrop. 2011 Jan-Dez; 11(1).
28. Galvis-Ovallos F, Silva MD, Bispo GBS, Oliveira AG, Neto JRG, Malafronte RS et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. Parasite. 2017; 24(2).

29. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and Geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west indies, central and south America (Diptera: Psychodidae). Mem. Amer. Ent. Inst. 1994; 54.
30. Lainson R. The neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev. Pan-Amaz Saúde. 2010; 1(2):13-32.
31. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternative vector of *Leishmania chagasi* in Colombian focus of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1990 Sep-Oct; 84(5): 676-7.
32. Feliciangeli MD, Rodriguez N, De Guglielmo Z, Rodriguez A. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. Parasite. 1999; 6: 113-120.
33. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology. 1988; 12: 315-317.
34. Steverding D. The history of leishmaniasis. Parasites & Vectors. 2017; 10:82.
35. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. JAVMA. 2010 Jun; 236(11): 1184-1191.
36. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasite & Vectors. 2011; 4(86): 1-16.
37. Baneth G. Canine Leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology. 2008; 24(7).
38. Santaella J, Ocampo CB, Saravia NG, Mendez F, Góngora R, Gomez MA, et al. *Leishmania* (Viannia) infection in Domestic Dog in Chaparral, Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2011; 84(5): 674-680.
39. Sasani F, Javanbakht J, Samani R, Shirani D. Canine cutaneous leishmaniasis. J.Parasit. Dis. 2014 [acesso em 28 nov 2015]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815869/>.
40. Metzendorf IP, Lima Jr MSC, Matos MFC, Souza Filho AF, Tsujisaki RAS, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. Acta Tropica. 2016 [acesso em 15 jun 2017]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.013>.
41. Silva FS. Patologia e Patogênese da leishmaniose visceral canina. Rev. Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. 2007; 1(1): 20-31.
42. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. Rev. Cubana de Medicina Tropical. 2012; 64(2): 108-131.
43. Noli C. Canine leishmaniasis. Waltham Focus. 1999; 9(2): 16-24.
44. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology. 2009; 165: 1-18.

45. Thrall MA. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. In: Seção 1 – Princípios Gerais sobre Exames e Diagnósticos Laboratoriais. 1 ed. São Paulo: Roca; 2007. p.3-51.
46. Kataoka A, Santana AE, Seki MC. Alterações do proteinograma sérico em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. ARS Veterinária. 2006; 22(2): 98-102.
47. Ettinger Sj, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do cão e do gato. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004. 2256p.
48. Castro IP, Sousa MVC, Magalhães GM, Mundim AV, Noleto PG, Paula MBC, et al. Perfil hepático e proteico em cães com leishmaniose visceral. Biosci. J. 2012; 28(5): 799-804.
49. Brasil. Governo do Distrito Federal. Nota Técnica nº. 01/2011. Trata da identificação do inseto, vetor da Leishmaniose visceral/ calazar, no Plano Piloto de Brasília [Internet]. Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal. 2011 [acesso em 03 jun 2017]. Disponível em: http://www.saude.df.gov.br/images/nota_tecnica/NOTA_TECNICA_2011_Leishmaniose_visceral.pdf.
50. Dual Path Platform [Internet]. Estados Unidos da América: Chembio Diagnostic System, Inc. 2006 – [acesso em 05 jun 2017]. Disponível em: <http://chembio.com/innovation/platforms/dual-path-platform/>.
51. DPP® Leishmaniose Canina [Internet]. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2014 – [acesso em 10 jun 2017]. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reactivos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>.
52. Burns JMJr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalibt HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993 Jan; 90: 775-779
53. Queiróz EMJr. Validação do teste imunocromatográfico rápido *Dual Path Platform* para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina [dissertação]. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária; 2011. 53p.
54. Leishmaniose Canina [Internet]. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2014 – [acesso em 10 jun 2017]. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/reactivos/ensaios-sorologicos/imunoenzimatico/leishmaniose-canina>.
55. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Leal GGA, Moreira ND, Oliveira LAM, et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. Plos One. 2014; 9(3):e91009.
56. Faria AR, Andrade HM. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina: grandes avanços tecnológicos e de baixa aplicação prática. Rev. Pan-Amz. Saúde. 2012; 3(2): 47-57.
57. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; 47: 349-358.
58. São Paulo (Cidade) [Internet]. São Paulo: Wikipédia, 2015 – [acesso em 07 nov 2015]. Disponível em: [https://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%A3o_Paulo_\(cidade\)#Geografia](https://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%A3o_Paulo_(cidade)#Geografia).
59. Grajaú [Internet]. São Paulo: SP Bairros, 2013 – [acesso em 27 dez 2016]. Disponível em: <http://www.spbairros.com.br/grajau/>.
60. Garajau [Internet]. São Paulo: DICIO, 2009 – [acesso em 05 jun 2017]. Disponível em: <https://www.dicio.com.br/garajau/>.

61. Área de proteção ambiental Bororé-Colônia [Internet]. São Paulo, 2015 – [acesso em 27 dez 2016]. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/unid_de_conservacao/apa_bororecolonia/index.php?p=41963.
62. Brasil. Portaria Interministerial nº 1.426, de 14 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008 jul 14 [acesso em 15 nov 2015]. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1485867168>.
63. Brasil. Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, de 01 de setembro de 2016. Autoriza o registro do produto Milteforan de propriedade da empresa Virbac Saúde Animal [Internet]. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016 set 01 [acesso em 05 jun 2017]. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>.
64. Bush BM. Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2004.
65. Da Costa AP, Costa FB, Soares HS, Ramirez DG, Araújo AC, Ferreira JIGS, et al. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015; 15(12): 765-773.
66. Leishmaniose EIE – Leishmaniose Visceral Canina / Ensaio Imunoenzimático (EIE). Adenauer Cruz Teixeira. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos; 2008. Bula de Kit Diagnóstico.
67. Oliveira TMFS, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ. A study of cross-reactivity in sérum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbente assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2008; 17(1): 7-11.
68. IFI Leishmaniose Visceral Canina – Imunofluorescência indireta (IFI). Adenauer Cruz Teixeira. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos; 2008. Bula de Kit Diagnóstico.
69. Ghasemloo H, Rasti S, Delavari M, Doroodgar A. Molecular Diagnosis of Clinical Isolates of Cutaneous Leishmaniasis Using ITS1 and kDNA genes and Genetic Polymorphism of *Leishmania* in Kashan, Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* 2016; 19(3): 136-142.
70. Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM, Nascimento LFM, Mendes-Sousa AF, Pinho FA, et al. Scoring clinical can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic área in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2017; 112(1): 53-62.
71. Medeiros CMO, Melo AGC, Lima AKF, Silva ING, Oliveira LC, Silva MC. Perfil hematológico de cães com Leishmaniose Visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal.* 2008; 18(1): 43-50.
72. Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Silveira L Neto, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* 2010; 173: 330-333.
73. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, Abath FGC, et al. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology.* 2006; 137: 11-16.
74. Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC Raychaudhuria S, et al. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica.* 2008; 107: 205-207.

75. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and imuno response to infection. *Veterinary Parasitology*. 2008; 158: 274-287.
76. Oliveira AP, Freire MP, Hiramoto RM, Tolezano JE, Castellão KG, Taniguchi HH, et al. Análise comparativa de três diferentes testes sorológicos empregados na detecção da leishmaniose visceral em cães. *Revista Saúde*. 2010; 4.
77. De Lima JTR, Gennari SM, Soares HS, Minervino AHH, Malheiros AF, Marques FS, et al. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2017 Jan-Feb; 50(1): 61-66.
78. Escobar TA, Porcela F, Noro M, Picolli J, Lübeck I, Manfredini V. Utilização de marcadores moleculares da região ITS2 na identificação de leishmaniose visceral canina. In: *Anais do 8° Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2016; Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Pampa; 2016.
79. Assis J, Queiroz NMGP, Silveira RCV, Nunes CM, Oliveira TMFS, Noronha ACF Jr, et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010; 19(1): 17-25.
80. Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Acunha E, Santos AA, Spessoto M Jr, et al. Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2007; 66(2): 185-193.
81. Curi NHA, Paschoal AMO, Massara RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani M, et al. Factors Associated with the Seroprevalence of Leishmaniasis in Dogs Living around Atlantic Forest Fragments. *Plos One*. 2014 Aug; 9(8): e104003.
82. Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto IS, Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on the Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012; 106: 54-59.
83. Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. *Bepa*. 2009; 6(67): 13-23.
84. Laurenti MD, Santana L Jr, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in área of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2014; 205:444-450.
85. Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasite & Vectors*. 2011; 4(57).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

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

Nome do pesquisador principal: Letícia Maria Molla

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

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

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

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

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

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

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

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

Equipe: UNISA Programa de Pós-Graduação

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

Declaração de consentimento

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

_____, ____/____/____

Pesquisador: _____

Responsável: _____

Nome: _____

Nome: _____

Documento de identidade: _____

Documento de Identidade: _____

Telefone: _____

Identificação do animal

Identificação do animal

Nome: _____

Nome: _____

Microchip: _____

Microchip: _____

Espécie: canina

Espécie: canina

Raça: _____

Raça: _____

Idade: _____

Idade: _____

Macho () Fêmea ()

Macho () Fêmea ()

Identificação do animal

Identificação do animal

Nome: _____

Nome: _____

Microchip: _____

Microchip: _____

Espécie: canina

Espécie: canina

Raça: _____

Raça: _____

Idade: _____

Idade: _____

Macho () Fêmea ()

Macho () Fêmea ()

APÊNCIDE B – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

MAPA DERMATOLÓGICO DE AVALIAÇÃO DE LESÕES EM CÃES

PROJETO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE

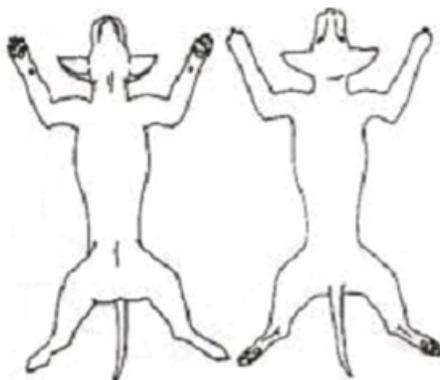
NOME DO ANIMAL: _____ IDADE: _____ RAÇA: _____

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

TEL: _____

Data do atendimento: ____/____/____

Local de lesões ou prurido



Avaliação de lesões nos animais:

| | | | | | | |
|-----------|--------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Alopecia | Oncoliríose | Dermatite escfoliativa | Dermatite ulceroativa | Dermatite nodular | Dermatite papular | Dermatite pustular |
| | | | | | | |
| Blefarite | Ceratoconjuntivite | Uveíte | Atrofia muscular | Linfadenomegalia | Lesões mucosas | Calvície, mucosas |
| | | | | | | |

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

Avaliação do escore corporal:



APÊNDICE C – TABELAS DE RESULTADOS DOS EXAMES DPP® E ELISA

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

| | | | | |
|-----|----|----|----------|----|
| 51 | NR | NR | 0,871806 | NR |
| 52 | NR | NR | 0,733962 | NR |
| 57 | NR | NR | 1,155256 | NR |
| 58 | NR | NR | 2,020854 | NR |
| 59 | NR | NR | 2,072182 | NR |
| 60 | NR | NR | 1,152559 | NR |
| 64 | NR | NR | 0,955807 | NR |
| 65 | NR | NR | 0,388553 | NR |
| 68 | NR | NR | 0,898736 | NR |
| 69 | NR | NR | 1,293408 | NR |
| 70 | NR | NR | 0,282482 | NR |
| 72 | NR | NR | 1,221056 | NR |
| 73 | NR | NR | 0,288561 | NR |
| 74 | NR | NR | 0,560502 | NR |
| 75 | NR | NR | 0,832927 | NR |
| 114 | NR | NR | 0,996429 | NR |
| 122 | NR | NR | 0,052243 | NR |
| 125 | NR | NR | 0,734803 | NR |

NR = Não Reagente.

Tabela 5 - Exame DPP e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Ilha do Bororé na data de 09/04/2016.

| R. Gaivotas do Céu - Grajaú 18/06/16 | | | | |
|---|--------------------------------|---------------|---------------------|------------------|
| Amostra | DPP® (cut-off 5,000000) | | | Elisa |
| | Visual | Reader | Concentração | Resultado |
| 2 | NR | NR | 0,476002 | NR |
| 3 | NR | NR | 0,614081 | NR |
| 4 | NR | NR | 0,387994 | NR |
| 12 | NR | NR | 0,584334 | NR |
| 18 | NR | NR | 0,349411 | NR |
| 22 | NR | NR | 0,022523 | NR |
| 26 | NR | NR | 0,103496 | NR |
| 27 | NR | NR | 0,049252 | NR |
| 28 | NR | NR | 0,203444 | NR |
| 36 | NR | NR | 0,962785 | NR |
| 42 | NR | NR | 0,699456 | NR |
| 43 | NR | NR | 0,014524 | NR |
| 46 | NR | NR | 1,521582 | NR |
| 47 | NR | NR | 0,874375 | NR |
| 48 | NR | NR | 0,854435 | NR |
| 49 | NR | NR | 0,241655 | NR |

| | | | | |
|-----|----|----|----------|----|
| 50 | NR | NR | 3,710754 | NR |
| 51 | NR | NR | 0,627839 | NR |
| 56 | NR | NR | 1,280124 | NR |
| 58 | NR | NR | 0,669339 | NR |
| 76 | NR | NR | 0,668795 | NR |
| 77 | NR | NR | 0,373172 | NR |
| 78 | NR | NR | 0,012109 | NR |
| 79 | NR | NR | 0,214523 | NR |
| 80 | NR | NR | 0,925250 | NR |
| 81 | NR | NR | 0,563994 | NR |
| 83 | NR | NR | 1,115938 | NR |
| 84 | NR | NR | 0,687286 | NR |
| 89 | NR | NR | 0,337682 | NR |
| 93 | NR | NR | 0,094322 | NR |
| 94 | NR | NR | 1,803771 | NR |
| 95 | NR | NR | 0,268285 | NR |
| 97 | NR | NR | 0,293357 | NR |
| 105 | NR | NR | 0,376572 | NR |
| 106 | NR | NR | 0,753374 | NR |
| 107 | NR | NR | 0,910162 | NR |
| 108 | NR | NR | 0,484153 | NR |
| 110 | NR | NR | 0,924850 | NR |
| 111 | NR | NR | 0,310706 | NR |
| 114 | NR | NR | 0,965914 | NR |
| 115 | NR | NR | 0,357969 | NR |
| 116 | NR | NR | 0,224352 | NR |
| 118 | NR | NR | 0,716077 | NR |
| 119 | NR | NR | 0,221173 | NR |
| 122 | NR | NR | 1,880618 | NR |
| 123 | NR | NR | 0,375452 | NR |
| 127 | NR | NR | 1,005416 | NR |
| 128 | NR | NR | 0,053534 | NR |
| 129 | NR | NR | 0,570490 | NR |
| 130 | NR | NR | 0,433946 | NR |
| 131 | NR | NR | 1,295316 | NR |
| 132 | NR | NR | 0,027034 | NR |
| 139 | NR | NR | 0,461518 | NR |
| Bel | NR | NR | 1,764989 | NR |

NR = Não Reagente.

Tabela 6 - Exame DPP e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Rua Gaivotas do Céu (Grajaú) na data de 18/06/2016.

Travessa Acácia-Mimosa - Grajaú
13/08/16

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

| | | | | |
|-----|----|----|----------|----|
| 98 | NR | NR | 0,552112 | NR |
| 100 | NR | NR | 0,475401 | NR |
| 112 | NR | NR | 0,129731 | NR |
| 113 | NR | NR | 0,916654 | NR |
| 117 | NR | NR | 0,464550 | NR |
| 143 | NR | NR | 0,392267 | NR |
| 144 | NR | NR | 0,31554 | NR |
| 145 | NR | NR | 0,197653 | NR |
| 146 | NR | NR | 1,050267 | NR |

Tabela 7 - Exame DPP e Elisa. Resultados obtidos dos animais coletados na Travessa Acácia-Mimososa (Grajaú) na data de 13/08/2016.

APÊNDICE D – TABELA DE RESULTADOS DO EXAME R.I.F.I.

| Ilha do Bororé 09/04/16 | | R. Gaivotas do Céu 18/06/16 | | Travessa Acácia-Mimososa 13/08/16 | |
|----------------------------|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
| Am | PCR ITS | Am | PCR ITS | Am | PCR ITS |
| 1 | Negativo | 2 | Negativo | 3 | Negativo |
| 2 | Negativo | 3 | Negativo | 5 | Negativo |
| 3 | Negativo | 4 | Negativo | 6 | Negativo |
| 4 | Negativo | 12 | Negativo | 16 | Negativo |
| 5 | Negativo | 18 | Negativo | 21 | Negativo |
| 6 | Negativo | 22 | Negativo | 22 | Negativo |
| 7 | Negativo | 26 | Negativo | 23 | Negativo |
| 9 | Negativo | 27 | Negativo | 24 | Negativo |
| 10 | Negativo | 28 | Negativo | 26 | Negativo |
| 13 | Negativo | 36 | Negativo | 27 | Negativo |
| 14 | Negativo | 42 | Negativo | 30 | Negativo |
| 15 | Negativo | 43 | Negativo | 31 | Negativo |
| 16 | Negativo | 46 | Negativo | 34 | Negativo |
| 17 | Negativo | 47 | Negativo | 35 | Negativo |
| 18 | Negativo | 48 | Negativo | 37 | Negativo |
| 19 | Negativo | 49 | Negativo | 41 | Negativo |
| 21 | Negativo | 50 | Negativo | 46 | Negativo |
| 22 | Negativo | 51 | Negativo | 47 | Negativo |
| 23 | Negativo | 56 | Negativo | 48 | Negativo |
| 24 | Negativo | 58 | Negativo | 50 | Negativo |
| 25 | Negativo | 76 | Negativo | 53 | Negativo |
| 27 | Negativo | 77 | Negativo | 58 | Negativo |
| 30 | Negativo | 78 | Negativo | 59 | Negativo |
| 31 | Negativo | 79 | Negativo | 60 | Negativo |

| | | | | | |
|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| 32 | Negativo | 80 | Negativo | 61 | Negativo |
| 33 | Negativo | 81 | Negativo | 62 | Negativo |
| 34 | Negativo | 83 | Negativo | 64 | Negativo |
| 35 | Negativo | 84 | Negativo | 68 | Negativo |
| 36 | Negativo | 89 | Negativo | 70 | Negativo |
| 37 | Negativo | 93 | Negativo | 71 | Positivo |
| 38 | Negativo | 94 | Negativo | 73 | Negativo |
| 39 | Negativo | 95 | Negativo | 75 | Negativo |
| 41 | Negativo | 97 | Negativo | 82 | Negativo |
| 42 | Negativo | 105 | Negativo | 85 | Negativo |
| 43 | Negativo | 106 | Negativo | 92 | Negativo |
| 51 | Negativo | 107 | Negativo | 95 | Negativo |
| 52 | Negativo | 108 | Negativo | 96 | Negativo |
| 57 | Negativo | 110 | Negativo | 98 | Negativo |
| 58 | Negativo | 111 | Negativo | 100 | Negativo |
| 59 | Negativo | 114 | Negativo | 112 | Negativo |
| 60 | Negativo | 115 | Negativo | 113 | Negativo |
| 64 | Negativo | 116 | Negativo | 117 | Negativo |
| 65 | Negativo | 118 | Negativo | 143 | Negativo |
| 68 | Negativo | 119 | Negativo | 144 | Negativo |
| 69 | Negativo | 122 | Negativo | 145 | Negativo |
| 70 | Negativo | 123 | Negativo | 146 | Negativo |
| 72 | Negativo | 127 | Negativo | | |
| 73 | Negativo | 128 | Negativo | | |
| 74 | Negativo | 129 | Negativo | | |
| 75 | Negativo | 130 | Negativo | | |
| 114 | Negativo | 131 | Negativo | | |
| 122 | Negativo | 132 | Negativo | | |
| 125 | Negativo | 139 | Negativo | | |
| | | Bel | Negativo | | |

Am = Amostra.

Tabela 8 - Exame R.I.F.I. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.

APÊNDICE E – TABELA DE RESULTADOS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

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

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------|------|-----|------|------|-------|-----|------|------|-------|
| 52 | 2,16 | 4,64 | 0,46 | 108 | 5,08 | 2,28 | 2,22 | 96 | 4,41 | 0,39 | 11,30 |
| 57 | 2,82 | 3,98 | 0,70 | 110 | 2,80 | 4,80 | 0,58 | 98 | 2,16 | 3,24 | 0,66 |
| 58 | 2,86 | 3,94 | 0,72 | 111 | 3,67 | 0,33 | 11,12 | 100 | 4,37 | 0,43 | 10,16 |
| 59 | 3,63 | 0,57 | 6,36 | 114 | 2,65 | 4,15 | 0,63 | 112 | 2,59 | 3,01 | 0,86 |
| 60 | 2,71 | 3,89 | 0,69 | 115 | 3,43 | 2,97 | 1,15 | 113 | 3,46 | 2,14 | 1,61 |
| 64 | 3,11 | 2,89 | 1,07 | 116 | 4,38 | 4,42 | 0,99 | 117 | 2,83 | 2,97 | 0,95 |
| 65 | 3,46 | 2,54 | 1,36 | 118 | 3,84 | 1,16 | 3,31 | 143 | 4,19 | 1,21 | 3,46 |
| 68 | 2,98 | 2,02 | 1,47 | 119 | 3,79 | 2,41 | 1,57 | 144 | 5,02 | 0,18 | 27,88 |
| 69 | 3,37 | 2,63 | 1,28 | 122 | 3,18 | 4,22 | 0,75 | 145 | 4,20 | 2,40 | 1,75 |
| 70 | 3,10 | 1,90 | 1,63 | 123 | 2,72 | 1,88 | 1,44 | 146 | 4,65 | 1,15 | 4,04 |
| 72 | 3,34 | 2,66 | 1,25 | 127 | 3,64 | 3,16 | 1,15 | | | | |
| 73 | 2,94 | 2,66 | 1,10 | 128 | 3,48 | 2,72 | 1,27 | | | | |
| 74 | 3,45 | 2,95 | 1,16 | 129 | 3,56 | 2,64 | 1,34 | | | | |
| 75 | 3,08 | 1,72 | 1,79 | 130 | 4,68 | 1,12 | 4,17 | | | | |
| 114 | 2,09 | 6,71 | 0,31 | 131 | 3,20 | 2,00 | 1,60 | | | | |
| 122 | 3,10 | 1,70 | 1,82 | 132 | 3,51 | 3,29 | 1,06 | | | | |
| 125 | 3,39 | 3,41 | 0,99 | 139 | 2,93 | 2,87 | 1,02 | | | | |
| | | | | Bel | 4,21 | 1,79 | 2,35 | | | | |

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

Tabela 9 - Exame de Proteínas Plasmáticas. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.

APÊNDICE F – TABELA DE RESULTADOS DE PCR

| Ilha do Bororé 09/04/16 | | R. Gaivotas do Céu 18/06/16 | | Travessa Acácia-Mimosa 13/08/16 | |
|----------------------------|----------|--------------------------------|----------|------------------------------------|----------|
| Am | PCR ITS | Am | PCR ITS | Am | PCR ITS |
| 1 | Negativo | 2 | Negativo | 3 | Negativo |
| 2 | Negativo | 3 | Negativo | 5 | Negativo |
| 3 | Negativo | 4 | Negativo | 6 | Negativo |
| 4 | Negativo | 12 | Negativo | 16 | Negativo |
| 5 | Negativo | 18 | Negativo | 21 | Negativo |
| 6 | Negativo | 22 | Negativo | 22 | Negativo |
| 7 | Negativo | 26 | Negativo | 23 | Negativo |
| 9 | Negativo | 27 | Negativo | 24 | Negativo |
| 10 | Negativo | 28 | Negativo | 26 | Negativo |
| 13 | Negativo | 36 | Negativo | 27 | Negativo |
| 14 | Negativo | 42 | Negativo | 30 | Negativo |
| 15 | Negativo | 43 | Negativo | 31 | Negativo |

| | | | | | |
|----|----------|-----|----------|-----|----------|
| 16 | Negativo | 46 | Negativo | 34 | Negativo |
| 17 | Negativo | 47 | Negativo | 35 | Negativo |
| 18 | Negativo | 48 | Negativo | 37 | Negativo |
| 19 | Negativo | 49 | Negativo | 41 | Negativo |
| 21 | Negativo | 50 | Negativo | 46 | Negativo |
| 22 | Negativo | 51 | Negativo | 47 | Negativo |
| 23 | Negativo | 56 | Negativo | 48 | Negativo |
| 24 | Negativo | 58 | Negativo | 50 | Negativo |
| 25 | Negativo | 76 | Negativo | 53 | Negativo |
| 27 | Negativo | 77 | Negativo | 58 | Negativo |
| 30 | Negativo | 78 | Negativo | 59 | Negativo |
| 31 | Negativo | 79 | Negativo | 60 | Negativo |
| 32 | Negativo | 80 | Negativo | 61 | Negativo |
| 33 | Negativo | 81 | Negativo | 62 | Negativo |
| 34 | Negativo | 83 | Negativo | 64 | Negativo |
| 35 | Negativo | 84 | Negativo | 68 | Negativo |
| 36 | Negativo | 89 | Negativo | 70 | Negativo |
| 37 | Negativo | 93 | Negativo | 71 | Negativo |
| 38 | Negativo | 94 | Negativo | 73 | Negativo |
| 39 | Negativo | 95 | Negativo | 75 | Negativo |
| 41 | Negativo | 97 | Negativo | 82 | Negativo |
| 42 | Negativo | 105 | Negativo | 85 | Negativo |
| 43 | Negativo | 106 | Negativo | 92 | Positivo |
| 51 | Negativo | 107 | Negativo | 95 | Negativo |
| 52 | Negativo | 108 | Negativo | 96 | Negativo |
| 57 | Negativo | 110 | Negativo | 98 | Negativo |
| 58 | Negativo | 111 | Negativo | 100 | Negativo |
| 59 | Negativo | 114 | Negativo | 112 | Negativo |
| 60 | Negativo | 115 | Negativo | 113 | Negativo |
| 64 | Negativo | 116 | Negativo | 117 | Negativo |
| 65 | Negativo | 118 | Negativo | 143 | Negativo |
| 68 | Negativo | 119 | Negativo | 144 | Negativo |
| 69 | Negativo | 122 | Negativo | 145 | Negativo |
| 70 | Negativo | 123 | Negativo | 146 | Negativo |
| 72 | Negativo | 127 | Negativo | | |
| 73 | Negativo | 128 | Negativo | | |
| 74 | Negativo | 129 | Negativo | | |

| | | | | |
|-----|----------|-----|----------|--|
| 75 | Negativo | 130 | Negativo | |
| 114 | Negativo | 131 | Negativo | |
| 122 | Negativo | 132 | Negativo | |
| 125 | Negativo | 139 | Negativo | |
| | | Bel | Negativo | |

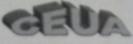
Am = Amostra.

Tabela 10 - Exame PCR ITS. Resultados obtidos dos animais atendidos nos três locais de coleta.

APÊNDICE G – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



UNISA
Universidade
de Santo Amaro



CEUA
UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais

PARECER N.05 /2016

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

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Jonas Moraes Filho
Leticia Maria Molla

Curso: Mestrado em Bem Estar animal

Prezado Pesquisador:

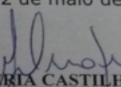
Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

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

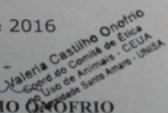
*** Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

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

São Paulo, 12 de maio de 2016



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



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

SOBRE OS AUTORES

LETÍCIA MARIA MOLLA - Médica-veterinária graduada pela Universidade Metodista de SP, Farmacêutica graduada pela universidade Camilo Castelo Branco, Mestre em Medicina e Bem Estar Animal pela Universidade de Santo Amaro e Mestranda em Direção e Gestão de Empresas pela ENEB (Escola de Negócios de Barcelona). Atuante na indústria farmacêutica desde 2007 e com sólida experiência nas áreas: comercial, marketing, pesquisa e desenvolvimento e regulatório. Atuou por anos com atendimento clínico e cirúrgico de pequenos animais e pets exóticos em clínicas e hospitais veterinários. Atualmente assume o cargo de Gerente de P&D na Botupharma (indústria veterinária de produtos para reprodução, farmacêuticos e suplementos alimentares para pets e animais de produção). Possui 6 publicações, sendo estas 1 em revista, 1 em Anais de Congresso e 4 em apresentação de Congressos. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2029909045941721>

JONAS MORAES FILHO- Médico-veterinário graduado pela Universidade Federal do Mato Grosso e Mestrado, Doutorado e Pós Doutorado pela Universidade de São Paulo (FMVZ). Atuante como docente na Universidade de Santo Amaro, cursos de pós graduação Stricto Sensu e graduação de Medicina Veterinária, docente na Faculdade Anclivepa, graduação em Medicina Veterinária e professor no curso de Capacitação Veterinária da Provet Medicina Diagnóstica. Possui diversos prêmios por seus trabalhos apresentados em Simpósios e eventos científicos. Possui 84 Artigos publicados em periódicos (de 2006 a 2021), 1 capítulo de livro (2021), 7 Magazines (de 2004 a 2021) e 94 trabalhos publicados em anais de eventos (de 2004 a 2021). Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3379948777583198>



www.atenaeditora.com.br 
contato@atenaeditora.com.br 
[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 
www.facebook.com/atenaeditora.com.br 

**Avaliação diagnóstica de
Leishmaniose visceral canina
em animais provenientes da
zona sul de São Paulo/ SP –
participantes de campanha
de esterilização cirúrgica**



GUAYAQUIL

BRASILIA

HORIZONTE

SÃO PAULO

ASUNCIÓN

CURITIBA

www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



@atenaeditora



www.facebook.com/atenaeditora.com.br



CORDOBA

ROSARIO



**Avaliação diagnóstica de
Leishmaniose visceral canina
em animais provenientes da
zona sul de São Paulo/ SP -
participantes de campanha
de esterilização cirúrgica**

