

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

THIAGO ANDRÉ SANTOS DE ANDRADE

**SOROPREVALÊNCIA, FATORES E ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM GOIANA, ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

RECIFE

2014

THIAGO ANDRÉ SANTOS DE ANDRADE

**SOROPREVALÊNCIA, FATORES E ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM GOIANA, ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Co-orientador: Dr. Filipe Dantas-Torres

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A553s

Andrade, Thiago André Santos de.

Soroprevalência, fatores e aspectos clínicos associados à leishmaniose visceral canina em Goiana, Estado de Pernambuco, Brasil / Thiago André Santos de Andrade. - Recife: [s.n.], 2014.

69 p. : ilus., graf.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Sinval Pinto Brandão Filho, Filipe Dantas-Torres.

1. *Leishmania infantum*. 2. Leishmaniose Visceral - epidemiologia. 3. Fatores de risco. 4. Cães. 5. Sinais e sintomas. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Torres, Filipe Dantas. III. Título.

CDU 616.993.161

THIAGO ANDRÉ SANTOS DE ANDRADE

**SOROPREVALÊNCIA, FATORES E ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM GOIANA, ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: 30 de maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dr^a. Zulma Maria de Medeiros
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

AGRADECIMENTOS

'Até aqui nos Ajudou o Senhor' (I Sm 7:12). Obrigado Deus!

À minha família, em especial aos meus avós (Damião e Irene) e à minha mãe (Eliane) por todo amor e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Aos meus orientadores Dr. Sinval Pinto Brandão-Filho e Dr. Filipe Dantas-Torres pela paciência, dedicação e ensinamentos compartilhados.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida da Gloria Faustino, por todo apoio e amizade.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pelas contribuições dadas à minha trajetória acadêmica. Bem como a todos os professores/pesquisadores que compõem o quadro discente do Programa de Biociências e Biotecnologia (BBS).

Aos amigos Camylla Melo, Camila Carvalho, Diego, Elisa, Lígia, Viviane e Vanessa.

A todos do Departamento de Imunologia do CPqAM-Fiocruz, em especial a Dr. Roberto, Fábria e Lilian por todo apoio, palavras de incentivo e momentos de descontração.

Aos meus amigos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial a Cristiane, Gisele, Silvia, Jeine, e Ivanise por sempre me acolherem tão bem.

À toda equipe do Serviço de Referência em Leishmanioses do CPqAM-Fiocruz, em especial à Dr^a. Edileuza, Dr^a. Milena, Dr. Eduardo, Kyldman, Valéria, Luana, Abilene, Júnior, Suênia, Rayana, Kamila, Fernando e Francisco pela amizade e momentos de aprendizado e cooperação.

À equipe do Serviço de Referência em Doenças de Chagas do CPqAM-Fiocruz, pelo convívio harmônico e pela amizade, em especial a Dra. Virgínia, Suelen, Karina, Amanda e Patrícia.

À Dra. Daniele Van-Lume pela colaboração na realização dos testes sorológicos.

À Prefeitura Municipal de Goiana-PE por ter acreditado em nosso projeto e ter colaborado para a sua execução do mesmo.

À equipe que bravamente participou comigo das coletas em especial à Dr^a. Luciana Figueiredo, Kyldman, Jonatas, Jorge e Penha. Foram momentos árduos, mas gratificantes!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), na qual fui bolsista durante a realização deste mestrado.

À população do Município de Goiana, em especial de Atapuz, Tejucupapo e Pontas de Pedra que cordialmente aceitaram participar deste estudo. E por fim, serei eternamente grato a todos os cães que participaram desta pesquisa. Obrigado!

“Você conhece o coração de um homem já na forma como ele trata os animais”

(Immanuel Kant, 1724-1804)

ANDRADE, Thiago André Santos. **Soroprevalência, fatores e aspectos clínicos associados à leishmaniose visceral canina em Goiana, Estado de Pernambuco, Brasil.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, principalmente por *Leishmania infantum*. A epidemiologia da doença varia de região para região e o entendimento dos fatores associados à infecção em cães pode ajudar na elaboração de medidas de controle mais específicas. O diagnóstico sorológico da infecção sofreu mudanças importantes nos últimos anos com a introdução do TR-DPP[®] e do estabelecimento de novos critérios de diagnóstico (TR-DPP[®] + EIE-LVC) pelo Ministério da Saúde. Dentro desse contexto, no presente estudo objetivou-se estudar a epidemiologia da LVC no município de Goiana, estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Para tal, realizaram-se testes sorológicos (TR-DPP[®] e EIE-LVC) e análise clínico-epidemiológica em 360 cães semi e domiciliados, de ambos os sexos, raças e idades variadas, nos distritos de Atapuz, Tejucupapo e Pontas de Pedra no referido município. No TR-DPP[®] 47 (13,1%) animais foram reagentes, onde se observou associação significativa dos resultados com os seguintes sinais clínicos: alopecia, lesões na pele, paresia e linfonomegalia. Já no EIE-LVC 21 (5,8%) animais foram reagentes, havendo associação significativa entre a classificação clínica dos animais, condição corporal, alopecia, lesões na pele, secreção ocular, paresia e linfonomegalia. Já de acordo com o critério do Ministério da Saúde do Brasil, apenas 15 (4,2%) animais foram classificados como positivos. De fato, verificou-se uma fraca concordância ($Kappa = 0,39$) entre os dois testes sorológicos. Conclui-se que a LVC encontra-se estabelecida em Goiana e que o uso do TR-DPP[®] como teste de triagem e do EIE-LVC como teste confirmatório pode levar a perda de cães infectados, uma vez que cães positivos do TR-DPP[®] são negativos no EIE-LVC e vice-versa.

Palavras-chaves: *Leishmania infantum*, leishmaniose visceral – epidemiologia, fatores de risco, cães, sinais e sintomas.

ANDRADE, Thiago Andre Santos. **Prevalence, clinical features and factors associated with canine visceral leishmaniasis in Goiana, Pernambuco State, Brazil.** 2014. Dissertation (Master's degree in Bioscience and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CanL) is a parasitic disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, mostly by *Leishmania infantum*. The disease epidemiology varies from region to region, and the knowledge about associated factors with the infection in dogs may assist in the development of more specific control measures. The serological diagnosis of the infection in Brazil experienced important changes in recent years, such as the introduction of a rapid test (TR-DPP[®]) and the establishment of new diagnostic criteria by Brazilian Ministry of Health. In this context, the present study aimed to study the epidemiology of CanL in Goiana city, Pernambuco State, northeastern of Brazil. Therefore, serological tests (the rapid test TR-DPP[®] and the enzyme-linked immunosorbent assay-based kit EIE-LVC) and clinical-epidemiological analysis were conducted on 360 dogs of both sexes, different breeds and ages, at the districts of Atapuz, Tejucupapo and Pontas de Pedra. Forty-seven animals (13.1%) were reactive at TR-DPP[®], with positivity being significantly associated with clinical signs such as alopecia, skin lesions, paresis and lymphadenopathy. On the other hand, 21 dogs (5.8%) were EIE-LVC-positive, with significant association with clinical signs such as alopecia, skin lesions, eye discharge, paresis and lymphadenopathy. According to the criteria of the Brazilian Ministry of Health (TR-DPP[®] + EIE-LVC), only 15 animals (4.2%) were classified as positive. Indeed, we found a weak correlation ($\kappa = 0.39$) between the results of both serological tests. In conclusion, CanL is established in Goiana and the use of TR-DPP[®] as a screening test and EIE-LVC as a confirmatory test may not be the best option, since some dogs positive at TR-DPP[®] are negative at EIE-LVC and vice versa.

Keywords: *Leishmania infantum*, leishmaniasis visceral – epidemiology, risk factors, dogs, signs and symptoms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Localização geográfica de Goiana-PE.....	29
Figura 2-	Resquícios de Mata Atlântica que circundam grande parte do município de Goiana-PE.....	34
Figura 3-	Criação de galinhas em quintal de uma moradia em Goiana-PE.....	35
Figura 4-	Cães domiciliados, presos no quintal de uma moradia em Goiana-PE.....	35
Figura 5-	Cão apresentando sintomatologia clínica sugestiva de LVC (onicogrifose, lesões de pele e apatia, além de linfonodomegalia e dificuldade de locomoção, não mostradas na imagem), no município de Goiana-PE.....	37
Figura 6-	Cão apresentando alopecia e lesões de pele no município de Goiana-PE.....	37
Figura 7-	Cães positivos no EIE-LVC apresentando sinais clínicos como caquexia, lesões de pele e onicogrifose, além de secreção ocular, linfonodomegalia e paresia do trem posterior, observados no momento da consulta veterinária, mas não mostrados na foto.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Análise descritiva dos cães por localidade estudada em Goiana-PE.....	33
Tabela 2-	Análise clínica dos cães por localidade estudada em Goiana-PE.....	36
Tabela 3-	Avaliação dos resultados do TR-DPP [®] segundo a análise descritiva dos cães.....	38
Tabela 4-	Avaliação dos resultados do TR-DPP [®] segundo a análise clínica dos cães.....	39
Tabela 5-	Avaliação dos resultados do teste EIE-LVC segundo a análise descritiva dos cães.....	40
Tabela 6-	Avaliação dos resultados do EIE-LVC segundo a análise clínica dos cães.....	41
Tabela 7-	Análise descritiva dos cães reagentes e não reagentes para LVC segundo a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (TR-DPP [®] + EIE-LVC).....	43
Tabela 8-	Análise clínica dos cães reagentes e não reagentes para LVC segundo a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (TR-DPP [®] + EIE-LVC).....	44
Tabela 9-	Comparação dos resultados obtidos pelo TR-DPP [®] e pelo EIE-LVC.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BID – Duas vezes ao dia
CRD – Com raça definida
DPP – Dual path platform
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EIE – Ensaio imunoenzimático
Fn – Fentograma
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina
MS – Ministério da Saúde
OMS – Organização Mundial da Saúde
OR – ODDS RATIO
PCR – Reação em cadeia pela Polimerase
PO – Por via oral
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
RPM – Rotação por minuto
SC – Subcutânea
SID – Uma vez ao dia
SRD – Sem raça definida
TR – Teste rápido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MARCO TEÓRICO DA LV	13
2.1	Breve Histórico da LVC	13
2.2	Epidemiologia e fatores de risco	13
2.3	Agente etiológico	15
2.4	Ciclo biológico e transmissão	15
2.5	Hospedeiros	16
2.6	Aspectos clínicos e imunológicos da LVC	17
2.7	Diagnóstico da LVC	18
2.7.1	<i>Diagnóstico clínico</i>	18
2.7.2	<i>Diagnóstico parasitológico</i>	19
2.7.3	<i>Diagnóstico sorológico</i>	19
2.7.4	<i>Diagnóstico molecular</i>	21
2.8	Medidas de controle e/ou prevenção da LVC	21
2.9	Tratamento da LVC	24
3	JUSTIFICATIVA	26
4	PERGUNTA CONDUTORA	27
5	OBJETIVOS	28
6	MATERIAL E MÉTODO	29
6.1	Tipo e área do estudo	29
6.2	Amostragem	29
6.3	Exame clínico e coleta das amostras	30
6.4	Teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP®)	31
6.5	Ensaio imunoenzimático (EIE-LVC)	31
6.6	Análise dos dados	32
6.7	Considerações éticas	32
7	RESULTADOS	33
8	DISCUSSÃO	46
9	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE A – Ficha de investigação clínico-epidemiológica	66
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	68
	ANEXO A – Autorização Comissão de Ética no Uso de Animais	69

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose crônica causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sinônimo de *Leishmania chagasi*) cuja transmissão ocorre através do repasto sanguíneo de uma fêmea de flebotomíneo infectada (MAROLI et al., 2013). Além do homem, *L. infantum* também pode infectar canídeos silvestres e domésticos, marsupiais, roedores, felídeos, dentre outros (DANTAS-TORRES, 2007; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Não obstante, os cães são os principais reservatórios de *L. infantum* no ambiente doméstico (QUINNELL; COURTENAY, 2009), devido à alta susceptibilidade desses animais à infecção, ao intenso parasitismo cutâneo e a sua presença nas residências, servindo assim como fonte de infecção para os vetores ali presentes.

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença em que os aspectos clínicos podem se apresentar de diversas maneiras, desde quadros subclínicos, com animais aparentemente saudáveis, até um estágio crônico generalizado que fatalmente leva à morte do animal, caso esse não seja tratado adequadamente (SOLANO-GALLEGU et al., 2011). Os cães infectados, especialmente os sintomáticos, são potencial fonte de infecção para o vetor, representando assim um potencial risco para a transmissão indireta do parasito ao homem (COURTENAY et al., 2014), caso não estejam protegidos com repelentes, por exemplo (OTRANTO et al., 2013). Por estarem geralmente na linha de frente, ficando expostos diariamente aos vetores, os cães se infectam mais frequentemente que os homens. Por isso, geralmente diz-se que os casos caninos normalmente precedem espaço-temporalmente a ocorrência dos casos humanos de LV.

Contudo, a ocorrência da LVC com um fator de risco para a LV humana tem sido tema de intenso debate. Embora alguns estudos tenham apontado uma associação entre a eutanásia de cães soropositivos e a redução da LV humana (OLIVEIRA et al., 2006), uma revisão sistemática da literatura deixou claro as limitações desses estudos e apontou para a necessidade de novas pesquisas (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Estudos de soroprevalência realizados em algumas regiões de países como Espanha, França, Itália e Portugal indicam que os cães são frequentemente expostos a *L. infantum*, seja em áreas rurais ou urbanas. Estima-se que mais de 2,5 milhões de cães que vivem nesses países estejam infectados pelo parasito (MORENO; ALVAR, 2002). Nas Américas, estima-se também que milhões de cães estejam infectados, não só por *L. infantum*, mas também por outras espécies de *Leishmania*, como *Leishmania (Viannia) braziliensis* (DANTAS-TORRES,

2009). No Brasil, a prevalência da infecção nos cães é bastante variável em diferentes regiões, podendo atingir níveis superiores a 60% em alguns focos (DANTAS-TORRES et al., 2006a).

Em regiões endêmicas, é fato comprovado que a frequência de cães com doença clínica aparente é bem menor que o número real de cães infectados (BANETH et al., 2008). Em um estudo realizado na Ilha de Mallorca (Espanha), por exemplo, entre 100 cães de um canil municipal, 13% tinham doença aparente, 26% eram soropositivos e 63% eram positivos na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Isso também sugere que os resultados de estudos sorológicos representam apenas a ponta do *iceberg*.

Diante da diversidade de cenários epidemiológicos e a constante expansão da LVC no ambiente urbano, surge à necessidade de novos estudos para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença e para a elaboração de estratégias de controle e/ou prevenção mais efetivas.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Breve histórico da LVC

Os primeiros relatos da infecção por *L. infantum* em cães no Velho Mundo foram aparentemente relatados em 1908 na Tunísia (NICOLLE; COMTE, 1908). Já naquela época, estudos experimentais demonstraram pela primeira vez o parasito na pele destes animais, sugerindo o possível papel dos mesmos como reservatórios do agente. Na década de 30, demonstrou-se que flebotomíneos alimentados sobre cães infectados se infectavam e que a taxa de infecção nos vetores era proporcional à carga de parasitos na pele dos cães (ADLER; THEODOR, 1932; PARROT et al., 1930).

No Novo Mundo, o primeiro trabalho relatando infecção canina nas Américas foi publicado em 1937 no Brasil quando Chagas et al. (1937) encontraram uma positividade de 4,1% entre os cães das cidades de Moju e Abaetetuba, no Estado do Pará. Desde os primeiros relatos de infecção em cães se pensava que esses animais seriam reservatórios secundários do agente causador da LV no Brasil e que os reservatórios primários seriam animais silvestres (CHAGAS et al., 1937). Entretanto, na década de 50, no Ceará, Deane (1956) incrimina o cão como o reservatório principal do parasito e pouco tempo depois se iniciaram as campanhas de controle que incluíam, dentre outras medidas, a eliminação dos cães infectados em áreas endêmicas.

2.2 Epidemiologia e Fatores de risco

A LVC está entre as mais importantes doenças parasitárias transmitidas por vetores, afetando cães em todos os continentes, exceto na Oceania (DANTAS-TORRES et al., 2012). Já foram relatados casos caninos em 50 dos 88 países onde a LV em seres humanos é endêmica (ALVAR et al., 2004). A doença é altamente prevalente na região Mediterrânea e na América do Sul, contudo estudos recentes têm relatado a difusão da LVC em áreas anteriormente consideradas como não-endêmicas, por exemplo, do norte da Argentina ao norte dos Estados Unidos e algumas províncias do sul do Canadá (DANTAS-TORRES et al., 2012). Em alguns estudos realizados em regiões endêmicas para a doença foi encontrada uma prevalência de aproximadamente 20% de cães positivos, como na China (SHANG et al., 2011), Grécia (ATHANASIOU et al., 2012) e no México (PASTOR-SANTIAGO et al., 2012). Estima-se que cerca de 60% dos cães infectados são assintomáticos para a doença na

América do Sul e região do Mediterrâneo (DANTAS-TORRES et al., 2012). A prevalência da *Leishmania* spp. em cães no Velho Mundo e na América do Sul varia bastante entre as regiões e depende muito do método de diagnóstico utilizado, ficando geralmente entre 25% a 75% (CORTADA et al., 2004). Contudo, a prevalência global da LVC é difícil de ser estimada devido à quantidade limitada de dados publicados de alguns países, como a existência de diferenças metodológicas entre os estudos e as limitações inerentes aos testes sorológicos, como por exemplo, a possibilidade de reações cruzadas (DANTAS-TORRES, 2009). A maioria das informações sobre a prevalência da infecção por *Leishmania* spp. em cães são decorrentes de inquéritos sorológicos realizados em diferentes regiões do Brasil e seus resultados variam conforme o tipo de avaliação, fatores de riscos associados à infecção, sintomatologia clínica e condições de peridomicílio onde estes animais estão inseridos (BORASCHI; NUNES, 2007; DANTAS-TORRES, 2009).

Os riscos de infecção por *L. infantum* e/ou desenvolvimento da doença nos cães parece estar relacionado a uma série de fatores, desde a susceptibilidade genética do animal até fatores de nutrição e estado imunológico. Dentre estes fatores estão a co-infecção com outros parasitos ou imunossupressão (ARESU et al., 2007; CORTESE et al., 2011). A susceptibilidade genética vem sendo apontada por alguns autores como um fator para o desenvolvimento da doença (ESCH; PETERSEN, 2013), incluindo polimorfismos em genes codificadores do metabolismo de ferro, quimiocinas e citocinas (BLACKWELL et al., 2009). No entanto, apesar da importância da LVC, tem havido poucos estudos sobre a susceptibilidade genética dos cães para a doença, concentrando estes estudos na análise de alguns genes candidatos a essa possível susceptibilidade (QUILEZ et al., 2012).

No cão, o sexo não é considerado até o momento importante na determinação da doença e o maior número de casos ocorre geralmente na faixa de idade até três anos e entre oito e dez anos (MORENO; ALVAR, 2002). Em relação às raças, existem relatos de maior prevalência em cães das raças Boxer, Pastor Alemão, Cocker, Doberman e Rottweiler (FRANÇA-SILVA et al., 2003; QUILEZ et al., 2012), sendo os cães da raça boxer considerados mais predispostos (FRANCINO et al., 2006) e os cães da raça Ibizan Hound mais resistentes à doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Outro fator a ser considerado é o tamanho do pelo e a função do animal, se de companhia ou de caça, pois foi observado que cães de pelo curto e de caça são mais frequentemente infectados (MORENO; ALVAR, 2002). Animais mantidos fora de casa estão mais expostos aos vetores da *L. infantum*. E neste contexto, os cães de porte médio a grande são mais suscetíveis a este contato, pois são justamente os que passam maior parte do tempo fora de casa. Além disso, a maior área

corporal destes animais pode ser um facilitador para os flebotomíneos (PENAFORTE et al., 2013). A presença de outros animais no domicílio e no peridomicílio também tem sido relatada como fator de risco para a LVC, principalmente animais de produção como galinhas e porcos, pois provavelmente a presença destes animais aumenta a densidade da população do vetor, favorecendo a transmissão da infecção (MORENO et al., 2005).

2.3 Agente etiológico

A partir de uma perspectiva global, o principal agente etiológico da LVC é o protozoário *L. infantum*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A espécie *L. chagasi* foi descrita na década de 30 por Cunha e Chagas (1937), como sendo o agente responsável pela LV nas Américas. Entretanto, estudos moleculares confirmaram a suspeita de Cunha (1938) de que *L. chagasi* seria idêntica à *L. infantum* (MAURICIO et al., 2000). Embora alguns autores tenham utilizado a classificação subespecífica *Leishmania infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005), atualmente as espécies já são listadas como sinonímia (SHAW, 2011).

Muitas espécies de *Leishmania* já foram isoladas de cães na América do Sul, incluindo *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. infantum*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, sendo *L. infantum* e *L. braziliensis* os principais agentes causadores da LVC e leishmaniose tegumentar canina, respectivamente, nessa região (DANTAS-TORRES, 2009).

2.4 Ciclo biológico e transmissão

O ciclo biológico de *L. infantum* é do tipo heteroxênico, envolvendo vetores invertebrados (os flebotomíneos) e hospedeiros vertebrados (várias espécies de mamíferos). Onde apenas as fêmeas destes insetos são hematófagas (FORATTINI, 1973), e a infecção do vetor ocorre justamente pela ingestão, durante o repasto sanguíneo, de formas amastigotas do parasito existentes no interior dos macrófagos, presentes na pele do hospedeiro infectado. Na porção média do tubo digestivo do inseto, as amastigotas transformam-se em promastigotas e se multiplicam por fissão binária desenvolvendo-se até o estágio infectante, as promastigotas metacíclicas. O parasito leva aproximadamente de 6 a 9 dias para completar seu desenvolvimento no vetor, mas esse tempo pode variar dependendo da espécie de flebotomíneo (KAMHAWI, 2006; MONTALVO et al., 2012). Quando o flebotomíneo infectado realiza um repasto sobre um novo hospedeiro susceptível, as formas infectantes são

inoculadas juntamente com a saliva que contém inúmeras moléculas com propriedades vasodilatadoras e anti-inflamatórias que facilitam o estabelecimento da infecção. Uma vez no hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e no interior do vacúolo transforma-se em amastigotas e multiplicam-se até rompê-los. As amastigotas são fagocitadas por novos macrófagos e ocorre a sua disseminação hematogênica, sobretudo para os tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (URQUHART et al., 1998).

No Velho Mundo, a transmissão de *L. infantum* ocorre através de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e no Novo Mundo do gênero *Lutzomyia*, que são encontrados em regiões de climas quentes e temperados, apresentando atividade crepuscular e noturna (MAROLI et al., 2013). No Brasil, a LV é transmitida classicamente por *Lutzomyia longipalpis*, inseto bem adaptado ao ambiente peri-doméstico e distribuído em toda a América Latina (LAINSON; RANGEL, 2005). Outros vetores também têm sido incriminados na transmissão de *L. infantum* nas Américas, incluindo *Lutzomyia cruzi* no Brasil, *L. evansi* na Colômbia e Venezuela, e *L. migonei* no Brasil e Argentina (MAROLI et al., 2013).

Formas secundárias de transmissão da infecção por *L. infantum* a cães têm sido demonstradas, tais como transmissão congênita (ROSYPAL et al., 2005), venérea (SILVA et al., 2009) e por meio de transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001). As hipóteses sobre a participação de carrapatos e pulgas ainda carecem de maiores estudos (DANTAS-TORRES, 2011).

2.5 Hospedeiros

Vários animais já foram encontrados naturalmente infectados por *L. infantum* (MOLINA et al., 2012; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Como os mamíferos das Ordens: Xenarthra (por exemplo, preguiças e tatus); Carnivora (por exemplo, raposas, cães e gatos); Rodentia (por exemplo, ratos e gerbilos); Primatas (como seres humanos e macacos); Marsupialia (por exemplo, gambás); e Perissodactyla (como os cavalos) (DANTAS-TORRES 2007; MOLINA et al., 2012).

Desde os primeiros relatos da infecção em cães na Tunísia (NICOLLE; COMTE, 1908), vários estudos têm apontado estes animais como os principais reservatórios do parasito (LAINSON; SHAW, 2005). De fato, alguns fatores favorecem o papel dos cães como reservatórios, como a grande susceptibilidade dos mesmos à infecção e o intenso parasitismo cutâneo, além da alta prevalência da infecção em áreas endêmicas (DANTAS-TORRES,

2007). Portanto, os cães também podem servir como animais sentinelas, pois a ocorrência da LVC indica a existência do ciclo de transmissão em determinada área e, conseqüentemente, a presença de flebotomíneos e o risco de infecção para outros cães e hospedeiros susceptíveis, inclusive seres humanos.

2.6 Aspectos clínicos e imunológicos da LVC

O desenvolvimento da leishmaniose em cães depende de inúmeros fatores, inclusive da espécie do parasito e da resposta imunológica de cada animal. Podendo o período de incubação da doença, variar de meses a anos (BANETH et al., 2008). De acordo com as manifestações clínicas, os cães infectados podem ser classificados como: assintomáticos (que não apresentam sinais clínicos característicos de infecção) ou doentes (com sinais clínicos evidentes da doença).

Os principais sinais clínicos da LVC incluem alterações dermatológicas, (alopecia, dermatite furfurácea e úlceras cutâneas), bem como onicogribose, atrofia muscular, linfadenopatia, caquexia, ceratoconjuntivite e hepatoesplenomegalia (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No entanto formas amastigotas de *Leishmania* spp. podem se distribuir em vários outros tecidos dos cães podendo resultar em manifestações clínicas atípicas (SOUZA et al., 2005; TAFURI et al., 2004), como desordens neurológicas (BLAVIER et al., 2001; MÁRQUEZ et al., 2013), nefropatias (COSTA et al., 2003; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2012), cardiopatias e pneumopatias (ALVES et al., 2010; SILVESTRINI et al., 2012; TORRENT et al., 2005), alterações gastrintestinais (ADAMAMA-MORAITOU et al., 2007), bem como lesões no sistema genital (AMARA et al., 2009; BENITES et al., 2011; DINIZ et al., 2005). Ademais, a imunossupressão causada pela doença também pode favorecer infecções secundárias como cistite, piodermite, malasseziose, dermatofitose e demodicose.

Em 68% dos casos de LVC ocorrem alterações dermatológicas, podendo o animal afetado apresentar um quadro clínico caracterizado por alopecia local ou generalizada, lesões crostosas em geral no focinho, orelhas e nas extremidades, descamação furfurácea, entre outros sinais (FEITOSA et al., 2000).

A resistência à infecção por *L. infantum* em cães depende da resposta Th1, a qual está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (INF- γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas 2 e 12 (IL-2 e IL-12), além de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Por outro lado, a ocorrência de lesões sistêmicas está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e a evolução da infecção.

Alguns autores afirmam que um aumento de IgG1 está relacionado à manifestação clínica severa nos cães, já o aumento nos títulos de IgG2 está relacionado aos cães naturalmente resistentes à doença ou protegidos por vacina (RIBEIRO et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

O surgimento dos sinais clínicos em cães susceptíveis deve-se a uma resposta imune exacerbada do tipo Th2, com proliferação de linfócitos B e das citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 10 (IL-10), que vão promover uma formação de imunocomplexos (BARBIÉRI, 2006). Esses imunocomplexos são os responsáveis pela grande variedade de sinais clínicos presentes na LVC, que se depositam em vários órgãos e tecidos dos cães, o que conduz ao aparecimento de diversos sinais clínicos da doença (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

2.7 Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC é bastante complexo, principalmente devido à variedade de sinais clínicos semelhantes aos observados em outras doenças caninas e ao difícil acesso da população em geral a um teste de diagnóstico bastante específico e sensível. De modo geral, é realizado por meio de testes sorológicos, parasitológico ou testes moleculares (QUINNELL et al., 2013). Cada teste possui vantagens e desvantagens em termos de sensibilidade e especificidade, por exemplo, além das possíveis dificuldades na execução de testes que necessitam de amostras mais invasiva, por exemplo, medula óssea. Preferencialmente, estes testes devem possuir alta sensibilidade, para detectar o maior número de doentes e uma alta especificidade para evitar que cães falso-positivos sejam sacrificados (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

2.7.1 Diagnóstico clínico

Em áreas endêmicas o diagnóstico da LVC é dificultado pelo fato de os sinais clínicos não serem patognomônicos, pois outras enfermidades como babesiose, erliquiose e tripanossomíase canina possuem alterações clínicas semelhantes (OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009), e a imunossupressão causada pela infecção pode gerar infecções oportunistas, dificultando ainda mais o diagnóstico clínico. Além disso, cerca de 60% a 80% dos cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito, permanecendo assintomáticos por longos períodos (QUEIROZ et al., 2010).

Desta forma o diagnóstico clínico isoladamente, não é suficiente para identificar um cão infectado por *L. infantum* (CAMARGO; LANGONI, 2006), fazendo-se necessária a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos para o diagnóstico definitivo da doença (FREITAS et al., 2012).

2.7.2 Diagnóstico parasitológico

A observação direta das formas amastigotas do parasito fornece prova definitiva da infecção, pois sua visualização confirma a infecção, sendo assim considerado o padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses (ROMERO et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Pode ser realizada em esfregaços de medula óssea, linfonodo, baço ou ainda através de biópsia cutânea (QUEIROZ et al., 2009). A observação das formas amastigotas em esfregaços de sangue periférico não é um achado frequente em cães infectados por *L. infantum* (GIUDICE; PASSANTINO, 2011). O diagnóstico parasitológico pode apresentar especificidade que chega a 100%, em detrimento da sensibilidade, que é bastante variável, tendo em vista que a distribuição tecidual do agente etiológico da doença não é homogênea (OTRANTO et al., 2009).

2.7.3 Diagnóstico sorológico

Por muitos anos, a imunofluorescência indireta (RIFI) foi considerada o teste de referência sorológica para diagnóstico da LVC no Brasil. No entanto, esta técnica apresenta limitações principalmente pela baixa reprodutibilidade e resultados falso-positivos devidos a reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma caninum*, *Leishmania braziliensis* e *Ehrlichia canis* (SILVA et al., 2011). Além disso, a RIFI pode ser impraticável em áreas rurais por causa da falta de equipamentos de laboratório e técnicos qualificados para interpretar os resultados (COURA-VITAL et al., 2014). Sendo assim, o Ministério da Saúde do Brasil, por meio da Nota Técnica Conjunta 01/2011, modificou o protocolo de diagnóstico oficial da LVC, substituindo o RIFI pelo teste rápido TR-DPP[®], que passou a ser o teste de triagem e o EIE o teste confirmatório (BRASIL, 2011; FARIA; ANDRADE, 2012).

O EIE é bastante útil para análises de laboratório, possibilitando a análise de grande quantidade de amostras em pouco tempo (MAIA; CAMPINO, 2008), sendo, por isso, um teste mais rápido e de fácil execução (CAMARGO; LANGONI, 2006) quando comparado a RIFI. Contudo, segundo Otranto et al. (2009) a sorologia pode não ser um bom indicador de

infecção canina quando é utilizada em estudos transversais, devido às várias vezes que os mesmos se estendem entre o período de infecção à soroconversão dos animais (de meses a anos). Além disso, animais assintomáticos infectados podem permanecer soronegativos como consequência de sua resposta imunológica individual (BARBIERI, 2006).

Mesmo com tais limitações, o diagnóstico da LVC no Brasil é realizado oficialmente por meio de testes sorológicos (BRASIL, 2011). O kit EIE-LVC, fabricado por Bio-manguinhos, é preconizado pelo Ministério da Saúde que utiliza o antígeno solúvel e lisado de *Leishmania major-like*, possui uma sensibilidade de 72% e especificidade de 87,5% (LIRA et al., 2006). Esta diminuição na especificidade observada no kit EIE-LVC pode ser devido ao uso de antígeno não específico para *L. infantum*. A sensibilidade e a especificidade do EIE dependem do tipo de antígeno empregado e de outros fatores como tempo de incubação ou tipo de microplacas utilizadas (REITHINGER et al., 2002).

A fim de solucionar a redução da especificidade do teste pela utilização de parasitos totais ou lisados, pesquisas têm sido realizadas para a identificação de antígenos dominantes, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos e detectáveis nestes testes, contribuindo para a sua maior confiabilidade (ALVES; BEVILACQUA, 2004). Por sua vez a utilização de antígenos brutos é limitada em termos de especificidade, apresentando reações cruzadas não somente com outras espécies da família Trypanosomatidae, mas também com outros organismos filogeneticamente distantes (GONTIJO; MELO, 2004).

Cada vez mais se buscam técnicas de diagnósticos que apresentem resultado rápido, sensível e específico e que possam ser realizados em campo, com baixas condições de infraestrutura. Neste contexto, o teste TR-DPP[®] foi desenvolvido por Bio-Manguinhos em parceria com a ChemBio (USA) (FRAGA et al., 2014). O TR-DPP[®] possui vantagens como: fácil armazenamento, rapidez, praticidade e flexibilidade no tipo de amostras biológicas utilizadas (sangue, soro ou plasma) (GRIMALDI et al., 2012). Nesse teste, o antígeno recombinante rK28 (fusão de rK9, rK26, rK39) (FRAGA et al., 2014) impregnado em uma membrana de nitrocelulose reage com imunoglobulinas específicas presentes nas amostras de animais positivos, sendo a reação revelada pela interação de proteína A, acoplada a partículas de ouro coloidal, com a porção Fc (fragmento cristalizável) das imunoglobulinas (LE MOS et al., 2008; LIMA et al., 2010).

Grimaldi et al. (2012) demonstraram que o TR-DPP[®] teve bom desempenho, com sensibilidade que variou entre 93% a 100% e especificidade de 92% a 100%. No entanto, os mesmos autores observaram que a sensibilidade dependente da situação clínica do animal, sendo a sensibilidade do teste mais elevada em cães sintomáticos. Uma possível explicação

para a variação na sensibilidade do TR-DPP[®] entre estudos incluem diferenças na severidade na avaliação dos sinais clínicos destes animais (QUINNELL et al., 2013). Além disso, falsos positivos no TR-DPP[®] foram relatados em cães infectados por *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma cruzi* e *Neospora caninum* (LEMOS et al., 2008).

Geralmente, os testes sorológicos são mais acessíveis que os moleculares, sendo o custo do EIE-LVC, menos que o TR-DPP[®] (COURA-VITAL et al., 2014).

2.7.4 Diagnóstico molecular

Dentre as mais modernas técnicas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses, destacam-se as técnicas moleculares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) baseia-se na amplificação *in vitro* de sequências de nucleotídeos do parasito, sendo um método bastante sensível e específico para detectar DNA de *Leishmania* spp. em uma ampla variedade de amostras biológicas, como por exemplo: sangue, pele, urina, biopsia de linfonodo e medula óssea (ALVAR et al., 2004). Em seu estudo, Quaresma et al. (2009) foi capaz de detectar kDNA (DNA do cinetoplasto) em concentrações tão baixas como 0,1 fg de DNA/ml, sabendo-se que 1 parasito contém aproximadamente 300 fg de DNA (VERGEL; WALKER; SARAVIA, 2005). No entanto, o uso da PCR encontra-se ainda bastante restrito às pesquisas e na elucidação de casos inconclusivos (NUNES et al., 2007), talvez por possuir custo ainda maior que as técnicas sorológicas e exigir equipamentos sofisticados e pessoal treinando (MAIA et al., 2009).

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) permite o monitoramento dos ciclos de amplificação do DNA durante o decorrer da reação e possibilita a eliminação da etapa de eletroforese em gel de agarose, necessária para visualização do produto amplificado na PCR convencional (MAIA; CAMPINO, 2008). Essa técnica permite a quantificação da carga parasitária e a detecção de quantidades ínfimas de DNA (GALLETTI et al., 2011). Como uma das características da infecção por *Leishmania* spp. é o animal apresentar parasitos em latência, as abordagens quantitativas são necessárias para elucidar cães infectados por *L. infantum* em áreas endêmicas para a doença, facilitando o monitoramento da carga parasitária e sua resposta ao tratamento, bem como o acompanhamento do desenvolvimento de novas vacinas (FRANCINO et al., 2006).

2.8 Medidas de controle e/ou prevenção da LVC

Recentemente o conceito “One Health” (Uma só saúde) vem sendo redescoberto e busca-se uma visão holística do conceito de saúde, propondo a interação entre a medicina humana, a medicina veterinária, as ciências ambientais e da conservação da vida selvagem (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011). Neste contexto, o gerenciamento e controle da LVC deverão ser alicerçados em: educação em saúde, controle da população canina, diagnóstico e tratamento de cães com LVC e combate ao vetor (RIBEIRO et al., 2013).

O controle da população canina infectada por *L. infantum* no país é realizado, sobretudo, através da eutanásia desde 1963, em cumprimento do decreto nº 51.833 do Ministério da Saúde do Brasil, o qual estabelece que os cães soropositivos devem ser eutanasiados (QUEIROZ et al., 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o controle da doença seja adaptada à situação local, preconizando que em determinadas situações os cães sintomáticos ou soropositivos sejam de fato eutanasiados. Contudo, segundo Romero; Boelaert (2010) essa estratégia de controle não surtiu efeito em alguns países como, por exemplo, o Brasil, onde cerca de mais de 160 mil cães soropositivos já foram eutanasiados, no entanto a incidência de LV humana não foi reduzida a nível aceitável. Em países do Mediterrâneo a eutanásia dos cães infectados não é realizada, exceto em casos especiais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

A eutanásia dos cães soropositivos é uma estratégia de controle bastante polêmica e gera várias discussões, inclusive sobre sua legitimidade. Contudo, a eutanásia se tornou no Brasil a ferramenta mais utilizada para o controle da doença, só perdendo para as ações de controle e monitoramento dos flebotômíneos (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011). No entanto a eutanásia desnecessária de cães falsos positivos sobrecarrega o programa e alimenta o discurso contra o sacrifício de cães, aumentando a aversão da sociedade contra o atual modelo do programa de controle da doença no país (FERROGLIO et al., 2007).

Para alguns autores o controle vetorial pode ser mais efetivo que a eutanásia de cães no combate à infecção (MIRÓ et al., 2009), pois quebraria o ciclo de transmissão da *Leishmania* e assim contribuiria para a prevenção da doença (GRAMICCIA, 2011), protegendo os cães da infecção e conseqüentemente reduzindo o risco de infecção humana (NASCIMENTO et al., 2005). Sendo os principais produtos empregados na borrifação de casas e anexos para controle aos vetores: a cipermetrina, na formulação pó molhável (PM) e a deltametrina, em suspensão concentrada (SC) (BRASIL, 2006).

O uso nos cães de coleiras impregnadas de deltametrina a 4% (por exemplo, Scalibor[®]) tem demonstrado efeito inseticida sobre os flebotomíneos e podem reduzir os riscos de infecção em cães e impedem que os cães já infectados possam transmitir o agente etiológico da doença aos flebotomíneos, tendo em vista sua ação repelente (DAVID et al., 2001). Este composto de natureza lipofílica requer algum tempo para atingir as secreções dérmicas em todo o corpo do animal, sendo recomendada sua aplicação cerca de duas semanas antes da época de maior risco à infecção (REITHINGER; TEODORO; DAVIES, 2001). David et al. (2001) relataram uma inibição alimentar de 99,3%, e mortalidade de 96% em *L. longipalpis*, após quatro semanas de aplicação dos colares em cães em condições de laboratório. Já Manzillo et al. (2006), em estudo de campo, obtiveram uma taxa acumulativa de 50,8% para proteção contra a infecção de *L. infantum* nos cães.

A apresentação em forma de coleiras tem a vantagem de ser de fácil utilização e ter uma duração média de até seis meses de uso, sendo uma situação em que esta apresentação possa requerer mais cuidados é no caso de haver mais de um animal no mesmo espaço, pois existe o risco das coleiras serem arrancadas devido à interação entre os animais (MAROLI et al., 2001). Porém, o custo dessas coleiras ainda é elevado o que inviabiliza a sua utilização por parte de muitos proprietários de cães que vivem em áreas rurais e suburbanas. Além disso, as coleiras precisam ser substituídas a cada 5-6 meses (DANTAS-TORRES, 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Outra coleira impregnada de imidacoprid a 10% e flumetrina a 4,5% se mostrou 100% eficaz na prevenção da infecção por *L. infantum* em cães de áreas endêmicas para a doença por um período de até oito meses (OTRANTO et al., 2013). Aliados ao uso dessas coleiras recomenda-se manter o cão dentro de casa no período do crepúsculo ao amanhecer, além de reduzir os microhabitats favoráveis aos flebotomíneos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Já a permetrina é comercializada sob a forma de *spot-on*, em pequenas pipetas, cujo conteúdo deverá ser aplicado na pele do cão, a cada quatro semanas. Essa substância tem efeito mais precoce que a deltametrina, embora de menor duração (REITHINGER et al., 2002).

Destaca-se também como alternativa de proteção individual para a doença canina, a vacinação. No Brasil há duas vacinas licenciadas para uso em cães: Leishmune[®] constituída por uma fração de glicoproteína de *L. donovani*, apresentando 76-80% de eficácia e a Leish-Tec[®] que é fabricada a partir de um adenovírus que expressa um antígeno A2 de *L. donovani* (DANTAS-TORRES, 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Na Europa, foi lançada a vacina CaniLeish[®] que é fabricada a partir de proteínas secretadas de *L. infantum* onde estudos revelaram que após a vacinação todos os cães desenvolveram forte resposta de IgG2,

tipo de imunoglobulina associada por muitos autores como fator de proteção/resistência à infecção (INIESTA et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2001), que durou em média seis meses, após a última, das três doses recomendadas pelo protocolo da vacina (MORENO et al., 2014).

Embora Palatnik de Sousa et al. (2009) tenham demonstrado que a vacinação canina promove redução na incidência da LV humana e canina, ainda são necessários mais estudos para melhor compreensão do efeito da vacinação em cães como medida de controle da LV humana (ROMERO; BOELART, 2010).

2.9 Tratamento da LVC

Um dos grandes desafios para a falta de eficácia da cura parasitológica do tratamento da LVC está associado à localização estritamente intracelular do parasito e à sua presença em tecidos menos vascularizados do organismo do animal, como a pele, o corpo vítreo e os tecidos queratinizados, o que dificulta a obtenção de doses terapêuticas no local da infecção e consequentemente o sucesso terapêutico (CIARAMELLA; CORONA, 2003).

A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2010) recomenda que os mesmos medicamentos utilizados no tratamento da doença em seres humanos não sejam utilizados para o tratamento dos cães, sendo o alopurinol a droga recomendada para o tratamento dos cães infectados. Essa droga possui ação leishmanioestática, atuando na síntese da *Leishmania* spp. incorporando-se ao seu RNA, consequentemente inibindo o seu crescimento. Possui segundo Noli; Auxilia (2005) como principais efeitos colaterais: xantínúria, eritema cutâneo, hipertermia, leucopenia, hepatite e transtornos gastrintestinais (vômitos e diarreias).

Conforme o grupo LeishVet, o antimoníato de meglumina (75-100 mg/kg SID, durante 4-8 semanas, SC), combinado com o alopurinol (10 mg/kg BID, 6-12 meses, PO) é considerado o tratamento de primeira linha para a LVC. Os principais efeitos adversos do antimoníato de meglumina é o seu potencial efeito nefrotóxico e formação de abscessos cutâneos. O alopurinol (10 mg/kg BID, 6-12 meses PO) também ser utilizado sozinho, como tratamento de segunda linha para a doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No entanto, não há cura parasitológica e sim clínica da LVC, até o momento (MIRÓ et al., 2008; SOLLANO-GALLEGO et al., 2009).

A imunomodulação adicionada ao tratamento convencional pode ser a chave para o sucesso terapêutico da LVC (GÓMEZ-OCHOA et al., 2009). Nesta perspectiva, alguns estudos avaliaram a utilização da domperidona (antagonista do receptor de Dopamina D2),

para prevenção da infecção e controle dos sinais clínicos da doença. A substância ativa os linfócitos T que secundariamente ativam os macrófagos, melhorando assim a resposta imune do animal (RIBEIRO, 2007). Em estudos realizados por GÓMEZ-OCHOA et al. (2009) a domperidona foi eficaz no controle dos sinais clínicos e na redução de títulos de anticorpos anti-*Leishmania* nos cães participantes de seus estudos. Sabaté et al. (2014) conseguiram uma taxa de até 80% de prevenção contra a infecção em cães na Espanha e concluíram que o risco para os cães tratados com domperidona em desenvolver a doença clínica é sete vezes menos que nos cães não tratados. Recentemente na Europa, foi lançado o Leishguard[®], produto a base de tal substância, destinado para prevenção e tratamento da forma clínica da LVC (SABATÉ et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil tem testemunhado nos últimos anos a expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães soropositivos em várias cidades em todas as regiões do país. Da mesma maneira, a LVC encontra-se amplamente distribuída no território pernambucano, embora os dados sobre a dinâmica e características epidemiológicas da doença em algumas áreas sejam ainda fragmentados e incipientes. Esse é o caso do município de Goiana, onde casos humanos têm sido registrados. De fato, o conhecimento dos fatores epidemiológicos, ambientais e individuais associados com a LVC nessa localidade ainda não são bem compreendidos. Assim a investigação de potenciais fatores associados à infecção e aspectos clínicos apresentados pelos animais soropositivos são de extrema importância para melhor compreensão da dinâmica da doença e para a definição de medidas de controle mais eficazes na localidade. Ademais, a comparação dos testes diagnósticos atualmente recomendados pelo Ministério da Saúde se faz necessária no intuito de verificar a concordância desses testes em diferentes áreas endêmicas para a doença no Brasil.

4 PERGUNTA CONDUTORA

- Qual a soroprevalência, os principais aspectos clínicos-epidemiológicos e a concordância entre os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina no município de Goiana, estado de Pernambuco, Brasil?

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Estudar os aspectos clínicos-epidemiológicos e a estratégia de diagnóstico sorológico da LVC no município de Goiana, estado de Pernambuco, Brasil.

5.2 Específicos

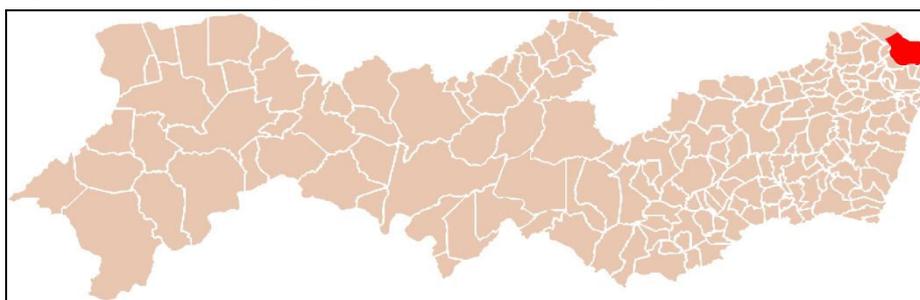
- a) Verificar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães;
- b) Avaliar a existência de possíveis fatores associados à soropositividade canina;
- c) Comparar o quadro clínico apresentado pelos animais e o resultado da sorologia;
- d) Verificar a concordância apresentada nos testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil para o diagnóstico da infecção canina por *L. infantum*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Tipo e área do estudo

O presente estudo, descritivo do tipo transversal, foi realizado no município de Goiana, Pernambuco (Figura 1), localizado na mesorregião Mata e na Microrregião Mata Setentrional do Estado de Pernambuco a 60 km da capital Recife, limitando-se a Norte com o Estado do Paraíba, a Sul com Itaquitinga, Igarassu, Itapissuma e Itamaracá, a leste com o Oceano Atlântico e a Oeste com Condado e Itambé. O município possui uma área territorial de 501,884 km², e está dividido em três distritos: Sede, Pontas de Pedra e Tejucopapo. Sua população é estimada (2013) em 77.945 habitantes. O clima é do tipo tropical chuvoso com verão seco e o bioma predominante é a Mata Atlântica (IBGE, 2010).

Figura 1 – Localização geográfica de Goiana-PE (em destaque).



Fonte: Wikimedia Commons (2009).

6.2 Amostragem

Para o cálculo da amostra mínima necessária, considerou-se a população canina (3.500 animais) estimada pela Vigilância Epidemiológica de Goiana, adotando-se um erro amostral de 5% e nível de confiança de 95%. A amostra mínima representativa da população foi então estimada em 347 cães. Com base nessa informação, incluíram-se no estudo 360 cães de ambos os sexos, com idade e raças variadas, domiciliados (ou semi-domiciliados) nas localidades de Atapuz, Tejucupapo e Pontas de Pedra.

6.3 Exame clínico e coleta das amostras

Todos os animais incluídos no estudo foram submetidos a um exame físico minucioso, onde as manifestações clínicas e aspectos epidemiológicos foram anotados em fichas individualizadas para cada animal (ver Apêndice A). Sendo os cães divididos em dois grupos: grupo I (animais doentes: apresentando sinais clínicos sugestivos da doença) e grupo II (animais saudáveis: sem sinais clínicos aparentes). Os parâmetros analisados tiveram como base: o estado nutricional, tamanho dos animais, tamanho das unhas, condição da pelagem, coloração das mucosas, presença de secreção ocular, presença de linfonomegalia e de problemas de locomoção. Os animais inspecionados quanto ao estado nutricional foram classificados em caquético, magro, normal ou obeso, sendo respeitada a característica corporal de cada raça. O tamanho das unhas foi classificado em grandes ou normais. A presença de alopecia foi classificada em localizada ou disseminada. Alterações cicatriciais, manchas, escoriações e pelo sujo não foram levados em consideração. A coloração da mucosa foi classificada em pálida ou rósea. A secreção ocular foi classificada em presente ou ausente. Por palpação, os animais foram avaliados quanto à presença ou ausência de linfonomegalia (JONES, 2003).

A coleta das amostras dos animais foi realizada através de busca ativa, com visita a todos os domicílios de cada área previamente definida, de acordo com o censo animal realizado pela Secretária de Saúde do Município de Goiana. Os animais foram devidamente contidos fisicamente, com focinheiras de polipropileno. Quando necessário, foram submetidos à tranquilização química (acepromazina a 1%, por via intramuscular), com o objetivo de acalmar a agitação e a hiperatividade dos mesmos para que os procedimentos necessários (exame físico e coleta de sangue) fossem realizados (FANTONI, 2002).

Em seguida foi realizada a tricotomia e a antissepsia do local de coleta do sangue com algodão embebido em álcool iodado. Foram coletados de 2 a 5 ml de sangue da veia cefálica de cada animal utilizando uma seringa descartável acoplada a uma agulha hipodérmica 25 x 7 mm. O sangue foi depositado em tubo de ensaio sem anticoagulante para realização de centrifugação (2.500 rpm por 10 minuto) e obtenção do soro. O soro foi estocado a -20°C para posterior análise objetivando a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

6.4 Teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP[®])

O teste rápido TR-DPP[®] (Bio-Manguinhos/Fiocruz) foi realizado conforme as instruções do fabricante. Foram adicionados 5 µl de soro ao poço 1 intitulado “Amostra + Tampão”, a seguir adicionadas 2 gotas do tampão. Após 5 minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. Então, colocaram-se 4 gotas do tampão no poço 2 intitulado “Tampão”. A leitura dos resultados foi realizada 10 a 15 minutos após esta etapa, avaliando-se o resultado como negativo (aparecimento de uma linha vermelha) ou positivo (duas linhas vermelhas).

6.5 Ensaio imunoenzimático (EIE-LVC)

Para a realização do ensaio imunoenzimático, utilizou-se o kit EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos (EIE-LVC), seguindo as orientações do fabricante, com as diluições dos soros deste estudo a 1:100. Os controles positivos e negativos, assim como o conjugado e as molduras com os dispositivos de poços já sensibilizados, foram mantidos a –20°C. Enquanto que o diluente de amostra/conjugado, a lecitina de leite, o tampão de lavagem, o diluente do substrato, o cromógeno (TMB), o substrato (H₂O₂) e o ácido sulfúrico 2M foram mantidos entre 2°C e 8°C.

Mediante os cuidados e precauções alertados pelo fabricante, deu-se o procedimento do teste com as amostras de soro dos cães. Foram utilizadas as molduras com os dispositivos de poços sensibilizados de acordo com o número de amostras e controles. Da mesma forma, procedeu-se à preparação do diluente de amostras/conjugado, da lecitina de leite e da água destilada. Os controles e as amostras de soro foram diluídos no diluente de amostras/conjugado na proporção 1:100 e, em seguida, distribuídos nas colunas e fileiras da placa. Os controles (positivo, negativo e sem soro) foram distribuídos em duplicata. As placas sensibilizadas foram seladas com a folha adesiva e foi incubada a 37°C. Depois de preparado o tampão de lavagem e removida a folha adesiva da placa, o conteúdo foi aspirado e lavado seis vezes, sendo 200 µl/orifício, a cada 30 a 60 segundos entre uma lavagem e outra.

A leitura das placas foi realizada no leitor para microplacas (Benchmark, Bio-Rad Laboratories) equipado com filtro de 450 nm, sem a utilização de filtro de referência. O cálculo do ponto de corte obedeceu às orientações do fabricante.

6.6 Análise dos dados

Os dados foram analisados descritivamente através de frequência absolutas e percentuais. Para avaliar a diferença entre localidades ou associação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ou o exato de Fisher quando as condições para utilização do teste qui-quadrado não foram verificadas. Para avaliar a força da associação nos cruzamentos das variáveis categóricas foi obtido o valor do Odds Ratio (OR) ou razão de chances com respectivo intervalo de confiança. Para avaliar o grau de concordância entre os testes aplicados foi obtido o percentual de concordância e o valor do kappa (ALTMAN, 1991; CONOVER, 1980).

A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5% e os intervalos foram obtidos com 95% de confiança. Os dados foram digitados na planilha Excel[®] e o programa estatístico utilizado para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 21.

6.7 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães sob o número 36/2012 (ver Anexo A). Conforme o Apêndice B, todos os proprietários de cães participantes nessa pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a participação do seu animal no estudo.

7. RESULTADOS

Dos 360 animais avaliados, 73 (20,3%) eram da localidade de Atapuz, 155 (43,0%) de Tejucupapo e 132 (36,7%) de Pontas de Pedra (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise descritiva dos cães por localidade estudada em Goiana-PE

Variável	Localidades						Valor de p
	Atapuz		Tejucupapo		Pontas de Pedra		
	n	%	n	%	n	%	
TOTAL	73	100,0	155	100,0	132	100,0	
• Idade							
Até 1 ano	-	-	10	6,5	13	9,8	p ⁽¹⁾ = 0,022*
Mais de 1 ano	73	100,0	145	93,5	119	90,2	
• Sexo							
Macho	29	39,7	81	52,3	74	56,1	p ⁽¹⁾ = 0,076
Fêmea	44	60,3	74	47,7	58	43,9	
• Raça							
CRD	5	6,8	20	12,9	7	5,3	p ⁽¹⁾ = 0,062
SRD	68	93,2	135	87,1	125	94,7	
• Porte							
Grande	16	21,9	5	3,2	7	5,3	p ⁽¹⁾ < 0,001*
Médio	50	68,5	145	93,5	107	81,1	
Pequeno	7	9,6	5	3,2	18	13,6	
• Cor dos pelos							
Claro	54	74,0	97	62,6	85	64,4	p ⁽¹⁾ = 0,226
Escuro	19	26,0	58	37,4	47	35,6	
• Comprimento dos pelos							
Curto	65	89,0	136	87,7	118	89,4	p ⁽¹⁾ = 0,901
Longo	8	11,0	19	12,3	14	10,6	
• Moradia							
Urbana	-	-	-	-	-	-	**
Rural	73	100,0	155	100,0	132	100,0	
• Proximidade da mata							
Sim	73	100,0	155	100,0	132	100,0	**
Não	-	-	-	-	-	-	
• Animais de produção							
Sim	27	37,0	39	25,2	28	21,2	p ⁽¹⁾ = 0,045*
Não	46	63,0	116	74,8	104	78,8	
• Forma de criação							
Domiciliado	45	61,6	89	57,4	46	34,8	p ⁽¹⁾ < 0,001*
Semidomiciliado	28	38,4	66	42,6	86	65,2	
• Lugar de criação							
Dentro de casa	9	12,3	31	20,0	16	12,1	p ⁽¹⁾ = 0,126
Quintal	58	79,5	120	77,4	109	82,6	
Rua	6	8,2	4	2,6	7	5,3	
• Função do cão							
Guarda	58	79,5	122	78,7	104	78,8	p ⁽²⁾ = 0,213
Companhia	13	17,8	33	21,3	28	21,2	
Caça	2	2,7	-	-	-	-	

Fonte: O autor.

Nota: (*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de categorias.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

A maioria dos animais possuía mais de um ano de idade (93,6%), eram machos (51,1%), de porte médio (83,9%), com pelos claros (65,6%) e curtos (88,6%). A maior parte (91,1%) dos cães era sem raça definida (SRD). Dentre os animais com raça definida (CRD), os poodles corresponderam a 59,3%. Todos os animais viviam em área rural, onde era comum encontrar resquícios de Mata Atlântica e inúmeras construções precárias, muitas vezes sem iluminação pública e/ou saneamento básico (Figura 2).

Figura 2 – Resquícios de Mata Atlântica circundam grande parte do município de Goiana-PE.



Fonte: O autor.

Em algumas moradias onde se encontravam os cães, também foi constatada a criação de animais de produção (26,1%) (caprinos, bovinos, equinos, suínos e galináceos), que segundo os proprietários destinavam-se à subsistência da própria família e/ou comercialização e, no caso dos equinos, para tração e/ou transporte. Basicamente o local para criação destes animais era o quintal, próximos aos cães, sendo observada também grande quantidade de animais soltos nas ruas (Figura 2). A localidade onde se encontra em maior frequência esses animais foi em Atapuz (37,0%). Dentre as moradias onde os proprietários dos cães possuíam algum animal de produção, foi bastante comum à existência de galinhas nos quintais (87,2%) (Figura 3).

Figura 3 – Criação de galinhas em quintal de uma residência no município de Goiana-PE.



Fonte: O autor.

O percentual de cães domiciliados (Figura 4) foi mais elevado em Atapuz (61,6%), variando de 34,8% a 57,4% nos outros dois locais. Este percentual sofreu bastante influência da variável raça, chegando a 84,3% para cães CRD. Foram bastante frequentes animais cujos proprietários os criavam com a função de guarda (78,9%). Também foi constatado que a maioria dos cães passava maior parte do tempo no quintal (79,7%) (Figura 4).

Figura 4 – Cães domiciliados, presos em quintal no município de Goiana-PE.



Fonte: O autor.

Em relação aos aspectos clínicos (Tabela 2), foram verificadas diferenças significativas entre as três localidades, em relação às variáveis: classificação clínica do cão, e alopecia, lesões da pele, onicogribose, paresia e linfonomegalia. O percentual de animais sintomáticos (Figura 5) foi mais elevado entre os animais de Atapuz (58,9%), variando de 29% a 48,5% nas outras duas localidades.

Tabela 2 – Análise clínica dos cães por localidade estudada em Goiana-PE.

Variável	Localidades						Valor de p
	Atapuz		Tejucupapo		Pontas de Pedra		
	n	%	n	%	n	%	
TOTAL	73	100,0	155	100,0	132	100,0	
• Classificação							
Sintomático	43	58,9	45	29,0	64	48,5	p ⁽¹⁾ = 0,001*
Assintomático	73	100,0	145	93,5	119	90,2	
• Condição nutricional							
Normal	53	72,6	128	82,6	96	72,7	p ⁽²⁾ = 0,090
Magro	17	23,3	22	14,2	33	25,0	
Caquético	2	2,7	1	0,6	-	-	
Sobrepeso	1	1,4	4	2,6	3	2,3	
• Coloração da mucosa ocular							
Pálida	10	13,7	37	23,9	34	25,8	p ⁽¹⁾ = 0,122
Rósea	63	86,3	118	76,1	98	74,2	
• Alopecia							
Sim	14	19,2	5	3,2	22	16,7	p ⁽¹⁾ < 0,001*
Não	59	80,8	150	96,8	110	83,3	
• Lesões de pele							
Sim	54	74,0	97	62,6	85	64,4	p ⁽¹⁾ = 0,001*
Não	19	26,0	58	37,4	47	35,6	
• Onicogribose							
Sim	19	26,0	-	-	8	6,1	p ⁽¹⁾ = < 0,001*
Não	54	74,0	155	100,0	124	93,9	
• Secreção ocular							
Sim	8	11,0	6	3,9	8	6,1	p ⁽¹⁾ = 0,114
Não	65	89,0	149	96,1	124	93,9	
• Paresia do trem posterior							
Sim	2	2,7	-	-	-	-	p ⁽²⁾ = 0,041*
Não	71	97,3	155	100,0	132	100,0	
• Incoordenação motora							
Sim	2	2,7	-	-	1	0,8	p ⁽²⁾ = 0,053
Não	71	97,3	155	100	131	99,2	
• Linfonomegalia							
Sim	15	20,5	3	1,9	10	7,6	p ⁽¹⁾ = < 0,001*
Não	58	79,5	152	98,1	122	92,4	

Fonte: O autor.

Nota: (*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

A maioria dos cães apresentou condição nutricional normal (76,9%). A coloração da mucosa ocular rósea foi observada em 77,5%, e apenas três animais (0,8%) tinham incoordenação motora. O percentual com onicogribose foi mais elevado (26,0%) entre os de

Atapuz. Já o percentual com alopecia e/ou lesão de pele (Figura 6) foi mais elevado entre os animais de Atapuz e Pontas de Pedra, com 19,2% e 16,7% respectivamente.

Figura 5 – Cão apresentando sintomatologia clínica sugestiva de LVC (onicogrifose, alopecia, lesões de pele e apatia, além de linfonodomegalia e dificuldade de locomoção, não mostradas na imagem), no município de Goiana-PE.



Fonte: O autor.

Figura 6 – Cão apresentando alopecia e lesões de pele no município de Goiana-PE.



Fonte: O autor.

Na Tabela 3, analisa-se a positividade no teste TR-DPP[®] segundo as diferentes variáveis consideradas. No geral, 13,05% nas amostras analisadas foram positivas. Não foram verificadas associações significativas ($p > 0,05$) entre os resultados do TR-DPP[®] e as variáveis analisadas.

Tabela 3 – Avaliação dos resultados do TR-DPP[®] segundo a análise descritiva dos cães.

Variável	TR-DPP [®]				Valor de p	OR (ICa 95%)
	Reagente		Não reagente			
	n	%	n	%		
TOTAL	47	13,1	313	86,9		
• Idade						
Até 1 ano	1	4,3	22	95,7	$p^{(1)} = 0,335$	**
Mais de 1 ano	46	13,6	291	86,4		
• Sexo						
Macho	20	10,9	164	89,1	$p^{(2)} = 0,208$	1,00 1,49 (0,80 a 2,76)
Fêmea	27	15,3	149	84,7		
• Raça						
CRD	3	9,4	29	90,6	$p^{(1)} = 0,783$	1,00 1,50 (0,44 a 5,13)
SRD	44	13,4	284	86,6		
• Porte						
Grande	5	17,9	23	82,1	$p^{(1)} = 0,202$	** ** **
Médio	41	13,6	261	86,4		
Pequeno	1	3,3	29	96,7		
• Cor dos pelos						
Claro	33	14,0	203	86,0	$p^{(2)} = 0,471$	1,28 (0,66 a 2,49) 1,00
Escuro	14	11,3	110	88,7		
• Comprimento dos pelos						
Curto	45	14,1	274	85,9	$p^{(2)} = 0,099$	**
Longo	2	4,9	39	95,1		
• Animais de produção						
Sim	13	13,8	81	86,2	$p^{(2)} = 0,795$	1,10 (0,55 a 2,18) 1,00
Não	34	12,8	232	87,2		
• Forma de criação						
Domiciliado	20	11,1	160	88,9	$p^{(2)} = 0,274$	1,00 1,41 (0,76 a 2,62)
Semidomiciliado	27	15,0	153	85,0		
• Lugar de criação						
Dentro de casa	3	5,4	53	94,6	$p^{(2)} = 0,163$	1,00 2,94 (0,88 a 9,87) 3,79 (0,69 a 20,83)
Quintal	41	14,3	246	85,7		
Rua	3	17,6	14	82,4		
• Função do cão						
Guarda	43	15,1	241	84,9	$p^{(1)} = 0,067$	** ** **
Companhia	4	5,4	70	94,6		
Caça	-	-	2	100,0		

Fonte: O autor.

Nota: (**): Não foi determinado devido à de ausência de categorias, frequências nulas ou muito baixas.

(1): Através do teste Exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se uma associação significativa ($p < 0,05$) entre os resultados do TR-DPP[®] e os seguintes sinais clínicos: alopecia, lesões na pele, paresia e linfonomegalia. Com exceção de paresia, os intervalos de confiança da OR excluíram o valor 1,00 (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação dos resultados do TR-DPP® segundo a análise clínica dos cães.

Variável	TR-DPP®				Valor de p	OR (IC a 95%)
	Reagente		Não reagente			
	n	%	n	%		
TOTAL	47	13,1	313	86,9		
• Classificação						
Sintomático	25	16,4	127	83,6	p ⁽¹⁾ = 0,102	1,66 (0,90 a 3,08)
Assintomático	22	10,6	186	89,4		
• Condição nutricional						
Normal	33	11,9	244	88,1	p ⁽²⁾ = 0,082	**
Magro	11	15,3	61	84,7		
Caquético	2	66,7	1	33,3		
Sobrepeso	1	12,5	7	87,5		
• Coloração da mucosa ocular						
Pálida	15	18,5	66	81,5	p ⁽¹⁾ = 0,097	1,75 (0,90 a 3,43)
Rósea	32	11,5	247	88,5		
• Alopecia						
Sim	11	26,8	30	73,2	p ⁽¹⁾ = 0,005*	2,88 (1,33 a 6,24)
Não	36	11,3	283	88,7		
• Lesões de pele						
Sim	15	28,8	37	71,2	p ⁽¹⁾ < 0,001*	3,50 (1,73 a 7,06)
Não	32	10,4	276	89,6		
• Onicogribose						
Sim	5	18,5	22	81,5	p ⁽²⁾ = 0,374	1,57 (0,57 a 4,38)
Não	42	12,6	291	87,4		
• Secreção ocular						
Sim	6	27,3	16	72,7	p ⁽²⁾ = 0,052	2,72 (1,01 a 7,34)
Não	41	12,1	297	87,9		
• Paresia do trem posterior						
Sim	2	100,0	-	-	p ⁽²⁾ = 0,017*	**
Não	45	12,6	313	87,4		
• Incoordenação motora						
Sim	1	33,3	2	66,7	p ⁽²⁾ = 0,344	**
Não	46	12,9	311	87,1		
• Linfonomegalia						
Sim	8	28,6	20	71,4	p ⁽²⁾ = 0,019*	3,05 (1,24 a 7,28)
Não	39	11,7	293	88,3		

Fonte: O autor.

Nota: (*): Associação significativa ao nível de 5,0%.

(**): Não foi determinado devido à ocorrência de frequências nulas ou muito baixas.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

Nas Tabelas 5 e 6, analisou-se a positividade no teste EIE-LVC segundo os dados de caracterização e os sinais clínicos apresentados pela população canina estudada. Não foram verificadas associações significativas entre os resultados do teste EIE-LVC com nenhuma das variáveis de caracterização (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação dos resultados do teste EIE-LVC segundo a análise descritiva dos cães.

Variável	EIE-LVC				Valor de p	OR (IC a 95%)
	Reagente		Não reagente			
	n	%	n	%		
TOTAL	21	5,8	339	94,2		
• Idade						
Até 1 ano	-	-	23	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,382	**
Mais de 1 ano	21	6,2	316	93,8		
• Sexo					p ⁽²⁾ = 0,436	1,00 1,42 (0,58 a 3,47)
Macho	9	4,9	175	95,1		
Fêmea	12	6,8	164	93,2		
• Raça					p ⁽¹⁾ = 0,708	**
CRD	1	3,1	31	96,9		
SRD	20	6,1	308	93,9		
• Porte					p ⁽¹⁾ = 0,339	** ** **
Grande	2	7,1	26	92,9		
Médio	19	6,3	283	93,7		
Pequeno	-	-	30	100,0		
• Cor dos pelos					p ⁽²⁾ = 0,126	2,33 (0,77 a 7,08) 1,00
Claro	17	7,2	219	92,8		
Escuro	4	3,2	120	96,8		
• Comprimento dos pelos					p ⁽¹⁾ = 0,490	**
Curto	20	6,3	299	93,7		
Longo	1	2,4	40	97,6		
• Animais de produção					p ⁽²⁾ = 0,805	1,00 1,14 (0,41 a 3,20)
Sim	5	5,3	89	94,7		
Não	16	6,0	250	94,0		
• Forma de criação					p ⁽²⁾ = 0,500	1,00 1,36 (0,56 a 3,31)
Domiciliado	9	5,0	171	95,0		
Semidomiciliado	12	6,7	168	93,3		
• Lugar de criação					p ⁽¹⁾ = 0,092	** ** **
Dentro de casa	-	-	56	100,0		
Quintal	20	7,0	267	93,0		
Rua	1	5,9	16	94,1		
• Função do cão					p ⁽¹⁾ = 0,194	** ** **
Guarda	20	7,0	264	93,0		
Companhia	1	1,4	73	98,6		
Caça	-	-	2	100,0		

Fonte: O autor.

Nota: (**): Não foi determinado devido à de ausência de categorias, frequências nulas ou muito baixas.

(1): Através do teste Exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Verifica-se uma associação significativa entre os resultados do EIE-LVC e os seguintes sinais clínicos: classificação clínica, condição corporal, alopecia, lesões na pele, secreção ocular, paresia e linfonodomegalia (Tabela 6). Com exceção de paresia os intervalos de confiança da OR excluíram o valor 1,00.

Tabela 6 – Avaliação dos resultados do EIE-LVC segundo a análise clínica dos cães.

Variável	EIE-LVC				Valor de p	OR (IC a 95%)
	Reagente		Não reagente			
	n	%	n	%		
TOTAL	21	5,8	339	94,2		
• Classificação						
Sintomático	17	11,2	135	88,8	p ⁽¹⁾ < 0,001*	6,42 (2,12 a 19,50)
Assintomático	4	1,9	204	98,1		
• Condição nutricional						
Normal	14	5,1	263	94,9	p ⁽²⁾ = 0,020*	**
Magro	5	6,9	67	93,1		
Caquético	2	66,7	1	33,3		
Sobrepeso	-	-	8	100,0		
• Coloração da mucosa ocular						
Pálida	8	9,9	73	90,1	p ⁽²⁾ = 0,103	2,24 (0,90 a 5,62)
Rósea	13	4,7	266	95,3		
• Alopecia						
Sim	9	22,0	32	78,0	p ⁽²⁾ < 0,001*	7,20 (2,82 a 18,38)
Não	12	3,8	307	96,2		
• Lesões de pele						
Sim	11	21,2	41	78,8	p ⁽²⁾ < 0,001*	8,00 (3,20 a 19,99)
Não	10	3,2	298	96,8		
• Onicogribose						
Sim	4	14,8	23	85,2	p ⁽²⁾ = 0,062	3,23 (1,00 a 10,40)
Não	17	5,1	316	94,9		
• Secreção ocular						
Sim	5	22,7	17	77,3	p ⁽²⁾ = 0,006*	5,92 (1,94 a 18,08)
Não	16	4,7	322	95,3		
• Paresia do trem posterior						
Sim	2	100,0	-	-	p ⁽²⁾ = 0,003*	**
Não	19	5,3	339	94,7		
• Incoordenação motora						
Sim	1	33,3	2	66,7	p ⁽²⁾ = 0,165	**
Não	20	5,6	337	94,4		
• Linfonomegalia						
Sim	5	17,9	23	82,1	p ⁽²⁾ = 0,017*	4,29 (1,44 a 12,77)
Não	16	4,8	316	95,2		

Fonte: O autor.

Nota: (*): Associação significativa ao nível de 5,0%.

(**): Não foi determinado devido à de ausência de categorias, frequências nulas ou muito baixas.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

Conforme os dados incluídos na Tabela 6, destaca-se que o percentual de animais reagentes foi mais elevado entre os cães sintomáticos (Figuras 7), caquéticos, com alopecia, com lesão de pele, com secreção ocular, com paresia e linfonomegalia.

Figura 7 – Cães positivos no EIE-LVC para LVC apresentando sinais clínicos como onicogribose, caquexia e lesões de pele, além de secreção ocular, linfonodomegalia e paresia do trem posterior observados no momento da consulta veterinária, mas não mostrados nas fotos.



Fonte: O autor.

Nas Tabelas 7 e 8 estão incluídos os resultados da LVC considerando como critério de soropositividade a positividade no TR-DPP[®] (triagem) e no EIE-LVC (confirmatório). De acordo com esse critério, apenas 4,2% dos animais foram classificados como reagentes, não sendo registrada associação significativa com as variáveis estudadas ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Análise descritiva dos animais reagentes e não reagentes para LVC segundo a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (TR-DPP® + EIE-LVC).

Variável	TR-DPP® + EIE-LVC				Valor de p	OR (IC a 95%)
	Reagente		Não reagente			
	n	%	n	%		
TOTAL	15	4,2	345	95,8		
• Idade						
Até 1 ano	-	-	23	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,611	**
Mais de 1 ano	15	4,5	322	95,5		
• Sexo					p ⁽²⁾ = 0,159	1,00 2,16 (0,72 a 6,44)
Macho	5	2,7	179	97,3		
Fêmea	10	5,7	166	94,3		
• Raça					p ⁽¹⁾ = 1,000	**
CRD	1	3,1	31	96,9		
SRD	14	4,3	314	95,7		
• Porte					p ⁽¹⁾ = 0,330	**
Grande	2	7,1	26	92,9		
Médio	13	4,3	289	95,7		
Pequeno	-	-	30	100,0		
• Cor dos pelos					p ⁽²⁾ = 0,517	1,47 (0,46 a 4,71) 1,00
Claro	11	4,7	225	95,3		
Escuro	4	3,2	120	96,8		
• Comprimento dos pelos					p ⁽²⁾ = 0,235	**
Curto	15	4,7	304	95,3		
Longo	-	-	41	100,0		
• Animais de produção					p ⁽¹⁾ = 1,000	1,03 (0,32 a 3,32) 1,00
Sim	4	4,3	90	95,7		
Não	11	4,1	255	95,9		
• Forma de criação					p ⁽²⁾ = 0,792	1,00 1,15 (0,41 a 3,24)
Domiciliado	7	3,9	173	96,1		
Semidomiciliado	8	4,4	172	95,6		
• Lugar de criação					p ⁽¹⁾ = 0,174	**
Dentro de casa	-	-	56	100,0		
Quintal	14	4,9	273	95,1		
Rua	1	5,9	16	94,1		
• Função do cão					p ⁽¹⁾ = 0,379	**
Guarda	14	4,9	270	95,1		
Companhia	1	1,4	73	98,6		
Caça	-	-	2	100,0		

Fonte: O autor.

Notas: (**): Não foi determinado devido à de ausência de categorias, frequências nulas ou muito baixas.

(1): Através do teste Exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Verificou-se que, com exceção das variáveis: coloração da mucosa ocular e incoordenação motora, as demais variáveis estavam associadas com os resultados de positividade em ambos os testes. Destaca-se que o percentual de animais reagentes foi mais elevado entre os sintomáticos do que assintomáticos. O percentual de animais reagentes também foi mais elevado entre os animais que tinham as seguintes manifestações clínicas (em detrimento aos que não as apresentaram): alopecia (19,5% x 2,2%); lesão de pele (19,2% x 1,6%); onicogribose (14,8% x 3,3%); secreção ocular (18,2% x 3,3%); linfonodomegalia (17,9% x 3,0%). Os dois animais que apresentaram paresia do trem posterior também foram reagentes em ambos os testes.

Tabela 8 – Análise clínica dos animais reagentes e não reagentes para LVC segundo a recomendação do Ministério da Saúde do Brasil (TR-DPP® + EIE-LVC).

Variável	TR-DPP® + EIE-LVC				Valor de p	OR (IC a 95%)
	Reagente		Não reagente			
	n	%	n	%		
TOTAL	15	4,2	345	95,8		
• Classificação						
Sintomático	13	8,6	139	91,4	p ⁽¹⁾ < 0,001*	9,63 (2,14 a 43,35)
Assintomático	2	1,0	206	99,0		
• Condição nutricional						
Normal	9	3,2	268	96,8	p ⁽²⁾ = 0,007*	**
Magro	4	5,6	68	94,4		
Caquético	2	66,7	1	33,3		
Sobrepeso	-	-	8	100,0		
• Coloração da mucosa ocular						
Pálida	6	7,4	75	92,6	p ⁽²⁾ = 0,114	2,40 (0,83 a 6,96)
Rósea	9	3,2	270	96,8		
• Alopecia						
Sim	8	19,5	33	80,5	p ⁽²⁾ < 0,001*	10,80 (3,68 a 31,69)
Não	7	2,2	312	97,8		
• Lesões de pele						
Sim	10	19,2	42	80,8	p ⁽²⁾ < 0,001*	14,43 (4,70 a 44,26)
Não	5	1,6	303	98,4		
• Onicogribose						
Sim	4	14,8	23	85,2	p ⁽²⁾ = 0,019*	5,09 (1,50 a 17,24)
Não	11	3,3	322	96,7		
• Secreção ocular						
Sim	4	18,2	18	81,8	p ⁽²⁾ = 0,009*	6,61 (1,91 a 22,80)
Não	11	3,3	327	96,7		
• Paresia do trem posterior						
Sim	2	100,0	-	-	p ⁽²⁾ = 0,002*	**
Não	13	3,6	345	96,4		
• Incoordenação motora						
Sim	1	33,3	2	66,7	p ⁽²⁾ = 0,120	**
Não	14	3,9	343	96,1		
• Linfonodomegalia						
Sim	5	17,9	23	82,1	p ⁽²⁾ = 0,003*	7,00 (2,21 a 22,19)
Não	10	3,0	322	97,0		

Fonte: O autor.

Nota: (*) Associação significativa ao nível de 5,0%.

(**) Não foi determinado devido frequências nulas ou muito baixas.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

Por fim, na Tabela 9 foram analisados os resultados conjuntos dos testes de TR-DPP® e EIE-LVC, onde é possível verificar que a maioria (85,3%) dos cães foi não reagente nos dois exames, 8,9% foram reagentes apenas no TR-DPP® e 1,7% apenas no EIE-LVC. Houve 89,4% de resultados concordantes, obtendo-se um valor do kappa de 0,39 (intervalo de confiança de 95%: 0,24 a 0,54), indicando uma fraca concordância entre os testes.

Tabela 9 – Comparação dos resultados obtidos pelo TR-DPP® e pelo EIE-LVC.

TR-DPP®	EIE-LVC				Concordância		
	Reagente		Não reagente		Observada		Kappa (IC a 95%)
	N	%	N	%	N	%	
• Reagente	15	4,2	32	8,9	322	89,4	0,39 (0,24 a 0,54)
• Não reagente	6	1,7	307	85,3			
TOTAL	21	5,8	339	94,2			

Fonte: O autor.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que nos cães positivos no TR-DPP[®] (n=47), EIE-LVC (n=21) e de acordo com o critério do Ministério da Saúde do Brasil (n=15), 53,1%, 80,9% e 86,6%, respectivamente, apresentou sinais clínicos sugestivos de LVC. A existência de muitos animais sintomáticos dentre os reagentes para a infecção na sorologia também já foi observado por outros autores (DANTAS-TORRES et al., 2006b; MAIA; CAMPINO, 2008; MORALES-YUSTE et al., 2012). Embora a sintomatologia da LVC seja bastante diversificada, a doença está fortemente associada às alterações dermatológicas (CORTES et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2014; RONDON et al., 2008).

Segundo Nunes et al. (2007), 20 a 40% da população canina que se encontra em áreas endêmicas para LVC possui anticorpos anti-*Leishmania* spp., porém a prevalência da doença clínica ocorre entre 3 a 10%. De fato, a maioria dos cães infectados por *Leishmania* spp. são assintomáticos (CASTRO-JÚNIOR et al., 2014). No município de Goiana, através da análise sorológica por meio do TR-DPP[®], pelo EIE-LVC e seguindo o protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (TR-DPP[®] + EIE-LVC), foram encontradas prevalências de anticorpos anti-*Leishmania* spp. de 13,1%, 5,8% e 4,2%, respectivamente.

Ao avaliar a soroprevalência da infecção por *L. infantum* em cães em algumas cidades no estado de Pernambuco, foram encontradas frequências de 40,3% no município de Paulista (DANTAS-TORRES et al., 2006), 12,3% no município de São Vicente Férrer (SILVA; BRAGA, 2008) e de 4,41% em Ipojuca (BEZERRA et al., 2011). No estado do Ceará, 26,2% dos cães domiciliados e 21,4% dos cães errantes, que participaram do estudo possuíam anticorpos anti-*Leishmania* spp. (RONDON et al., 2008). No Rio Grande do Norte, Amóra et al. (2006) encontraram soroprevalência de 45% em cães da zona rural e 35% da zona urbana de Mossoró. Na Bahia, Julião et al. (2007) demonstraram prevalência de 21,7% de infecção entre os cães estudados. E na Paraíba, Vidal (2008) encontrou positividade em 3% dos cães. Em Alagoas, Martins (2008) obteve 1,95% de positividade entre os cães avaliados. Já no Tocantins, na cidade de Araguaiana, 51,35% dos cães avaliados foram soropositivos para a infecção por *Leishmania* sp. (MORAIS et al., 2013). Em Minas Gerais, Penaforte et al. (2013) na cidade de Divinópolis e Castro-Júnior et al. (2014) na cidade de Juiz de Fora encontraram soropositividade de 28,08% e 3,8% respectivamente entre os cães avaliados. Por fim, no Rio de Janeiro, no município de Itaguaí, Silva et al. (2013) detectaram uma soropositividade de 28,24%.

Como visto, a infecção encontra-se distribuída em todas as regiões do Brasil, assim como em outros países, como, por exemplo, em Portugal, onde Cortes et al. (2012) obtiveram positividade em 5,86% dos cães estudados. Na cidade de Orense, na Espanha, Miró et al. (2012) detectaram soroprevalência de 35,6% dentre os cães avaliados. No México, López-Céspedes et al. (2012) encontraram 6,07% de soroprevalência nos cães da Península de Yucatan. Na cidade de Gizé, no Egito, Rosypal et al. (2012) relataram que 10% dos cães avaliados foram sororeagentes. Na Palestina, Hamarsheh et al. (2012) encontraram uma prevalência de 7,5%. Na China foi obtida prevalência de 59,43% de infecção para *Leishmania* sp., sendo destes cães, 57% assintomáticos para a doença (WANG et al., 2011). Por fim, Salvatore et al. (2013) em San Marino, na Itália, encontraram soroprevalência de 3,9% entre os cães analisados. Recentemente foi descrito na Romênia um caso autóctone de LVC, após 80 anos sem relatos da doença (MIRCEAN et al., 2014). Como visto, a LVC trata-se de uma doença com distribuição cosmopolita e em processo de expansão.

Em relação aos sinais clínicos mais frequentemente encontrados entre os cães sintomáticos no município de Goiana-PE foi encontrado, sobretudo: mucosas oculares hipocoradas, lesões de pele, alopecia, linfonodomegalia e onicogribose. Já Gonçalves (2010) encontrou descamação, alopecia, úlceras (principalmente na orelha), caquexia, onicogribose, ceratoconjuntivite e mucosas oculares hipocoradas. Comportamento semelhante também já foi encontrado em Belo Horizonte por Quaresma et al. (2009). No município de Paulista, Dantas-Torres et al. (2006) encontraram cães apresentando perda de peso, dermatite, alopecia, úlceras cutâneas, conjuntivite e onicogribose. Já em área urbana de Natal, Queiroz et al. (2009) encontraram sinais como emagrecimento, conjuntivite e onicogribose, lesões crostosas, especialmente ao redor dos olhos, nas orelhas e nos membros, alopecia, lesões ulceradas, hiperqueratose e descamação. Almeida et al. (2010), em área urbana de Cuiabá, encontraram resultados semelhantes, sendo os de maior frequência: alopecia, úlcera de ponta de orelha, descamação, onicogribose e conjuntivite. Recentemente em Minas Gerais, Castro-Júnior et al. (2014) encontraram dentre os cães com LVC, a onicogribose como o sinal clínico mais prevalente. Como visto, a LVC possui um repertório variado de manifestações clínicas, não existindo sinais patognomônicos para a doença. No entanto, o que se pode inferir a partir da análise clínica dos animais com LVC é que grande parte deles, apresentam sinais dermatológicos, o que também foi concluído por Perego et al. (2014).

Em detrimento do vasto repertório clínico que os animais sororeagentes podem manifestar com a doença, a maioria dos cães estudados (57,8%) eram assintomáticos para LVC, resultado semelhante encontraram Dantas-Torres et al. (2006) onde 88,5% dos

apresentaram-se assintomáticos para a doença na cidade do Paulista. Já Queiroz et al. (2009) encontraram, em área urbana de Natal, 37% dos animais assintomáticos para a LVC. Geralmente costuma-se encontrar uma prevalência alta de assintomáticos dentre os animais infectados por *L. infantum*. Além da influência do sistema imunológico do animal, o exame veterinário pode mascarar alguns sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas, potencialmente levando a um erro diagnóstico.

Os aspectos relacionados à presença da LVC em uma determinada população de cães ainda não são bem compreendidos (RONDON et al., 2008). Assim como no presente estudo, outros pesquisadores não conseguiram identificar fortes associações entre potenciais fatores de risco e a doença (BELO et al., 2013; MIRANDA et al., 2008; PENAFORTE et al., 2013). A maioria dos cães sororeagentes em Goiana tinha idade acima de 1 ano. Para alguns autores a prevalência de infecção canina de *L. infantum* tem distribuição bimodal, com um pico entre cães com menos de três anos e outra entre oito e dez anos de idade (CORTES et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2014; MIRÓ et al., 2012), embora este padrão não tenha sido observado por outros autores (PENAFORTE et al., 2013). Neste trabalho não foram encontradas diferenças significativas na prevalência entre machos e fêmeas, o que está de acordo com outros autores (CORTES et al., 2012; DANTAS-TORRES et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2014; HAMARSHEH et al., 2012), embora alguns estudos tenham encontrado maior prevalência em cães machos (DANTAS-TORRES et al., 2006; HAMARSHEH et al., 2012), justificado pelo fato de que muitos cães machos têm hábitos de caça, de dominação de território e de busca por fêmeas o que poderia expor mais esses animais ao contato com os vetores (MIRANDA et al., 2008).

No presente estudo, também não houve diferenças significativas na prevalência de cães SRD e CRD, concordando com os achados de Figueiredo et al. (2014). No entanto, Cortes et al. (2012) concluíram que a raça dos cães foi um fator de proteção, sendo os SRD mais resistentes à infecção, em seu estudo em Portugal. Em teoria, todas as raças de cães são suscetíveis à infecção por *Leishmania* spp. embora, como já mencionado, algumas raças, tais como o cão de Ibiza e os cães SRD, desenvolveram um certo nível de resistência (SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

Houve maior prevalência da infecção em cães de pelo curto, o que suporta a hipótese de que os pelos curtos poderiam facilitar o repasto sanguíneo do vetor no cão, aumentando assim a chance do animal contrair a infecção (CORTES et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2013; MIRÓ et al., 2012; RONDON et al., 2008). Rondon et al. (2008) encontraram associação significativa entre o tamanho e a função dos animais, sendo aqueles de porte

médio ou grande e/ou com função de guarda os que tinham maior probabilidade de estarem infectados. No presente estudo foi observada maior prevalência entre os cães de porte médio ou grande e/ou com função de guarda, o que pode ser explicado pelo fato de esses animais serem geralmente mantidos fora de casa, tornando-os mais disponíveis para o vetor (CORTES et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2013). Além disso, Penaforte et al. (2013) sugerem que a maior área corporal também poderia ser um facilitador para os flebotomíneos.

A maioria dos animais deste estudo passava grande parte do tempo no quintal, tanto os domiciliados quanto os semidomiciliados, mesmo não havendo uma associação significativa para tal forma de criação e a infecção nos cães. Ademais, em várias residências foram encontrados animais de produção tanto nos quintais como soltos nas ruas, sendo importante ressaltar, as precárias condições sanitárias na maioria destes criadouros. Para Coura-Vital et al. (2013) a presença de esterco e/ou folhas secas no quintal foi associado à infecção canina por *L. infantum*. A presença de matéria orgânica depositada no peridomicílio pode favorecer o desenvolvimento do vetor propiciando habitat e alimentação para as fases imaturas (LAINSON; RANGEL, 2003). Dentre os animais de produção encontrados nas residências visitadas em Goiana, grande parte eram galináceos (87,2%), talvez pela fácil manutenção da criação dessas espécies e sua comum utilização para subsistência de muitas famílias, seja pela produção de ovos e/ou carne. Os galinheiros são ecótopos que atraem bastantes flebotomíneos, principalmente a espécie *L. longipalpis* (BRANDÃO-FILHO et al., 2011), aumentando assim o risco de contato entre o vetor e os cães (OLIVEIRA et al., 2010). Além de galinhas, este inseto também se alimenta em outras espécies como bovinos, equinos, caprinos dentre outros, o que comprova o seu caráter oportunista. Além da presença destes animais de produção, os locais onde eles são criados podem contribuir para a manutenção da endemicidade da doença na região, pois segundo Rondon et al. (2008) o risco de infecção canina é maior em casas com abundante vegetação vizinha, cenário este encontrado nas três áreas estudadas no município de Goiana. A identificação desses fatores pode contribuir para a delimitação de áreas de maior risco para a LVC, no entanto estudos sobre fatores de risco para a doença em áreas endêmicas ainda são escassos (DA SILVA et al. 2012). Em relação aos desafios do diagnóstico da LVC, é consenso entre os pesquisadores, que um teste de diagnóstico eficaz deve ser capaz de confirmar uma suspeita clínica em um paciente, detectar a infecção em animais assintomáticos, possuir alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, ser de fácil execução, de baixo custo, serem viáveis em laboratórios ou adaptáveis para condições de campo e utilizar coletas não invasivas de amostras biológicas (MAIA; CAMPINO, 2008). No entanto, essas condições ainda não são uma realidade na

rotina do diagnóstico da LVC. Os testes sorológicos empregados rotineiramente pelas autoridades de saúde pública para o diagnóstico da infecção em cães são o TR-DPP[®] e o EIE-LVC.

O EIE-LVC é um teste qualitativo de simples realização. Contudo, assim como a pode apresentar resultados falso-positivos (sangue hemolisado, anticorpos persistentes de infecção antiga) e falso-negativos (anticorpos inativos, janela imunológica). O kit EIE-LVC requer amostras de soro, certo conhecimento prévio e aparato laboratorial como pipetas volumétricas e estufa a 37°C. Esse kit é produzido por Bio-Manguinhos e distribuído gratuitamente pelo Ministério da Saúde do Brasil para os Laboratórios Centrais Estaduais de Saúde Pública (LACEN) para o diagnóstico da LVC.

Já o teste TR-DPP[®] LVC permite o uso de amostras de soro ou de sangue, não fazendo necessário aparato laboratorial nem experiência prévia. Neste estudo, o TR-DPP[®] apresentou-se como um bom preditor de infecção e/ou doença ativa, além de ser um procedimento simples, rápido e fácil, podendo ser realizado tanto em campo como em laboratório.

Os resultados do TR-DPP[®] para diagnóstico da LVC sofrem grande influência do estado clínico e imunológico do animal. Quinnell et al. (2013) utilizando um outro teste rápido (Kalazar Detect Canine Rapid Test[®]) encontraram uma sensibilidade global de 46% e de 77% entre os cães sintomáticos. Havendo forte associação entre a gravidade da doença e a positividade do teste, variando a sensibilidade entre os animais assintomáticos (33%), oligoassintomáticos (96%) e polissintomáticos (89%). Resultados semelhantes já tinham sido encontrados por GRIMALDI et al. (2012) onde o TR-DPP[®] teve sensibilidade de 98% entre cães sintomáticos, no entanto houve drástica redução deste valor entre cães assintomático, onde foi encontrada sensibilidade de apenas 47%. Já Otranto et al. (2004) ao utilizar um outro teste rápido (RapydTest[®]) em soros de cães da Itália (área endêmica) e na Suécia (área não endêmica), encontraram sensibilidade de 97% e especificidade de 100%. Resultado que fizeram os autores a concluir que o emprego do teste é uma alternativa rápida, sensível e específica para o diagnóstico da LVC. A utilização de antígenos recombinantes pode aumentar a sensibilidade do teste (TEIXEIRA et al., 2007). Nesta perspectiva, Fraga et al. (2014) avaliaram a sensibilidade de um protótipo de um teste rápido (DPP rLci1A/rLci2B) em soros de cães sintomáticos de áreas endêmicas para LVC e concluíram que o formato multi-antigênico, aumentaria a sensibilidade do teste de 88% para 93,5% e que esse protótipo poderia oferecer resultados semelhantes ao TR-DPP[®].

Desde 2011 o Ministério da Saúde do Brasil passou a adotar o EIE-LVC como teste sorológico confirmatório para LVC (BRASIL, 2011). Para Oliveira et al. (2006) essa recomendação é válida devido a otimização das ações de controle e monitoramento dessa zoonose em suas áreas de ocorrência endêmica. No entanto, Assis et al. (2010) ao compararem técnicas de diagnóstico da LVC baseadas na identificação direta do parasito, na sorologia e em ferramentas moleculares, encontraram um índice de positividade de 65% no EIE com antígeno solúvel de “*L. (L.) chagasi*” (= *L. infantum*) enquanto que na PCR encontraram 97%. Eles concluíram que nenhuma prova diagnóstica, quando testada isoladamente, identificou adequadamente os cães com LVC, sendo a PCR o método que apresentou melhor desempenho.

Considerando que o TR-DPP[®] passou a ser o teste de triagem e o EIE-LVC o teste confirmatório no programa de controle da LVC no Brasil, é de grande importância que haja concordância entre os dois testes para que animais falso-negativos no TR-DPP[®] não deixem de ser submetidos ao teste EIE-LVC. Neste contexto, Gonçalves (2010), ao comparar o EIE-LVC com o TR-DPP[®], observou uma concordância positiva de 86,67% ($\kappa = 0,73$), diferindo do presente estudo, onde foi verificada uma fraca concordância entre os testes. De fato, 1,7% dos animais foram negativos no TR-DPP[®] e positivos no EIE-LVC, o que sugere que um percentual considerado de animais falso-negativos permanecerá longe das medidas de controle e/ou tratamento.

Recentemente, Coura-Vital et al. (2014) sugeriram que o protocolo para diagnóstico sorológico da LVC fosse modificado, passando o EIE-LVC a ser o teste de triagem e o TR-DPP[®] o teste confirmatório. Eles alegaram, dentre outros motivos, que o TR-DPP[®] possui sensibilidade que varia entre 93 e 100% e especificidade de 92 a 100% (GRIMALDI et al., 2012; MARCONDES et al., 2013). Coura-Vital et al. (2014) enfatizam ainda que segundo GRIMALDI et al. (2012) embora o TR-DPP[®] tenha a vantagem de fácil armazenamento e utilização, rapidez no diagnóstico e proporcionar flexibilidade no tipo de amostra biológica utilizada (sangue, soro ou plasma), o uso de um leitor óptico, necessário no caso do EIE-LVC, aumentaria a credibilidade dos testes. Segundo os mesmos autores, municípios com grande demanda por diagnóstico da LVC deveriam passar a utilizar o EIE-LVC para a triagem e o TR-DPP[®] como teste confirmatório, no entanto, sabe-se que a sensibilidade do teste depende da situação clínica dos cães, sendo mais elevada em cães sintomáticos, os quais são a minoria dentre os cães infectados por *L. infantum*. De fato, a maioria dos cães classificados como positivos, de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, no presente estudo, apresentavam sinais clínicos sugestivos LVC. Isso pode ser considerado

como um grande avanço do programa de controle da LV, tendo em vista que esses animais são os principais reservatórios responsáveis para manutenção da infecção em áreas endêmicas (QUINNELL; COURTENAY, 2009). No entanto, novas pesquisas no intuito de aumentar a sensibilidade do teste de triagem (TR-DPP®), principalmente em cães assintomáticos, devem ser estimuladas.

Além do mais, nos últimos anos, o município de Goiana vem sendo palco de inúmeras transformações econômicas, sendo apontado como o novo pólo industrial, logístico e fármaco-químico do estado de Pernambuco, com grandes empresas se estabelecendo na região, dentre elas Fiat (automóveis), Hemobrás (hemoderivados), Vita Derm (cosméticos) e Multilab (genéricos e similares), inclusive, com promessas de construção de um porto marítimo na cidade. A cidade também possui grande potencial turístico, com belas praias e monumentos históricos. As praias de Atapuz e Pontas de Pedra são destino de veraneio de muitos turistas, que na maioria das vezes desconhecem que a LV é endêmica na região, o que pode contribuir para que veranistas e seus cães sejam infectados por *L. infantum* durante a sua permanência nessas localidades. Sem dúvida, com todas essas mudanças e crescimento, espera-se que a população da cidade cresça substancialmente nos próximos anos devido à chegada de turistas, veranistas, trabalhadores, dentre outros. Além disso, o desmatamento de áreas de florestas e as precárias condições de saneamento e infraestrutura da região poderão contribuir para que mais pessoas e/ou animais fiquem expostos à infecção caso o enfrentamento dessa doença não seja priorizado pelas autoridades de saúde pública. Tendo em vista que os resultados de soroprevalência da LVC são apenas a ponta do *iceberg*, acredita-se que o número de animais infectados com *L. infantum* seja bem mais expressivo em Goiana.

De qualquer forma, outros estudos, preferencialmente longitudinais, são necessários para melhor compreensão dos diversos fatores relacionados à clínica, transmissão e diagnóstico da infecção por *L. infantum* em cães.

9. CONCLUSÕES

- a) A LVC encontra-se estabelecida no município de Goiana-PE, com prevalência relativamente baixa;
- b) O repertório de sinais clínicos em cães soropositivos é bastante diversificado, sendo os problemas dermatológicos os mais frequentes;
- c) O uso do TR-DPP[®] como teste de triagem e do EIE-LVC como teste confirmatório pode levar a perda de cães infectados, devido à baixa concordância entre os testes encontrada neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ADAMAMA-MORAITOU, K. K. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, n. 1, p. 53-57, 2007.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala-azar. VI. Canine visceral leishmaniasis. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 110, n. 768, p. 402-412, 1932.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.
- ALTMAN, D. G. **Practical Statistic for Medical Research**. v. 12, ed. London: Chapman and Hall, 1991. 611 p.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ALVES, G. B. et al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 3, p. 310-315, 2010.
- AMARA, A. et al. Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.
- AMÓRA, S. S. A. et al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1854-1859, 2006.
- ASSIS, J. et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira-SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.
- ARESU, L. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 1, p. 569-572. 2007.
- ATHANASIOU, L. V. et al. A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. **Acta Tropica**, Basel, v. 122, n. 3, p. 291-295, 2012.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.
- BELO, V. S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the Americas: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 4, e2182, 2013.
- BENITES, A. P. et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2011.
- BEZERRA, F. Q. G. et al. Inquérito sorológico da leishmaniose visceral canina no município de Ipojuca. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 194/195, p. 1533-1535, 2011.
- BLACKWELL, J. M. et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 254-266, 2009.
- BLAVIER, A., et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.
- BORASHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n. 71, p. 44-48, 2007.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in the Atlantic Florest region of northeast Brazil. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 36, suppl. 1, p. S71-S76, 2011.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p.
- BRASIL. Secretária de Vigilância em Saúde. Subcoordenação de Zoonoses zoonoses e raiva. **Nota Técnica n. 48/2011-UVR/CGDT/DEVPEP/SVS/MS**. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde, Brasília, 2011.
- CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 527-548, 2006.
- CASTRO-JÚNIOR, J. G. et al. Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic Dual-Path Platform (DPP®) and PCR assays. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 3, p. 225-229, 2014.
- CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral americana (nova entidade morbida do homem na América do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 321-389, 1937.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistic**. 3 ed. New York: John Wiley and Sons, 1980, 495p.

CORTADA, V. M. C. L. et al. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 365-374, 2004.

CORTES, S. et al. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

CORTESE, L. et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Veterinary Journal**, London, v. 1, n. 188, p. 118-121, 2011.

COSTA, F. A. L. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 40, n. 6, p. 677-684, 2003.

COURA-VITAL, W. et al. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. e71833, 2013.

COURA-VITAL, W. 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**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e91009, 2014.

COURTENAY, O. et al. Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e2583, 2014.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n. sp. Nota prévia. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

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

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

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

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DA SILVA, J. P. et al. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 480-484, 2012.

DAVID, J. et al. Deltametrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 839-847, 2001.

DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil**. Estudos sobre Reservatórios e Transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária. 1956.

DINIZ, S. A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 42, n. 5, p. 650-658, 2005.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 26, n. 1, p. 58-85, 2013.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. 209 p.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n. 28, p. 36-42, 2000.

FERROGLIO, E. et al. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 144, n. 1/2, p. 162-166, 2007.

FIGUEIREDO, M. J. F. M. et al. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para leishmaniose visceral canina. **Revista Brasileira de Ciência Animal**, Goiás, v. 15, n. 1, p. 102-106, 2014.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose**. São Paulo: Edgard Blücher : Universidade de São Paulo, 1973. v. 4, 658 p.

FRAGA, D. B. M. et al. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v. 7, p. 136, 2014.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Genes and Immunity**, Basingstoke, v. 137, n. 3/4, p. 221-221, 2006.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Monte Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, 2003.

FREITAS, J. C. et al. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

GALLETTI, E. et al. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. **Research in Veterinary Science**, London, v. 91, n. 2, p. 243-245, 2011.

GARCÍA-MARTINEZ, J. D. et al. Urinary clusterin as a renal marker in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 24, n. 2, p. 301-306, 2012.

GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs – Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 59, n. 2, p. 205-213, 2011.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis a clinical trial. **Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.

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

GONÇALVES, B. S. **Leishmaniose visceral canina na área urbana de Cuiabá - MT: Comparação de técnicas laboratoriais, tentativa de desenvolvimento de metodologia para diagnóstico e caracterização da espécie de *Leishmania* circulante em amostra selecionada.** 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado Departamento de Ciências Biológicas) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.

GRIMALDI, G. Jr. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, n. 1, p. 54-59, 2012.

HAMARSHEH, O. et al. Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. **Parasites and Vectors**, London, v. 5, p. 183, 2012.

- INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulins G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 103, n. 1/2, p. 77-81, 2005.
- IBGE. **Cidade**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=260620>> Acesso em: 4 maio 2014.
- JONES, D. Anamnese e exame físico. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2003. p. 1-13.
- JULIÃO, F. S. et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 8, p. 319-324, 2007.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.
- JONES, D. Anamnese e exame físico. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2003. p. 1-13.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p. 311-336.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the new world. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 10. ed. London: Arnold, 2005. p. 313-349.
- LEMOS, E. M. et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 107, n. 1, p. 205-207, 2008.
- LIMA, V. M. F. et al. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 3/4, p. 330-333, 2010.
- LIRA, R. A. 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**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 11-16, 2006.
- LÓPEZ-CÉSPEDES, A. et al. *Leishmania* spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucaten Peninsula. **Scientific World Journal**, New York, v. 2012, p. 945871, 2012.

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

MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 142-144, 2009.

MANZILLO, V. F. et al. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in Keneled stray dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 142-145, 2006.

MARCONDES, M. et al. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 197, n. 3/4, p. 649-652, 2013.

MAROLI, M. et al. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 358-363, 2001.

MAROLI, M. et al. Phlebotominae sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MÁRQUEZ, M. et al. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 25, n. 1, p. 142-146, 2013.

MARTINS, I. S. **Aspectos epidemiológicos e da hemostasia na leishmaniose visceral canina**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHART, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MIRANDA, S. et al. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, London, v. 85, n. 1, p. 35-38, 2008.

MIRCEAN, V. et al. Autochthonous canine leishmaniasis in Romania: neglected or (re)emerging? **Parasites & Vectors**, London, v. 7, p. 135, 2014.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 371-377, 2008.

MIRÓ, G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 20, n. 5/6, p. 397-404, 2009.

- MIRÓ, G. et al. Current situation of *Leishmania infantum* infection in Shelter dogs in northern Spain. **Parasites & Vectors**, London, v. 27, p. 5, 2012.
- MONTALVO, A. M. et al. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 64, n. 2, p. 108-131, 2012.
- MOLINA, R. et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 1/2, p. 268-271, 2012.
- MORAIS, A. N. et al. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaiana, Tocantins. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 2013.
- MORALES-YUSTE, M. et al. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 1, p. 155-164, 2012.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.
- MORENO, E. C. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 6, p. 456-463, 2005.
- MORENO, J. et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish[®]) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 158, n. 3/4, p. 199-207, 2014.
- NASCIMENTO, M. D. S. B. et al. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1801-1807, 2005.
- NICOLLE, C.; COMTE, M. Recherches sur kala-azar enterprises à l'Institut Pasteur de Tunis, IV. Origine canine du kala-azar. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, v. 3, p. 59-62, 1908.
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.
- NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- OLIVEIRA, C. D. et al. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999-2000. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 20, n. 6, p. 369-376. 2006.

OLIVEIRA, L. C. et al. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Avila, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.

SILVA, O. A.; BRAGA, G. M. S. Leishmaniose visceral canina no município de São Vicente Férrer, Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 15, n. 2, p. 101-102, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of the leishmaniasis. Geneva, 2010. 202 p.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 228-235, 2009.

OTRANTO, D. et al. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p.2769-2770, 2004.

OTRANTO, D. et al. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. **Immunology**, v. 16, n. 3, p. 337-343, 2009.

OTRANTO, D. et al. Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid 4.5% flumethrin. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e56374, 2013.

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

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, n. 27, p. 3505-3512, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v. 4, p. 197, 2011.

PASTOR-SANTIAGO, J. A. et al. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 86, n. 1, p. 108-114, 2012.

PARROT, L.; DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Sur le développement de la leishmaniose canine visceral chez *Phlebotomus major* var. *perniciosus* Newstead. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, Paris, v. 23, n. 7, p. 724-726, 1930.

PENAFORTE, K. M. et al. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 4, p. 592-596, 2013.

PEREGO, R. et al. Prevalence of dermatological presentations of canine leishmaniasis in a nonendemic area: a retrospective study of 100 dogs. **Veterinary Medicine International**, New York, v. 2014, p. 1-5, 2014.

QUARESMA, P. F. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta Tropica**, Basel, v. 111, n. 3, p. 289-294, 2009.

QUEIROZ, P. V. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, London, v. 86, n. 2, p. 267-273, 2009.

QUEIROZ, N. M. et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with IFAT and ELISA-test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

QUILEZ, J. et al. Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35349, 2012.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

QUINNELL, R. J. et al. Evaluation of rK39 rapid diagnostic test for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1992, 2013.

REITHINGER, R.; TEODORO, U.; DAVIES, C. R. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 5, p. 872-876, 2001.

REITHINGER, R. et al. *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 1, p.76-78, 2002.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, ano 12, p. 66-76, 2007.

RIBEIRO, F. C. et al. A utilização do ELISA empregando antígenos homólogos e heterólogos para a detecção de IgG e subclasses (IgG1 e IgG2) no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 283-289, 2011.

RIBEIRO, V. M. et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasite and Vectors**, London, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.

ROMERO, G. A. S. et al. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. **Acta Tropica**, Basel, v. 109, n. 1, p. 74-77, 2009.

- ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.
- RONDON, F. C. M. et al. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, n. 1/2, p. 24-31, 2008.
- ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.
- ROSYPAL, A. C. et al. Serological survey of dogs from Egypt for antihodies to *Leishmania* species. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 99, n. 1, p. 170-171, 2012.
- SABATÉ, D. et al. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 115, n. 1/2, p. 56-63, 2014.
- SALVATORE, D. et al. Canine leishmaniasis surveillance program in a San Marino Republic Kennel. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 49, n. 4, p. 341-346, 2013.
- SHANG, L. M. et al. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwestern China detected by real time PCR. **Parasite and Vectors**, London, v. 4, n. 1, p. 173, 2011.
- SHAW, J. Leishmanial taxonomy: a never ending academic challenge. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmanias e leishmaniose tegumentar nas Américas**. Salvador: Gráfica Contexto, 2011. p. 6-10.
- SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1/2, p. 55-59, 2009.
- SILVA, D. A. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 179, n. 1/2/3, p. 257-261, 2011.
- SILVA, C. B. et al. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2013.
- SILVESTRINI, P. et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 41, n. 4, p. 568-574, 2012.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 90, n. 1/2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1/2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for practical management of canine leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v. 4, p. 86, 2011.

SOUZA, A. I. et al. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 1/2, p. 51-54, 2005.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 292, n. 1/2, p. 17-23, 2004.

TEIXEIRA, M. C. et al. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, London, v. 35, n. 1, p. 51-54, 2007.

TORRENT, E. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, New York, v. 46, n. 11, p. 549-552, 2005.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 190-192.

VERGEL, C.; WALKER, J.; SARAVIA, N. G. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 72, n. 4, p. 423-429, 2005.

VIDAL, I. F. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina em Campina Grande, Paraíba**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

WANG, J. et al. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Western China detected by PCR and Serological tests. **Parasites and Vectors**, London, v. 4, p. 69, 2011.

WIKIMEDIA COMMONS. Goiana no mapa de Pernambuco. [S.l.], 2009. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Goiana_in_the_map_of_Pernambuco.JPG?uselang=pt-br> Acesso em 20 de dezembro de 2013.



APÊNDICE A – FICHA DE AVALIAÇÃO DOS CÃES
FICHA DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

PROJETO: SOROPREVALÊNCIA, FATORES E ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM GOIANA, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

CÓDIGO ÚNICO: _____

1. IDENTIFICAÇÃO DO CÃO

Nome do proprietário: _____

Nome do animal: _____

Idade: _____

Raça: _____

Sexo: () macho () fêmea

Endereço:

2. INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

- Área de moradia: () rural () urbana
- Proximidade da moradia com mata/floresta: () sim () não
- Animais* de produção no domicílio/peridomicílio: () sim () não
*Quais? _____
- Animais silvestres (raposa, roedores, marsupiais) próximos ao domicílio: () sim () não
*Quais? _____
- Forma de criação do animal: () domiciliado () semidomiciliado
- Lugar onde o animal passa mais tempo? () dentro de casa () no quintal () na rua
- Função do animal: () caça () companhia () guarda () pastoreio

Outras observações relevantes (presença de ectoparasitos, casos de leishmaniose canina ou humana na moradia, uso de repelentes): _____

3. EXAME CLÍNICO GERAL

- Porte (tamanho) do animal: () pequeno () médio () grande
- Animal castrado: () sim () não
- Condição corporal: () caquético () magro () normal () sobrepeso () obeso
- Coloração da mucosa ocular: () rósea () pálida
- Comprimento dos pêlos: () curto () longo
- Cor dos pêlos: () claro () escuro
- Alopecia*: () sim () não
*Apresentação: () localizada () disseminada
- Descamação furfurácea na pele (seborréia): () sim () não
- Queratite: () sim () não
- Lesões de pele: () sim () não
* Localização: () focinho () orelha () outros: _____
- Onicogribose: () sim () não
- Conjuntivite: () sim () não
- Secreção ocular: () sim () não
- Paresia do trem posterior: () sim () não
- Incoordenação motora: () sim () não
- Aumento de linfonodos*: () sim () não
*Quais? () mandibular () pré-escapular () axial () inguinal () poplíteo

4. COLETA DE AMOSTRAS

- Ectoparasitos: () sim () não
- Sangue: () sim () não
- Soro: () sim () não
- Pele: () sim () não
- Medula: () sim () não
- Linfonodo: () sim () não
- Swab ocular: () sim () não

Data: ____/____/2013

Responsável: _____

Médico Veterinário



APÊNDICE B – TCL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Convido o senhor (a): _____ responsável pelo animal: _____, da espécie: canina a participar do projeto de pesquisa: **SOROPREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E ASPECTOS CLÍNICOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE VISACERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.** que tem como finalidade avaliar a soroprevalência de leishmaniose (calazar) em cães em área endêmica da doença no Estado de Pernambuco, correlacionando os principais fatores de risco. Para tal, é necessária que o senhor (a) responda um questionário e autorize a coleta de sangue do seu animal equivalente a 5 ml (correspondente a uma colher de sopa). Caso porventura, após a coleta o local ficar um pouco edemaciado (inchado), hematoma (arroxeado) e dolorido, tais sinais desaparecerão em cerca de sete dias, sem nenhum dano à saúde de seu animal. É importante ressaltar que sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em relação com o pesquisador ou com a instituição. Caso algum pergunta do questionário lhe cause constrangimento, não é necessário que o senhor (a) a responda. As informações obtidas por meio desta pesquisa serão publicadas em meio acadêmico e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Este termo será assinado em duas vias, ficando uma de posse do pesquisador responsável e a outra entregue a você, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador responsável, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Não haverá incentivo financeiro para a sua participação nesta pesquisa. Em caso de denúncias a respeito de alguma questão ética sobre a mesma, você poderá entrar em contato com a Comissão de Ética no Uso de Animais do CPqAM/Fiocruz através do telefone (81) 2101-2639.

Pesquisador Responsável: Thiago André S. de Andrade: _____

Endereço profissional: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Campus da UFPE – Av. Moraes Rego, s/n – Departamento de Imunologia.

E-mail: thiago.biovet@gmail.com **Fone:** (81) 9752-0276

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação, e concordo, voluntariamente, em participar.

Nome: _____

Assinatura: _____ **RG:** _____

Goiana/PE, _____ de _____ de 2013.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

ANEXO A – AUTORIZAÇÃO CEUA**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****Certificado de Aprovação**

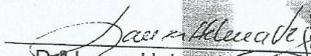
Certificamos que o projeto intitulado SOROPREVALÊNCIA E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E FELINA EM ÁREA ENDÊMICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL. Protocolado sob nº 36/2012 pelo (a) pesquisador (a) Dr. SINVAL PINTO BRANDÃO. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 06/12/2012. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 31 de dezembro de 2013.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Canis familiares	Amostragem por conveniência
Felis catus	

We certify that project entitled SOROPREVALÊNCIA E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E FELINA EM ÁREA ENDÊMICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL. Protocol nº 36/2012), coordinated by SINVAL PINTO BRANDÃO. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on December, 06, 2012. In present version this project is licensed and valid until December, 31, 2013.

Recife (PE, Brazil) December, 10, 2012.

DRA. LAURA GIL

Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais - CEUA
Inal. 014/PE 01/2008/07
E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br
CPqAM, J. Recife

 Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br