



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

**ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
PROVENIENTES DE INQUÉRITOS SOROLÓGICOS
REALIZADOS PELA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO
RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2008

Alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados
por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de
inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria Municipal
de Saúde do Rio de Janeiro

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre na área de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tânia Maria Pacheco Schubach
Co-Orientador: Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar.

Rio de Janeiro

2008

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

H774

Honse, Carla de Oliveira

Alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro / Carla de Oliveira Honse. – Rio de Janeiro, 2008.

xvii, 93 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2008.

Bibliografia: f. 66-75

1. Hemostasia. 2. Cães. 3. *Leishmania (Leishmania) chagasi*.
I. Título.

CDD 614.534

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

**ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
PROVENIENTES DE INQUÉRITOS SOROLÓGICOS REALIZADOS
PELA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre na área de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Tânia Maria Pacheco Schubach
Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar

Aprovada em: 13/03/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Madeira (Presidente)
Doutora em Ciências
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Regina Kiomi Takahira
Doutora em Medicina Veterinária e Clínica Veterinária
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Doutor em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho à minha mãe Anna Maria,
aos meus irmãos Maila, Siller e Matheus
e à minha tia Maria Helena,
pelo amor, carinho, apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

À doutora Tânia Maria Pacheco Schubach e ao doutor Nayro Xavier de Alencar pelos ensinamentos, orientação e incentivo em todos os momentos.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/Fiocruz, doutor Armando Schubach, pela compreensão e amizade durante todo curso.

Aos amigos da Secretaria de Pós-Graduação do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/Fiocruz, em especial, aos amigos Marcelo Eduardo Timóteo e Suze Rosa Sant'Anna pela amizade e companheirismo.

Ao Laboratório de Vigilância em Leishmaniose (VIGILEISH) – IPEC/Fiocruz, em especial, às doutoras Maria de Fátima Madeira e Eliame Mouta Confort pela colaboração na realização dos exames laboratoriais.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (LABCLIN) – Seção de Hematologia (SHEM) – IPEC/Fiocruz, em especial, aos doutores Jorge Nunes e Itália Mazzei Portugal pela colaboração na realização dos exames laboratoriais e, ao amigo Leonardo Almeida da Silva Rosadas pela ajuda e companheirismo.

À doutora Sônia Lambert pela colaboração na análise estatística deste estudo, pela extrema paciência e amizade.

Ao doutor Rodrigo Caldas Menezes pela colaboração na realização das necropsias, pelo incentivo e amizade.

Aos amigos do Centro de Controle de Zoonoses Paulo Darcoso Filho de Santa Cruz – RJ pela dedicação e apoio.

Aos amigos do Laboratório Clínico Vet Análises – RJ pela imensa amizade e colaboração na realização dos exames laboratoriais.

À minha mãe Anna Maria de Oliveira Honse pelo imenso amor, carinho, compreensão e apoio.

Aos meus queridos irmãos Maila de Oliveira Honse, Siller de Oliveira Honse e Matheus Bento de Oliveira por todo carinho e paciência.

À minha tia Maria Helena Honse pelo carinho, incentivo, ajuda e paciência.

Ao amigo Fabiano Borges Figueiredo pela imensa ajuda, força e apoio.

Às amigas Vivianni Marangoni e Priscilla Albuquerque pela amizade, ajuda e apoio constantes.

À amiga Maíra Cavalcanti pela amizade, companheirismo e imensa colaboração neste estudo.

À equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) – IPEC/Fiocruz, em especial, aos amigos Isabella Dib Ferreira Gremião, Vanessa Dutra Machado, Sandro Antônio Pereira, Roseli Lopes, Jéssica Nunes, Leandra Faria, Denise Torres e Amanda Folhadella.

Aos amigos da Veterinária Caiçara – RJ, em especial, às doutoras Ana Lúcia Carrilho Roçado e Eloisa Peçanha Bastos pela amizade, oportunidade e confiança.

Aos amigos Eveline Almeida, Thaís Omena, Aline Rodrigues, Renata Bastos, Luiz Rodrigo Paes Leme, Thais Okamoto, Isabele Barbieri e Luiza Helena Miranda por toda força, carinho e cumplicidade.

Às amigas do Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/Fiocruz pelo companheirismo e amizade.

Ao meu querido Pedro Henrique Cechinel pelos momentos maravilhosos.

À todos os animais deste mundo.

À Deus, que me deu forças para que chegasse até aqui.

“A felicidade não depende do que
nos falta, mas do bom uso que
fazemos do que temos”.
(Thomas Handy)

Honse, C. O. **Alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro; 2008. 93 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Foram estudados 35 cães adultos, sem raça definida, divididos em 2 grupos: LVC (leishmaniose visceral canina; n=11) e CNCP (cães negativos em cultura parasitológica; n=24). Um terceiro grupo (sadio, n=18) foi utilizado como parâmetro de referência dos testes de coagulação sanguínea. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de inquéritos sorológicos para LVC realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. A hemostasia primária foi avaliada através da contagem de plaquetas e mensuração do tempo de sangramento; a hemostasia secundária, através da mensuração dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada; e a fibrinólise, através da detecção dos produtos de degradação da fibrina em teste de aglutinação em látex. Adicionalmente, foram realizados o hemograma e detecção de anticorpos contra *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* de todos os animais. De acordo com os resultados obtidos, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre o grupo LVC e o grupo CNCP, ainda que ambos apresentassem alterações na hemostasia primária, secundária e/ou fibrinólise. Em virtude da co-infecção de alguns animais do grupo LVC por *Ehrlichia canis*, não foi possível atribuir as alterações encontradas exclusivamente ao agente *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo necessária a realização de novos estudos para melhor compreensão sobre a patogenia desta doença.

Palavras-chave: 1. Hemostasia. 2. cães. 3. *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 4. Rio de Janeiro

Honse, C. O. **Hemostatic changes in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* from serological surveys carried out by Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2008. 93 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Thirty five adult mongrel dogs were divided into two groups: CVL (canine visceral leishmaniasis; n=11) and DNPC (dogs with negative parasitological culture; n=24). A third group (healthy, n=18) was used as a reference in the coagulation tests. The purpose of this study was to evaluate the occurrence of haemostatic changes in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* from the VL serological surveys done by Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. The primary haemostasis was evaluated by the platelet count and measurement of the bleeding time; the secondary haemostasis was evaluated through the measurement of the prothrombin time and the activated parcial thromboplastin time; and the fibrinolysis through the detection of the fibrin degradation products by latex agglutination test. In addition to that, the blood count and detection of antibodies against *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi*, as well as antigens of *Dirofilaria immitis* were carried out in all the animals. According to the results, no significant difference ($p>0,05$) was observed among the CVL group and DNPC group, even though both presented changes in the primary and secondary haemostasis and/or the fibrinolysis. Due to the co-infection of some animals from the CVL group by *Ehrlichia canis*, it was not possible to attribute the alterations to agent *Leishmania (Leishmania) chagasi* exclusively. Hence, further studies are necessary for a better comprehension of the pathogeny of the disease.

Key words: 1. Hemostasis. 2. dogs. 3. *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 4. Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Canino, SRD, fêmea. Biopsia de pele íntegra realizada no pavilhão auricular direito com auxílio de <i>punch</i> de 4mm ...	27
Figura 2	Adição da solução de látex em cartão teste (Dade [®] DIMERTEST)	30
Figura 3	Homogeneização da amostra e solução de látex com auxílio de uma haste agitadora descartável (Dade [®] DIMERTEST)	31
Figura 4	Adição da amostra (seta vermelha) e conjugado (seta azul) em tubo tipo endorff (SNAP 3Dx, Idexx). Fonte: www.idexx.com	33
Figura 5	Ativador SNAP. Seta preta, cavidade da amostra; seta azul, janela de resultado; seta vermelha, círculo de ativação; seta lilás, ativador SNAP (SNAP 3Dx, Idexx). Fonte: www.idexx.com	33
Figura 6	Canino, SRD, fêmea do grupo LVC. Lesão cutânea ulcerada (seta verde) localizada em membro anterior direito e onicogribose	40
Figura 7	Canino, Poodle, fêmea do grupo LVC. Lesão cutânea crostosa (seta vermelha) e áreas de alopecia (seta azul) localizadas no plano nasal	40
Figura 8	Canino, SRD, fêmea do grupo LVC. Área de alopecia localizada na face externa da orelha direita	41
Figura 9	Canino, Fila Brasileiro, macho do grupo CNCP. Animal	

	apresentando severo emagrecimento	41
Figura 10	Teste de aglutinação em látex Dade® DIMERTEST em cão do grupo LVC. Seta vermelha, controle positivo; seta azul, amostra positiva para presença de produtos de degradação da fibrina	45
Figura 11	Resultados positivos para pesquisa de anticorpos contra <i>Ehrlichia canis</i> (seta vermelha) em soro canino. Controle positivo (seta preta) (Teste SNAP 3Dx)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados do isolamento e caracterização de <i>Leishmania</i> sp. das amostras cultivadas mediante os títulos sorológicos obtidos na RIFI dos 43 cães do estudo no ano de 2007	37
Tabela 2	Classificação em grupos dos 43 cães do estudo de acordo com os resultados da cultura parasitológica para diagnóstico de leishmaniose no ano de 2007	38
Tabela 3	Disposição das raças em relação ao isolamento e caracterização de <i>Leishmania</i> sp. dos 43 cães do estudo no ano de 2007	39
Tabela 4	Alterações clínicas observadas durante o atendimento dos cães pertencentes ao grupo LVC e CNCP no ano de 2007	42
Tabela 5	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do tempo de sangramento dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007	43
Tabela 6	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados de TP e TTPA (em segundos) dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007	44
Tabela 7	Alterações hematológicas observadas na hematoscopia dos cães pertencentes ao grupo LVC e CNCP no ano de 2007	46
Tabela 8	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados	

	do eritrograma, plaquetometria e PPT dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007	48
Tabela 9	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do leucograma dos cães pertencentes ao grupo LVC e CNCP e sadio no ano de 2007.....	49
Tabela 10	Valores individuais, mediana e intervalos interquartil (25 e 75%) das provas de função hepática dos 18 cães pertencentes ao grupo sadio no ano de 2007	50
Tabela 11	Alterações macroscópicas observadas durante a necropsia dos cães pertencentes aos grupos LVC e CNCP no ano de 2007	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALT – Alanina aminotransferase
ADP – Adenosina difosfato
Ca⁺² – Cálcio
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas
CHGM – Concentração de hemoglobina globular média
CID – Coagulação intravascular disseminada
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) – Ensaio imunoenzimático
FA – Fosfatase alcalina
FAP – Fator de ativação plaquetária
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
LABCLIN – Laboratório de Análises Clínicas
LAB-VIGILEISH – Laboratório de Vigilância em Leishmaniose
LACENs – Laboratórios Centrais Estaduais
LAPCLIN-DERMZOO – Laboratório de Pesquisa Clínica em
Dermatozoonoses em Animais Domésticos
LG – Leucometria global
LT – Leishmaniose tegumentar
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina
LVH – Leishmaniose visceral humana
MS – Ministério da Saúde
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDF – Produtos de degradação da fibrina
PPT – Proteína plasmática total
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
RJ – Rio de Janeiro
SHEM – Seção de Hematologia
Sin. – Sinônimo
SMS – Secretaria Municipal de Saúde
TF – Fator tecidual
TP – Tempo de protrombina

TTPA – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TS – Tempo de sangramento

TxA₂ – Tromboxano A₂

VGM – Volume globular médio

vWF – Fator de Von-Willebrand

WHO (World Health Organization) – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	AS LEISHMANIOSES	4
2.2	A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	8
2.3	HEMOSTASIA E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	ÉTICA	19
3.2	DESENHO DO ESTUDO	19
3.3	CÁLCULO DA AMOSTRA	21
3.4	INQUÉRITO SOROLÓGICO PARA CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	22
3.5	O RECOLHIMENTO DOS CÃES PELO CCZ DE SANTA CRUZ – RJ	22
3.6	PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO LAPCLIN-DERMZOO E NA VETERINÁRIA CAIÇARA	23
3.6.1	Recepção dos animais	23
3.6.2	Exame clínico	24
3.6.3	Mensuração do tempo de sangramento	24
3.6.4	Coleta de Sangue	25
3.6.5	Eutanásia	26
3.6.6	Coleta de fragmentos para isolamento de <i>Leishmania</i> sp. em cultura e posterior identificação	26
3.6.7	Necropsia	27
3.7	EXAMES LABORATORIAIS	28
3.7.1	Provas de hemostasia	28
3.7.1.1	Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada	28

3.7.1.2	Mensuração dos produtos de degradação da fibrina	29
3.7.2	Hemograma e proteína plasmática total	31
3.7.3	Detecção de antígenos de <i>Dirofilaria immitis</i> e anticorpos contra <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Borrelia burgdorferi</i>	32
3.7.4	Provas de função hepática	34
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS	36
4.1	ISOLAMENTO DE <i>Leishmania</i> sp. EM CULTURA E CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA	36
4.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	38
4.3	MENSURAÇÃO DO TEMPO DE SAGRAMENTO	42
4.4	EXAMES LABORATORIAIS	43
4.4.1	Provas de Hemostasia	43
4.4.1.1	Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada	43
4.4.1.2	Mensuração dos produtos de degradação da fibrina	44
4.4.2	Hemograma e proteína plasmática total	45
4.4.3	Provas de função hepática	49
4.4.4	Detecção de antígenos de <i>Dirofilaria immitis</i> e anticorpos contra <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Borrelia burgdorferi</i>	51
4.5	NECROPSIA	52
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXO A	77
	ANEXO B	78
	ANEXO C	87
	ANEXO D	92

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença tropical de importância médica e veterinária, endêmica em inúmeras áreas dos trópicos, sub-trópicos e bacia do mediterrâneo (Michalsky et al., 2007). Caracterizada pela grande diversidade e complexidade de seus agentes etiológicos e transmissores (Chappuis et al., 2007), a LV vem tornando-se uma das mais importantes doenças da atualidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a LV encontra-se entre as seis endemias prioritárias no mundo (WHO, 1990).

No Brasil, a leishmaniose visceral representa um importante problema de saúde pública devido a sua elevada incidência, ampla distribuição geográfica e marcante aumento na transmissão associado à urbanização da doença (Costa-Val et al., 2007). Canídeos domésticos, considerados os principais reservatórios da LV fora do ambiente silvestre, desempenham um papel fundamental na transmissão e manutenção da doença no país (Di Lorenzo et al., 2000), uma vez que a mesma pode se manter clinicamente inaparente durante um longo período (Alvar et al., 2004).

Os sinais clínicos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) variam amplamente de um aparente estado sadio a um severo estágio final (Ciaramella et al., 1997), em resultado de numerosos mecanismos patológicos e imunológicos envolvidos na doença (Valladares et al., 1998).

Alterações hematológicas envolvendo eritrócitos, leucócitos e plaquetas são freqüentemente observadas na doença canina (Slappendel, 1988; Ciaramella et al, 1997, Kontos & Koutinas, 1993; Costa-Val et al., 2007).

Anormalidades hemostáticas como epistaxe (Ferrer, 1994; Moreno et al., 1998; Ciaramella & Corona, 2003; Ciaramella et al., 2005), hematúria (Ferrer, 1994; Ciaramella & Corona, 2003) e coagulação intravascular disseminada (CID) (Font et al., 1994) têm sido freqüentemente relatadas em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* no Velho Mundo, juntamente com suas alterações laboratoriais, que incluem alterações na hemostasia primária, secundária e fibrinólise (Moreno et al., 1998; Moreno, 1999; Juttner et al., 2001; Ciaramella et al., 2005; Cortese et al., 2006).

Face à escassez de relatos referentes às alterações hemostáticas em cães com LV no Brasil, particularmente no município do Rio de Janeiro, o presente estudo teve por objetivos:

- Avaliar a ocorrência alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.
- Descrever as possíveis alterações ocorridas na hemostasia primária, secundária e fibrinólise de cães com LVC.
- Descrever as alterações clínicas e dados epidemiológicos observados nos cães com LVC.
- Descrever a presença de hemorragias durante a necropsia dos cães com LVC (avaliação macroscópica).
- Descrever o hemograma dos cães com LVC.

- Comparar os resultados laboratoriais da hemostasia e hemograma entre cães com do grupo LVC e do grupo CNCP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças parasitárias de importância médica e veterinária causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios do sistema monocítico fagocitário (Slappendel & Ferrer, 2000). São transmitidas ao ser humano e animais através da picada de insetos hematófagos da sub-família Phlebotominae, denominados flebotomíneos (Deane & Deane, 1962).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses afetam cerca de 14 milhões de pessoas em 88 países (WHO, 1990). Apresentam ampla distribuição geográfica (Américas, Ásia, África e Europa), sendo comumente encontrada em regiões tropicais, sub-tropicais e na Bacia do Mediterrâneo (Desjeux, 2004; Alvar et al., 2004; Chappuis et al., 2007).

De acordo com as espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção, as leishmanioses podem apresentar duas grandes formas clínicas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 1990; Alvar et al., 2004), que podem ser diagnosticadas através de métodos parasitológicos (diretos e indiretos),

sorológicos ou moleculares, associados às evidências clínicas e epidemiológicas (Alvar et al., 2004; Michalsky et al., 2007).

A leishmaniose tegumentar (LT) é encontrada em 88 países e cerca de 400 milhões de pessoas estão sob risco de adquirir a doença. Há uma estimativa de que a incidência anual da LT varie de 1,5 a 2 milhões de casos novos por ano (WHO, 1990).

Várias são as espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* causadoras da LT (Lainson, 1983). Os insetos vetores responsáveis pela transmissão da doença incluem diferentes espécies dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Alvar et al., 2004). Já foram registrados como hospedeiros naturais da LT alguns roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres (Ministério da Saúde, 2007). Existem relatos da infecção em animais domésticos como cães, gatos e eqüinos, porém, não existem evidências científicas de que estes animais atuem como reservatórios do subgênero *Viannia* (Ministério da Saúde, 2007).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies de *Leishmania* causadoras da LT, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (Grimaldi et al., 1989; Silveira et al., 2002).

As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LT no país são: *L. flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*. Embora ainda não tenha sido comprovado o papel de *L. neivai* e *L. fisheri*

como vetores, estas espécies têm sido encontradas com frequência em ambientes domiciliares em áreas de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2007).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é endêmica em 62 países e cerca de 200 milhões de pessoas estão sob risco de adquirir a doença (WHO, 1990). A ocorrência da LV está estimada em 500.000 novos casos por ano em todo mundo e cerca de 50.000 mortes a cada ano (WHO, 1990; Desjeux, 2004). A maioria dos casos ($\geq 90\%$) está concentrada em países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (Desjeux, 1996; Chappuis et al., 2007).

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são *Leishmania (Leishmania) donovani* (Sudão, Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal), *Leishmania (Leishmania) infantum* (região do Mediterrâneo, Ásia, China e norte da África) e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (América Latina, exceto Chile e Uruguai) (Chappuis et al., 2007). Alguns pesquisadores consideram a *L. (L.) chagasi* semelhante à *L. (L.) infantum*, questionando sua classificação separadamente. Entretanto, diferenças entre estas espécies quanto a antigenicidade e estrutura molecular foram evidenciadas, o que reforça a discriminação entre ambas as espécies (Shaw, 1994; Shaw, 2006).

Os vetores incriminados na transmissão da LV são flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Slappendel & Ferrer, 2000; Alvar et al., 2004). Animais selvagens como raposas, roedores e marsupiais participam do ciclo silvestre da doença. Nas áreas urbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório da LV (Ministério da Saúde, 2006).

Em termos epidemiológicos, existem dois tipos de LV que se diferem pelo modo da transmissão: LV zoonótica, transmitida do animal para o vetor e deste para o homem

e LV antroponótica, transmitida do homem para o vetor e deste para o homem (Chappuis et al., 2007). A LV zoonótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) chagasi* (sin. *L. (L.) infatum*), enquanto que a LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) donovani* (Alvar et al., 2004; Chappuis et al., 2007).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Monteiro, 2002). De acordo com Grimaldi *et al.* (1989), 90% dos casos de LV notificados na América Latina são provenientes do Brasil, particularmente da região nordeste (Marzochi & Marzochi, 1994; Vieira & Coelho, 1998).

Inicialmente, a leishmaniose visceral no país apresentava um caráter eminentemente rural, porém a degradação ambiental e falta de sanitização, associada a recente migração das populações rurais para os subúrbios das grandes cidades têm contribuído para a urbanização da doença; além da adaptação do inseto vetor às modificações ambientais, contribuindo para rápida emergência do foco urbano (Marzochi & Marzochi, 1997; Costa-Val et al., 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a peri-urbanização e urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) (MS, 2003) e mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO) e Monte Carlos (MG) (Silva et al., 2001; Barata et al., 2004; Michalsky et al., 2007).

Leishmania (L.) chagasi é o agente etiológico da LV no Brasil e sua transmissão está associada à picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), inseto amplamente distribuído no território brasileiro (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) (MS, 2006). Recentemente, *Lu. cruzi* foi descrita como espécie transmissora da LV no Estado do Mato Grosso do Sul (dos Santos et al., 1998; Palatnik-de-Sousa et al., 2001; Ministério da Saúde, 2006).

No ambiente silvestre, os reservatórios da *L. (L.) chagasi* são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No ambiente urbano, o cão (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção da doença (Ministério da Saúde, 2006).

A importância dos cães na manutenção do ciclo epidemiológico da LV no Brasil advém do fato de que doença é mais prevalente na população canina do que a população humana; a infecção no homem é normalmente precedida por casos caninos; e porque cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores (Di Lorenzo et al., 2000, Feitosa et al., 2000).

2.2 A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença severa de evolução lenta e início insidioso. As manifestações clínicas são similares à doença humana (Keenan et al., 1984), mas intrinsecamente dependentes da fase e do tipo de resposta imunológica

expressa pelo animal infectado, variando de um aparente estado sadio a um severo estágio final (Ciaramella et al., 1997; Ministério da Saúde, 2006).

Mancianti et al. (1988) sugerem que cães com LV sejam classificados de acordo com sinais clínicos da doença em: assintomáticos, com nenhum sinal clínico de infecção pelo protozoário *Leishmania*; oligossintomáticos, apresentando linfadenopatia, ligeira perda de peso e/ou alopecia; ou sintomáticos, mostrando todos ou alguns dos vários sintomas da doença, como lesões cutâneas, onicogribose, ceratoconjuntivite e rigidez dos membros posteriores.

Dependendo da imunocompetência do animal infectado, as manifestações clínicas da LVC tornam-se evidentes dentro de um período que varia de meses a anos (Alvar et al., 2004).

Na infecção por *Leishmania*, as células do sistema monocítico fagocitário atuam como células apresentadoras de antígeno, estimulando o linfócito T CD4+ auxiliares tipo 1 (Th1) ou auxiliares tipo 2 (Th2) (Liew & O'Donnell, 1993). Quando ativadas as células Th1, há uma produção de citocinas tais como interferon γ , fator de necrose tumoral e interleucina 12 (IL-12), que ativam macrófagos. Estas células por sua vez, estimulam a ativação de outras células ou sua própria proliferação, desta forma eliminando a infecção (Ikeda et al., 2003). Em contraste, quando ativadas as células Th2, há uma produção de citocinas tais como IL-4, IL-6, IL-10 e uma proliferação de células B, com conseqüente produção de anticorpos (Pinelli et al, 1994). Essa resposta, não protetora e deletérica, por sua vez, permite o desenvolvimento da doença. Um perigo potencial da regulação prejudicada do linfócito T e exacerbada ativação do linfócito B é a geração de grande quantidade de imunocomplexos (Makni et al., 1989). Na infecção natural estão ativados ambos os subtipos de células Th1 e Th2 e a

variedade dos sinais clínicos e gravidade da doença dependem do equilíbrio entre estes dois sistemas (Valladares et al., 1998).

Classicamente, a LVC é caracterizada por sinais de mucosas hipocoradas, emagrecimento, febre intermitente, linfadenopatia e lesões cutâneas, caracterizadas por alopecia, descamação, eczema e pequenas úlceras rasas, geralmente localizadas nas orelhas, focinho, cauda e articulações (Longstaffe & Guy, 1985; Ciaramella & Corona, 2003; Alvar et al., 2004).

Em fases mais avançadas da doença, observa-se a presença de hiperqueratose e onicogribose; esplenomegalia; hepatomegalia; colite (Ferrer et al., 1991); epistaxe (Ferrer, 1994; Moreno et al., 1998; Ciaramella & Corona, 2003; Ciaramella et al., 2005), hematúria (Ferrer, 1994; Ciaramella & Corona, 2003); coagulação intravascular disseminada (Font et al., 1994); lesões oculares como conjuntivite, blefarite, ceratoconjuntivite e uveíte (McConnell et al., 1970; Ciaramella et al., 1997); neuralgia; poliartrite; polimiosite; glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite túbulo-intersticial associadas à severa proteinúria podendo levar à síndrome nefrótica e falência renal (Slappendel & Ferrer, 2000); paresia dos membros posteriores, caquexia e inanição, levando o animal à morte (Ministério da Saúde, 2006).

De acordo com inúmeros autores (Kontos e Koutinas, 1993; Ciaramella et al. 1997; Ikeda et al. 2003; Costa-Val et al., 2007), a anemia normocítica normocrômica arregenerativa é uma das mais importantes alterações laboratoriais presentes na LVC, em consequência de uma eritropoiese diminuída, freqüente em doenças crônicas e supressão medular. Anemia imunomediada também tem sido observada na LVC (Jain, 1993; Kontos & Koutinas, 1993; Ikeda et al., 2003).

Em relação à série leucocitária, alguns autores relatam a ocorrência de leucopenia (Keenan et al., 1984; Longstaffe & Guy, 1985; Slappendel, 1988) enquanto outros relatam a ocorrência de leucocitose com neutrofilia como um achado ocasional (Ciaramella et al., 1997; Bourdoiseau et al., 1997). De acordo com Bourdoiseau et al. (1997), linfopenia pode ser observada em animais com quadro clínico grave da LV e linfocitose em quadros clínicos mais amenos. É comum a observação de monocitose, muitas vezes acompanhada de monócitos ativados em cães infectados (Yamaguchi et al., 1983; Ikeda et al., 2003).

A hiperproteinemia é um achado laboratorial comum e quase sempre está associada a hipoalbuminemia (Longstaffe & Guy, 1985; Ciaramella et al., 1997) e/ou maior produção de anticorpos (Ikeda et al., 2003). Alguns autores relatam a existência de uma relação entre o grau de hiperproteinemia e o aparecimento de epistaxes espontâneas (Dhupa & Littman 1992; Jüttner et al., 2001). Acredita-se que grandes concentrações de gamaglobulina podem estar associadas com a circulação de complexos imunes (Slappendel, 1988), podendo um ou outro ser depositado na parede vascular. Como conseqüências causam defeitos no endotélio ou distúrbios na interação plaqueta-plaqueta ou plaquetas e sub-endotélio lesado e inibição da degranulação e/ou adesão plaquetária (Jüttner et al., 2001).

Alterações laboratoriais presentes na hemostasia de cães com LV têm sido associadas aos distúrbios hemostáticos primários, secundários e a fibrinólise. A presença de trombocitopenia, prolongados tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPA) e fibrinólise vêm sendo relatadas (Valladares et al., 1998; Moreno et al., 1998; Moreno, 1999, Pelagalli et al., 2004; Ciaramellha et al., 2005; Cortese et al., 2006).

2.3 HEMOSTASIA E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A hemostasia é o mecanismo fisiológico responsável por manter a fluidez do sangue pelos vasos e controlar hemorragias decorrentes da lesão dos mesmos (Jandl, 1987). O processo hemostático depende da integridade do vaso, quantidade e qualidade das plaquetas (hemostasia primária), coagulação sanguínea (hemostasia secundária) e fibrinólise (hemostasia terciária) (Jandl, 1987; Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004).

A integridade vascular é avaliada por meio de células endoteliais e sua matriz extracelular. Danos na parede de vasos podem resultar em hemorragia e/ou ativação das plaquetas e coagulação sanguínea (Meyer & Harvey, 2004).

As plaquetas de mamíferos são pequenos fragmentos anucleados, redondos a ovais, que se formam do citoplasma do megacariócito. Na maioria dos animais domésticos sua meia vida é de 5-10 dias (Jain, 1993). Assim como em outras células sanguíneas, glicose é a maior fonte de energia das plaquetas (Wintrobe et al., 1981). Sua ultra-estrutura é composta por mitocôndrias; sistema canalicular bem diferenciado, que é contínuo com a superfície da membrana; corpos densos plaquetários; grânulos α ; além de grânulos de lisozima (Jain, 1993). Na sua superfície, as plaquetas expressam várias moléculas de glicoproteínas, necessárias para que ocorra adesão (ligação entre plaqueta e matriz extracelular) e agregação (ligação entre plaqueta-plaqueta) (Meyer & Harvey, 2004). O complexo glicoproteína GPIb/IX/V é especialmente importante na adesão das plaquetas ao fator de von-Willebrand (vWF) ligados na matriz sub-endotelial (Jandl, 1987). O complexo GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrina) é essencial para agregação

plaquetária normal, que é mediada pelo fibrinogênio (Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004).

As plaquetas apresentam três funções principais na hemostasia: (1) a formação do *plug* plaquetário no local da injúria do vaso; (2) ativação plaquetária que resulta na translocação de fosfolipídios carregados negativamente de superfícies internas para superfícies externas das plaquetas; e finalmente (3) manter a integridade normal do vaso de algum modo (Meyer & Harvey, 2004).

A hemostasia primária consiste de uma fase vascular e uma fase plaquetária (Jain, 1993). Em resposta à injúria sofrida pela parede vascular ou exposição à superfícies estranhas, as plaquetas rapidamente sofrem várias etapas (que incluem adesão, ativação, secreção e agregação), através de uma complexa série de processos coordenados que culminam na formação de um preciso *plug* plaquetário localizado (Jandl, 1987; Jain, 1993). Por causa das rápidas respostas intracelulares e sinergismo entre o sistema de segundo mensageiro, não é possível organizar estes processos temporalmente, sendo difícil definir claramente esta seqüência de eventos (Meyer & Harvey, 2004).

Após lesionado, o vaso sangüíneo sofre uma vaso-constricção reflexa temporária que retarda o fluxo sanguíneo, permitindo tempo para a formação do *plug* plaquetário e coagulação (Jandl, 1987). O dano à célula endotelial expõe a matriz sub-celular resultando na adesão e ativação plaquetária. As células endoteliais e outros tecidos lesados lançam ADP e fator tecidual (FT; tromboplastina tecidual), que promovem agregação e coagulação extrínseca, respectivamente (Meyer & Harvey, 2004).

Uma ótima adesão plaquetária requer a ligação das glicoproteínas de superfície plaquetária GPIb, do complexo GPIb/IX/V, à moléculas do vWF (Meyer & Harvey,

2004). Este complexo de glicoproteína GPIb/IX/V não se liga ao vWF solúvel; ele se liga somente às moléculas de vWF imobilizadas depositadas na matriz extra-celular, onde está primariamente associado com microfibrilas de colágeno (Wintrobe et al., 1981). O vWF é um componente do complexo macromolecular fator VIII (Meyer & Harvey, 2004).

Após ligar-se ao vWF e componentes da matriz extracelular, as plaquetas ativadas reorganizam seus microtúbulos e aumentam a polimerização da actina, resultando em uma expansão plaquetária com formação de pseudópodes (Jain, 1993).

A adesão de plaquetas à matriz extracelular e ligação do colágeno e outros agonistas (estimuladores), assim como altas concentrações de trombina e tromboxano A₂ (TXA₂), resultam na ativação da fosfolipase C na membrana plaquetária, que promove uma série de reações, estimulando as plaquetas em várias vias e resultando na mudança de forma, secreção e agregação (Meyer & Harvey, 2004).

A secreção plaquetária (lançamento ou degranulação) requer mecanismos contráteis energia-dependente. Corpos densos e grânulos α são fusionados juntos pela rede circulante dos microtúbulos e microfilamentos (Jain, 1993). O conteúdo dos corpos densos e grânulos α são lançados dentro do sistema canalicular, que é contínuo com a superfície plaquetária, acessando assim o meio externo (Meyer & Harvey, 2004).

Adenosina difosfato (ADP), tromboxano A₂ (TxA₂), trombina, fator de ativação plaquetária (FAP) e serotonina (em algumas espécies) são importantes agonistas que promovem agregação plaquetária (Jain, 1993). A ativação destes agonistas resulta na exposição ou ativação do GPIIb/IIIa, um receptor de superfície plaquetária β_3 -integrina que se liga ao fibrinogênio. A agregação ocorre quando moléculas simétricas de fibrinogênio se ligam aos receptores expostos nas plaquetas adjacentes (Meyer & Harvey, 2004).

Testes como tempo de sangramento e plaquetometria avaliam a hemostasia primária. O teste de tempo de sangramento (TS), que mensura o tempo necessário para a formação do tampão plaquetário, é dependente do número de plaquetas e de sua função, porém de acordo com a literatura é considerado um teste pouco sensível de diagnóstico (Meyer & Harvey, 2004). De acordo Moreno et al. (1998), cães com LV podem apresentar TS prolongado e atribuem este evento a possíveis trombocitopenias, disfunções plaquetárias e danos vasculares (Pumarola et al., 1991).

Trombocitopenia tem sido observada na LVC (Kontos e Koutinas, 1993; Slappendel e Ferrer, 2000; Costa-Val et al., 2007) e atribuída à destruição imunomediada desencadeada pela presença de imunocomplexos, levando a formação de anticorpos anti-plaquetas e vasculite acarretando numa diminuição plaquetária (Meyer & Harvey, 2004). Em alguns casos, a trombocitopenia pode ser atribuída ao consumo acelerado de plaquetas resultante de coagulação intravascular disseminada (CID) (Font et al., 1994).

A hemostasia secundária consiste da coagulação e consolidação do *plug* hemostático temporário para um tampão hemostático definitivo (Jain, 1993). A coagulação é um processo enzimático que envolve a conversão de pró-enzimas em enzimas ativadas e formação do coágulo estável de fibrina (Wintrobe et al., 1981; Jandl, 1987).

Os fatores de coagulação são glicoproteínas presentes na forma inativa ou precursora (Jain, 1993). Eles recebem um ou mais nomes e a cada um tem sido atribuído um número Romano. Fibrinogênio (fator I), protrombina (fator II), FT (fator tecidual; fator III) e Ca^{+2} (fator V) são usualmente chamados pelos nomes. Outros fatores são freqüentemente referidos pelos números que lhes são atribuídos. Não existe

o fator VI e todos os fatores, exceto o Ca^{+2} , são proteínas, a maioria delas sintetizadas no fígado. Todos os fatores estão normalmente presentes na circulação, exceto o fator III (FT). A vitamina K é requerida para a síntese dos fatores II, VII, IX e X (Meyer & Harvey, 2004).

A coagulação sanguínea é ativada por duas diferentes vias: a primeira, caracterizada pela ligação do fator VII ao FT extraído dos tecidos (via extrínseca) e a segunda, caracterizada pela ligação do fator XII à superfícies que podem incluir membrana basal, colágeno, pele e superfícies estranhas, incluindo vidro (via intrínseca) (Meyer & Harvey, 2004). Estas duas vias participam de uma via comum, que gera a trombina. Essa por sua vez, não só converte o fibrinogênio em fibrina, mas também ativa os fatores V, VIII, XI e XIII (Jandl, 1987).

A via extrínseca é iniciada pela tromboplastina tecidual (fator tecidual; fator III) exposta nas superfícies celulares, especialmente em células endoteliais ativadas ou lesionadas (Jain, 1993). A ativação da via intrínseca da coagulação ocorre quando fator XII se liga a superfícies carregadas negativamente e interagem com a pré-calecreína, que também está ligada à superfície vascular por um cininogênio de baixo peso molecular (Jandl, 1987; Meyer & Harvey, 2004). A ativação destas duas vias com suas cascatas de reações resultam na ativação da via comum, que por fim leva a conversão da protrombina à trombina, através do complexo protrombinase (Jain, 1993). A trombina formada converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, resultando na formação de um coágulo instável de fibrina. Dentro de minutos, o fator XIII ativado promove a estabilidade do coágulo de fibrina na presença de Ca^{+2} , permitindo que este alcance maturidade (Meyer & Harvey, 2004).

Os testes laboratoriais comumente utilizados na avaliação da via extrínseca e intrínseca são, respectivamente, os tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPA) (Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004). TP e TTPA prolongados têm sido relatados na infecção por *Leishmania* em cães (Font et al., 1993, 1994; Moreno et al, 1998, Moreno,1999; Ciaramella et al., 2005) e atribuídos à falência renal, achado comumente encontrado na LVC (Slappendel & Ferrer, 2000), podendo resultar na formação de trombos ou desencadear coagulação intravascular disseminada (Bernardini et al, 1980; Fonte et al., 1994) ou à doença hepática, manifestação clínica menos comum, mas que pode resultar na deficiência dos fatores da coagulação, prejudicando sua síntese (Moreno, 1999; Ciaramella et al., 2005).

De acordo com a literatura, os valores de normalidade do TP e TTPA de cães variam muito de acordo com o método e reagentes empregados na detecção do coágulo, sendo recomendada a utilização de valores de referência próprios ou a realização de testes em animais normais em paralelo aos testados (Rebar & Boon, 1981; Meyer & Harvey, 2004). Segundo Meyer & Harvey (2004), o TP e TTPA dos animais investigados são considerados prolongados quando seus valores atingem 30% ou mais dos valores correspondentes ao controle sadio.

A fibrinólise é a antítese da coagulação sanguínea (Jain, 1993). A fibrina é continuamente depositada e removida ao longo da parede dos vasos sangüíneos (Jain, 1993). O mecanismo responsável pela lise do coágulo envolve um sistema de enzimas proteolíticas e seus ativadores e inativadores, que incluem: pró-ativadores de plasminogênio, ativadores de plasminogênio, plasmina, inibidores dos pró-ativadores e ativadores de plasminogênio e anti-plasminas (Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004).

O plasminogênio se complexa com fibrinogênio e fibrina durante a coagulação e é incorporado durante a formação do coágulo (Meyer & Harvey, 2004). Os ativadores de plasminogênio, que são lançados pelo dano endotelial, ganham acesso ao coágulo por absorção e difusão, ativando o plasminogênio (Meyer & Harvey, 2004). Por proteólise limitada, os ativadores de plasminogênio convertem o plasminogênio a uma protease serina ativa, a plasmina, que proteolisa a fibrina em vários fragmentos, denominados produtos de degradação da fibrina (PDF) (Jain, 1993). Os PDF apresentam propriedades anti-hemostáticas, pois possuem atividade anti-plasmina, inibem a polimerização da fibrina e interferem na função plaquetária (Wintrobe et al., 1981; Meyer & Harvey, 2004). São removidos da circulação pelo fígado, rins e baço (Wintrobe et al., 1981).

Testes aplicados *in vivo* para evidenciar a presença de fibrinólise incluem testes que avaliem os PDF (Meyer & Harvey, 2004). Na LVC, autores têm observado a presença de PDF em plasma canino e têm atribuído tal evento à perda renal de antitrombina III, com subsequente estado de hipercoagulabilidade e aumento da fibrinólise (Fonte et al., 1993), ou à coagulação intravascular disseminada (Fonte et al., 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÉTICA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas (CEUA) da FIOCRUZ – RJ, sob o protocolo de número 0309/2006.

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo seccional no qual foram incluídos 43 cães soro reatores para *Leishmania* sp., com indicação à eutanásia, provenientes de inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

O isolamento em cultura em meio bifásico e caracterização isoenzimática foram utilizados para confirmação do diagnóstico de leishmaniose. Sendo assim, para uma análise comparativa, os animais foram divididos em 2 grupos:

- LVC (Leishmaniose Visceral Canina; n=11): onde foi isolada e caracterizada *Leishmania (Leishmania) chagasi*;

- CNCP (cães negativos em cultura parasitológica; n=24): animais negativos em cultura parasitológica para leishmaniose.

A partir da divisão dos grupos pós-cultura parasitológica, trabalhou-se com um total de 35 animais (LVC; n=11 e CNPC; n=24). Os cães de cujos isolados foi caracterizado o protozoário *Leishmania (Viannia) braziliensis* (n=5), *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (n=1) e cujas amostras foram perdidas (n= 2) foram excluídos do estudo.

Um terceiro grupo (grupo sadio; n=18) foi formado para referência dos parâmetros de hemostasia (TP e TTPA). Foram incluídos animais não reatores para *Leishmania* sp. em RIFI, clinicamente e laboratorialmente saudáveis, provenientes de clínica veterinária particular (Veterinária Caiçara), localizada fora de área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina na cidade do Rio de Janeiro. Esses animais foram negativos na detecção de antígenos de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi*.

Os animais dos grupos LVC e CNCP foram submetidos às mesmas avaliações clínicas e provas laboratoriais, que incluíram: mensuração do TS, TP, TTPA, PDF, hemograma (eritrograma, leucograma, plaquetometria e proteína plasmática total), detecção de antígenos de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi* e cultura parasitológica para *Leishmania* sp..

Os animais do grupo sadio foram submetidos à mensuração do TS, TP, TTPA, PDF, hemograma (eritrograma, leucograma, plaquetometria e proteína plasmática total) e detecção de antígenos de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Ehrlichia canis* e

Borrelia burgdorferi, além de provas de função hepática (ALT, FA, proteína sérica total, albumina e globulina) e sorologia para leishmaniose. Esses animais não foram submetidos à cultura parasitológica nem à detecção dos produtos de degradação da fibrina (PDF).

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO – IPEC/Fiocruz – RJ) em colaboração com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) Paulo Darcoso Filho de Santa Cruz – RJ, Laboratório Vet Analises – RJ, Veterinária Caiçara – RJ, Laboratório de Análises Clínicas (LABCLIN – IPEC/Fiocruz – RJ) – Seção de Hematologia (SHEM) e Laboratório de Vigilância em Leishmaniose (VIGILEISH – IPEC/Fiocruz – RJ).

3.3 CÁLCULO DA AMOSTRA

Para estimativas de tamanhos amostrais mínimos necessários, utilizou-se o teste bicaudal para comparação de médias, considerando-se um erro alfa de 0,05, erro beta de 0,20 e as médias, desvios padrões e diferenças entre os parâmetros laboratoriais da hemostasia primária (plaquetas e TS), hemostasia secundária (TP, TTPA) e fibrinólise (Moreno, 1999; Ciaramella et al., 2005).

As comparações referentes às plaquetas, TP e TTPA (este último em cães sintomáticos) seriam exequíveis, pois os tamanhos amostrais estimados giravam em

torno de 3 a 45 animais em cada grupo. Em situação quase ideal trabalharíamos com 50 cães saudáveis, 50 assintomáticos, 55 oligossintomáticos e 22 graves.

Devido à dificuldade de captação e limitação de recursos, uma amostra de conveniência foi utilizada.

3.4 INQUÉRITO SOROLÓGICO PARA O CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Os cães foram selecionados a partir do inquérito sorológico para controle da leishmaniose visceral canina no município do Rio de Janeiro, realizado semestralmente em dois ciclos pela Secretaria Municipal de Saúde.

Os animais foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta (IFI), realizada em eluato de sangue dissecado colhido em papel filtro, para triagem dos animais pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SMS-RJ). Os cães positivos foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em soro pela SMS-RJ para confirmação do diagnóstico. Amostras com fluorescência em diluições $\geq 1/40$ foram consideradas positivas e os animais recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) Paulo Darcoso Filho de Santa Cruz – RJ (Ministério da Saúde, 2006).

3.5 O RECOLHIMENTO DOS CÃES PELO CCZ DE SANTA CRUZ - RJ

Os animais (n=43) recolhidos pelo CCZ – Santa Cruz/RJ foram imediatamente encaminhados ao Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO – IPEC/Fiocruz).

3.6 PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO LAPCLIN-DERMZOO E NA CLÍNICA VETERINÁRIA CAIÇARA

3.6.1 Recepção dos animais

Uma vez no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO – IPEC/Fiocruz), os animais provenientes do inquérito sorológico (n=43) foram submetidos a exame clínico, mensuração do tempo de sangramento, coleta de sangue, eutanásia, necropsia e coleta de fragmento para isolamento de *Leishmania* sp. em cultura e posterior identificação. Na Clínica Veterinária Caiçara, os animais do grupo sadio (n=18), foram submetidos a exame clínico, mensuração do tempo de sangramento e coleta de sangue.

Um prontuário foi preenchido para cada animal, contendo nome e endereço do proprietário e dados do animal, que incluíam: nome, procedência, sexo, idade, espécie e vacinação. Na Clínica Veterinária Caiçara também foi obtido o histórico de cada cão.

Fotocópias dos resultados da RIFI de cada animal proveniente do inquérito sorológico, fornecidas pelo CCZ – Santa Cruz, foram anexadas aos prontuários (ANEXO A).

3.6.2 Exame clínico

Para realização do exame clínico, os animais foram contidos mecanicamente com a utilização de mordças. Quando necessário, os mesmos foram contidos quimicamente através da associação de cloridrato de quetamina (10mg/Kg) e acepromazina (0,1mg/Kg) por via intramuscular (seringa agulhada 25x7mm; 3mL).

O exame clínico incluiu: pesagem, inspeção de pele e mucosas, palpação de linfonodos e órgãos abdominais e aferição de temperatura corporal. Enfatizou-se a busca por sinais de hemorragia.

3.6.3 Mensuração do tempo de sangramento

A mensuração do tempo de sangramento foi realizada através de uma pequena incisão em pele seca, limpa e livre de pêlos na face interna da orelha direita dos cães, com o auxílio de uma lanceta automática de penetração 2,4mm (Unistik 2 Normal, Owem Mumford). Aflorado o sangue, o mesmo foi removido a cada 30 segundos com

auxílio de um papel de filtro (Whatman n°. 2) até seu desaparecimento total, quando foi interrompida a contagem e registrado o tempo de sangramento em segundos, com auxílio de um cronômetro (Coles, 1984; Aoki et al., 2005).

3.6.4 Coleta de sangue

Amostras de sangue total foram coletadas da veia jugular externa através de sistema de coleta a vácuo, após tricotomia e anti-sepsia local com álcool a 70%. Foram utilizados agulha de coleta múltipla 21G1 (25x0,8mm) e adaptador padrão (Greiner Bio-One). Evitou-se o garroteamento prolongado e múltiplas punções para realização dos seguintes exames:

- ❖ Provas de hemostasia (TP, TTPA e PDF): frascos contendo como anticoagulante o Citrato de Sódio 3,2% (Greiner Bio-One), na proporção de 1 parte de solução de citrato de sódio para 9 partes de sangue.
- ❖ Hemograma e proteína plasmática total: frascos contendo como anticoagulante o EDTA a 10% (K₂ EDTA, BD Vacutainer) na proporção de 0,1 mL para cada 5 mL de sangue.
- ❖ Sorologia (Teste SNAP 3Dx e Sorologia para Leishmaniose): frascos com ativador de coágulo (BD Vacutainer).
- ❖ Provas de função hepática (ALT, FA, PPT, albumina e globulina): frascos com ativador de coágulo (BD Vacutainer).

3.6.5 Eutanásia

Os animais pertencentes ao grupo LVC e CNCP foram submetidos à eutanásia com *overdose* intravenosa de Tiopental Sódico 5% (seringa agulhada 25x7mm, 10mL, veia cefálica) de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, contidas no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MS, 2006). A morte dos animais foi confirmada através de parada cardio-respiratória, aferida pela palpação de pulso femoral e ausculta cardíaca.

3.6.6 Coleta de fragmento para isolamento de *Leishmania* sp. em cultura e posterior identificação

A coleta de fragmento para isolamento de *Leishmania* sp. em cultura e posterior identificação através de caracterização isoenzimática foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais.

Fragmentos de baço, pele íntegra (pavilhão auricular) e lesão cutânea (quando existente) foram coletados com auxílio de *punch* de 4mm (Kolplast CI) (Figura 1), acondicionados em solução salina contendo penicilina G potássica e 5'fluorocitosina à temperatura de 4°C e encaminhados ao Laboratório de Vigilância em Leishmaniose (VIGILEISH – IPEC/Fiocruz – RJ) para isolamento e posterior caracterização.

Antes da retirada dos fragmentos de pele e/ou lesão, o local era devidamente limpo com água e sabão, sendo realizada em seguida, a anti-sepsia do mesmo com álcool a 70%.



Figura 1. Canino, SRD, fêmea. Biopsia de pele íntegra realizada no pavilhão auricular direito com auxílio de *punch* de 4mm.

3.6.7 Necropsia

Os animais pertencentes ao grupo LVC e CNCP foram necropsiados de acordo com a técnica descrita por Barros (1988) e Vasconcelos (1988), em busca de lesões hemorrágicas durante avaliação macroscópica.

3.7 EXAMES LABORATORIAIS

3.7.1 Provas de hemostasia

3.7.1.1 Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada

As amostras de sangue acondicionadas em frascos contendo Citrato de Sódio 3,2% foram imediatamente enviadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LABCLIN) – Seção de Hematologia (SHEM) – IPEC/Fiocruz, para mensuração dos tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPA) em Sistema Automático de Análise da Coagulação Sanguínea – Sysmex Serie CA – 500 (Sysmex America, Inc.). O plasma foi obtido após centrifugação a uma velocidade de 3500rpm durante 10 minutos (Excelsa[®]II).

O PT foi determinado pela adição de 100µL do reagente Thromborel[®] S (Dade Behring) (37°C) em 50µL de plasma citratado, em um tubo de ensaio pré-aquecido à 37°C durante 3 minutos. O TTPA foi determinado pela adição de 50µL de solução de cloreto de cálcio (37°C) em 50µL do reagente Pathromtin SL (Dade Behring) e em 50µL de plasma citratado, em um tubo de ensaio pré-aquecido à 37°C durante um minuto.

As amostras com TP e TTPA maiores que 120 segundos e 190 segundos, respectivamente, foram consideradas incoaguláveis, de acordo com as recomendações do Manual do Sistema Automático de Análise da Coagulação Sanguínea – Sysmex

Serie CA – 500 (Sysmex America, Inc.). O aparelho foi calibrado antes da realização dos exames.

O tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada dos animais pertencentes ao grupo LVC e CNCP foram considerados aumentados quando seus valores atingiam 30% ou mais dos valores correspondentes ao grupo sadio (Meyer & Harvey, 2004).

3.7.1.2 Mensuração dos produtos de degradação da fibrina

A mensuração dos PDF foi realizada nos cães do grupo LVC e CNCP. Os cães do grupo sadio não foram testados para o referido exame.

Para detecção qualitativa dos derivados circulantes dos produtos de degradação da fibrina reticulada transversalmente (PDF-XL) foi utilizado o teste de aglutinação em látex Dade[®] DIMERTEST (Dade Behring).

As amostras de sangue total foram submetidas à centrifugação (3500rpm por 15 minutos, +10°C) (Excelsa[®]) para obtenção do plasma citratado, armazenado à -20°C até a data do processamento, que não ultrapassou 14 dias, seguindo as recomendações do fabricante.

Descongeladas a 37°C e novamente centrifugadas, as amostras foram imediatamente processadas.

Procedimento:

Foram pipetados 20 μ L do plasma não diluído no campo especificado no cartão de teste e, em seguida, adicionada uma gota da suspensão de látex que acompanha o *kit* (Figura 2). Com auxílio de uma haste agitadora descartável, a amostra foi misturada à suspensão de látex de modo a manter uma distribuição uniforme (Figura 3). Cuidadosamente, o cartão de teste foi então movimentado de um lado a outro durante três minutos, quando então se realizou a leitura do teste sob forte fonte luminosa, de acordo com as recomendações do fabricante.

Todas as amostras foram avaliadas juntamente com os controles positivo e negativo que acompanhavam o *kit*.



Figura 2. Adição da solução de látex em cartão teste (Dade® DIMERTEST).

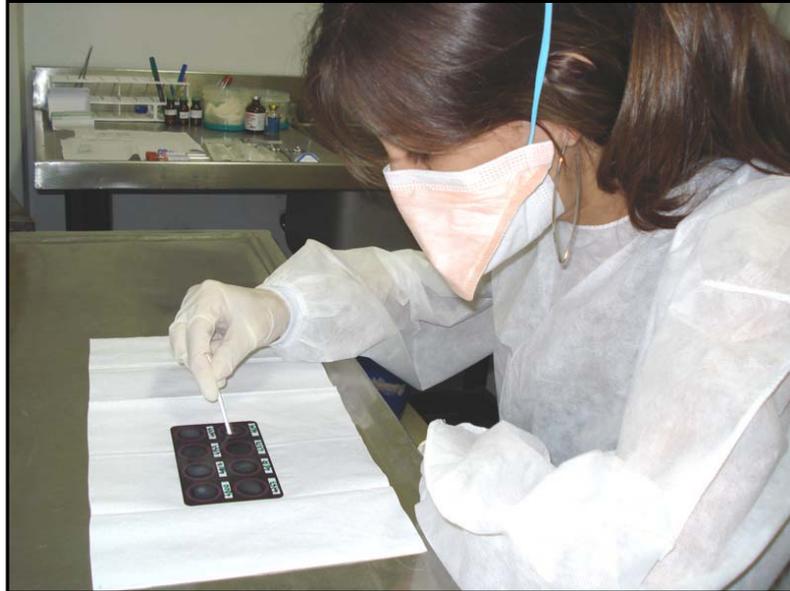


Figura 3. Homogeneização da amostra e solução de látex com auxílio de uma haste agitadora descartável (Dade® DIMERTEST).

3.7.2 Hemograma e proteína plasmática total

As amostras de sangue destinadas à realização do hemograma (eritrograma, leucograma e plaquetometria) e mensuração da proteína plasmática total foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório Vet Análises – RJ.

A contagem total de células sanguíneas, incluindo plaquetometria, foi realizada em contador automático de células COULTER Modelo T-890 e conferida através de esfregaços sanguíneos.

Os esfregaços sanguíneos, provenientes de sangue periférico, foram confeccionados em lâminas de microscopia (tamanho 26x76mm e espessura 1,2mm) limpas e desengorduradas em álcool a 70%. As lâminas foram fixadas em metanol durante cinco minutos e coradas pelo método de Romanowsky (Giemsa Stain Modified, Sigma-Aldrich) por 30 minutos, para realização da contagem diferencial de leucócitos em contador manual de células sanguíneas (KACIL CCS-01), utilizando-se o padrão de “grega” (Coles, 1984) e pesquisa de hemoparasitas, realizada por dois observadores.

A dosagem total de proteínas plasmáticas foi realizada por refratometria (Jain, 1993; Meyer & Harvey, 2004).

3.7.3 Detecção de antígenos de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi*

Para detecção de antígenos de *D. immitis* e anticorpos contra *E. canis* e *B. burgdorferi* foi utilizado o Teste SNAP 3Dx (IDEXX Laboratories).

Amostras de sangue total foram submetidas à centrifugação (1500rpm por 10 minutos) (Excelsa®II) para obtenção do soro, armazenado à -20°C até a data do processamento.

Descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas de acordo com as recomendações do fabricante, as amostras foram imediatamente processadas no LAPCLIN-DERMZOO – IPEC/Fiocruz.

Procedimento:

Três gotas da amostra e quatro gotas do conjugado, que acompanha o kit, foram pipetadas em um tubo tipo ependorff (Figura 4). Em seguida, o tubo foi invertido cerca de 3 a 5 vezes para homogeneização da solução, que foi adicionada à cavidade da amostra. Após fluir pela janela de resultado, a solução atingiu o círculo de ativação, permitindo, então, que o ativador SNAP fosse pressionado (Figura 5). Aguardou-se cerca de 8 minutos para leitura do teste, de acordo com as recomendações do fabricante.

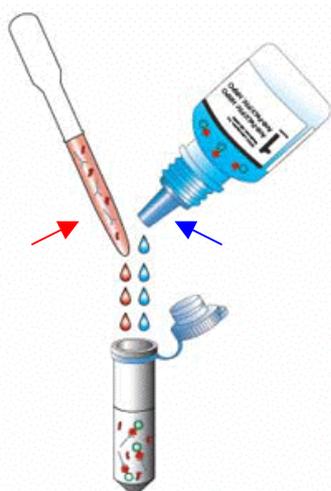


Figura 4. Adição da amostra (seta vermelha) e conjugado (seta azul) em tubo tipo ependorff (SNAP 3Dx, Idexx). Fonte: www.idexx.com

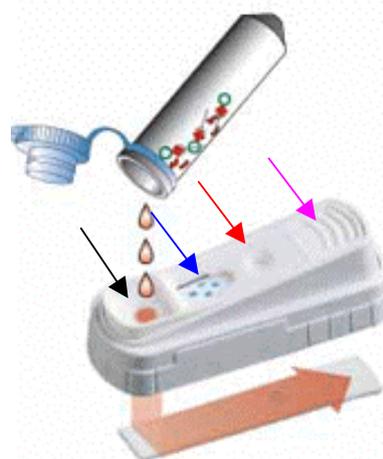


Figura 5. Ativador SNAP. Seta preta, cavidade da amostra; seta azul, janela de resultado; seta vermelha, círculo de ativação; seta lilás, ativador SNAP (SNAP 3Dx, Idexx). Fonte: www.idexx.com

3.7.4 Provas de função hepática

As amostras de sangue total pertencentes aos animais do grupo sadio foram submetidas à centrifugação (1500rpm durante 10 minutos) (Excelsa®II) para obtenção do soro, imediatamente encaminhado ao Laboratório Vet Analises – RJ para realização das seguintes provas bioquímicas:

- ❖ Alanina aminotransferase (ALT): método otimizado cinético UV-IFCC
- ❖ Fosfatase alcalina (FA): Bowers e Mc Comb modificado
- ❖ Proteína sérica total: método colorimétrico por reação cinética com biureto
- ❖ Albumina: método colorimétrico por reação com verde de bromocresol
- ❖ Globulina: calculada pela diferença da proteína sérica total e albumina

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram armazenados em Banco de Dados Access e analisados com auxílio do programa de análise estatística SPSS win v.11.

Foram descritas as frequências simples da classificação clínica dos cães estudados e as medianas e percentis 25 e 75% das variáveis contínuas dos parâmetros laboratoriais de TP, TTPA, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, CHGM, contagem total de plaquetas, proteína plasmática total, contagem total de leucócitos e

contagem diferencial de basófilos, eosinófilos, mielócitos, metamielócitos, segmentados, linfócitos e monócitos dos três grupos do estudo, além de ALT, FA, proteína plasmática total, albumina e globulina nos cães do grupo sadio.

Para efeito de comparação entre os resultados do grupo LVC e controle utilizou-se a análise não paramétrica de Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo o p-valor $\leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO DE *Leishmania* sp. EM CULTURA E CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA

Dos quarenta e três cães recolhidos pelo CCZ – Santa Cruz/RJ, *Leishmania* sp. foi isolada de 19 animais (44,9%) em diferentes sites anatômicos: pele íntegra (13/19), baço (8/19) e lesão (7/19). Destes isolados, dois foram perdidos (um de pele íntegra e outro de lesão). Vinte e quatro animais (55,9%) foram negativos em cultura parasitológica.

Leishmania (L.) chagasi foi caracterizada em 11 (25,6%) animais e *Leishmania (V.) braziliensis* em 5 (11,63%) cães. Infecção mista por *Leishmania (L.) chagasi* e *Leishmania (V.) braziliensis* foi observada em um único animal.

Os resultados do isolamento e caracterização de *Leishmania* das amostras cultivadas mediante os títulos sorológicos obtidos na RIFI dos 43 cães do estudo encontram-se na tabela 1. Na tabela 2, pode-se observar a classificação, em grupos, atribuída aos animais após os resultados da cultura parasitológica.

Tabela 1. Resultados do isolamento e caracterização de *Leishmania* sp. das amostras cultivadas mediante os títulos sorológicos obtidos na RIFI dos 43 cães do estudo no ano de 2007.

	Animais (n)	Isolamento em Cultura		Caracterização Izoenzimática			Amostras perdidas
		Negativo	Positivo	<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) chagasi</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	
1:40	16	15	1	0	1	0	0
1:80	14	9	5	0	4	0	1
1:160	2	0	2	1	0	0	1
1:320	1	0	1	1	0	0	0
1:640	5	0	5	4	0	1	0
1:1280	4	0	4	4	0	0	0
1:2560	1	0	1	1	0	0	0
Total	43	24	19	11	5	1	2

Tabela 2. Classificação em grupos dos 43 cães do estudo de acordo com os resultados da cultura parasitológica para diagnóstico de leishmaniose no ano de 2007.

	Animais	Classificação
<i>L. (L.) chagasi</i>	11	Grupo LVC
<i>L. (V.) braziliensis</i>	5	Excluído
<i>L. (L.) chagasi e L. (V.) braziliensis</i>	1	Excluído
Amostras negativos	24	Grupo CNCP
Amostras perdidas	2	Excluído
Total	43	-

4.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Dos quarenta e três animais avaliados, 23 (53,5%) eram machos e 20 (46,5%) eram fêmeas. Trinta e três cães (76,7%) não apresentavam raça definida e 10 (23,3%) pertenciam às raças: Poodle (4/43), Rottweiler (2/43), Labrador (2/43), Fila Brasileiro (1/43) e Pinscher (1/43). A idade dos animais variou entre um e 12 anos de idade.

No grupo LVC, 5 (45,4%) animais eram machos e 6 (54,5%) eram fêmeas. A idade dos animais variou entre 1 e 12 anos. No grupo CNCP, 14 (58,3%) cães eram machos e 10 (41,7%) eram fêmeas. A idade variou entre 1 e 12 anos.

Na tabela 3 pode-se observar a disposição das raças em relação ao isolamento e caracterização de *Leishmania* sp..

Tabela 3. Disposição das raças em relação ao isolamento e caracterização de *Leishmania* sp. dos 43 cães do estudo no ano de 2007.

	<i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>	<i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i>	<i>L. (L.) chagasi</i> e <i>L. (V.)</i> <i>braziliensis</i>	Negativos	Amostras perdidas
SRD	9	4	1	17	2
Poodle	1	0	0	3	0
Rottweiler	0	1	0	1	0
Labrador	0	0	0	2	0
Fila Brasileiro	0	0	0	1	0
Pinscher	1	0	0	0	0
Total	11	5	1	24	2

De acordo com os sinais clínicos, os animais do grupo LVC foram classificados em assintomáticos (n=4; 36,4%), oligossintomáticos (n=4; 36,4%) e sintomáticos (n=3; 27,3%). As principais alterações clínicas observadas nesse grupo foram linfadenopatia (n= 7; 63,6%), acometendo os linfonodos pré-escapulares (n=1; 14,3%), pré-maxilares (n=3; 42,8%), cervicais (n=3; 42,8%) e poplíteos (n=6; 85,7%); mucosas hipocoradas (n=7; 63,6%); lesões cutâneas (Figuras 6 e 7), especialmente áreas de alopecia (Figura 8) (n=6; 54,5%); e emagrecimento (n=5; 45,4%). Os principais sinais clínicos encontrados nos cães do grupo CNCP foram mucosas hipocoradas (n=13; 54,2%), emagrecimento (n=11; 45,8%) (Figura 9) e linfadenopatia (n=10; 41,7%), acometendo os linfonodos cervicais (n=4) e poplíteos (n=7). Os demais achados clínicos observados em ambos os grupos encontram-se na tabela 4.

Não foram observados sinais de hemorragia em nenhum dos cães tanto do grupo LVC quanto do grupo CNCP.



Figura 6. Canino, SRD, fêmea do grupo LVC. Lesão cutânea ulcerada (seta verde) localizada em membro anterior direito e onicogribose.



Figura 7. Canino, Poodle, fêmea do grupo LVC. Lesão cutânea crostosa (seta vermelha) e áreas de alopecia (seta azul) localizadas no plano nasal.

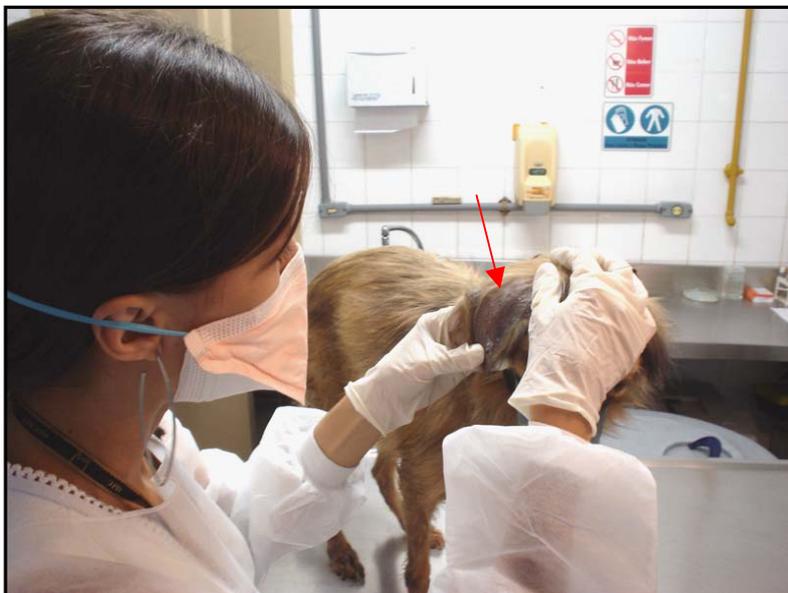


Figura 8. Canino, SRD, fêmea do grupo LVC. Área de alopecia localizada na face externa da orelha direita.



Figura 9. Canino, Fila Brasileiro, macho do grupo CNCP. Animal apresentando severo emagrecimento.

Tabela 4. Alterações clínicas observadas durante o atendimento dos cães pertencentes aos grupos LVC e CNCP no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)
Mucosas hipocoradas	7	13
Apatia	3	1
Emagrecimento	5	11
Áreas de alopecia	6	1
Descamação furfurácea	4	0
Pêlo opaco	1	0
Lesões cutâneas ulceradas	2	2
Onicogribose	2	0
Ceratoconjuntivite	3	0
Blefarite	1	0
Linfadenopatia	7	10
Esplenomegalia	2	0
Hepatomegalia	1	0

4.3. MENSURAÇÃO DO TEMPO DE SANGRAMENTO

Os valores da mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) da mensuração do tempo de sangramento (TS) dos animais do grupo LVC, grupo CNCP e sadio encontram-se na tabela 5, juntamente com o p-valor determinado (Teste de Mann-Whitney). Adicionalmente, os valores individuais do TS de cada animal do grupo LVC e CNCP encontram-se no ANEXO B. No ANEXO C observam-se os resultados individuais do TS dos cães do grupo sadio.

De acordo com os resultados obtidos, somente um cão do grupo LVC e um cão do grupo CNCP apresentaram TS prolongado, ambos infectados por *E. canis*.

Tabela 5. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do tempo de sangramento dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)	p*	Grupo Sadio (n=18)***
Tempo de Sangramento (s)**	162,0 (130,0-180,0)	168,0 (137,0-175,0)	0,85	138,0 (130,0-170,0)

*p, p-valor (Mann-Whitney)

** (s), segundos

***, Parâmetro de referência próprio.

4.4 EXAMES LABORATORIAIS

4.4.1 Provas de hemostasia

4.4.1.1 Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada

Os valores da mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do tempo de protrombina e tempo parcial de tromboplastina ativada encontram-se na tabela 6, juntamente com o p-valor determinado (Teste de Mann-Whitney). Adicionalmente, os valores individuais do TP e TTPA de cada animal encontram-se no ANEXO B. No

ANEXO C observam-se os resultados individuais do TP e TTPA dos cães do grupo sadio.

No grupo LVC, TP prolongado foi observado em 45,4% (5/11) dos animais; 60,0% (3/5) co-infectados por *E. canis*. TTPA prolongado foi observado em 45,4% (5/11) dos animais; 80,0% (4/5) co-infectados por *E. canis*.

No grupo CNCP, TP prolongado foi observado em 41,7% (10/24) dos animais; 90,0% (9/10) infectados por *E. canis*. TTPA prolongado foi observado em 37,5% (9/24) dos animais; 88,9% (8/9) infectados por *E. canis*.

Tabela 6. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados de TP e TTPA (em segundos) dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)	p*	Grupo Sadio (n=18)***
TP^a (s)**	8,7 (7,8-120,0)	8,6 (7,5-120,0)	0,63	7,3 (7,2-7,3)
TTPA^b (s)**	46,4 (38,3-57,8)	38,6 (28,8-54,3)	0,31	37,2 (30,0-42,7)

*p, Teste de Mann-Whitney

** (s), segundos

***, Parâmetro de referência próprio.

^a, TP tempo de protrombina; ^b, TTPA tempo de tromboplastina parcial ativada.

4.1.1.2 Mensuração dos produtos de degradação da fibrina

Apenas um animal, pertencente ao grupo LVC, foi positivo para presença de produtos de degradação da fibrina (Figura 10) em plasma citratado. Esse animal foi

negativo para presença de anticorpos contra *E. canis* e *B. burgdorferi* e antígenos de *D. immitis*.

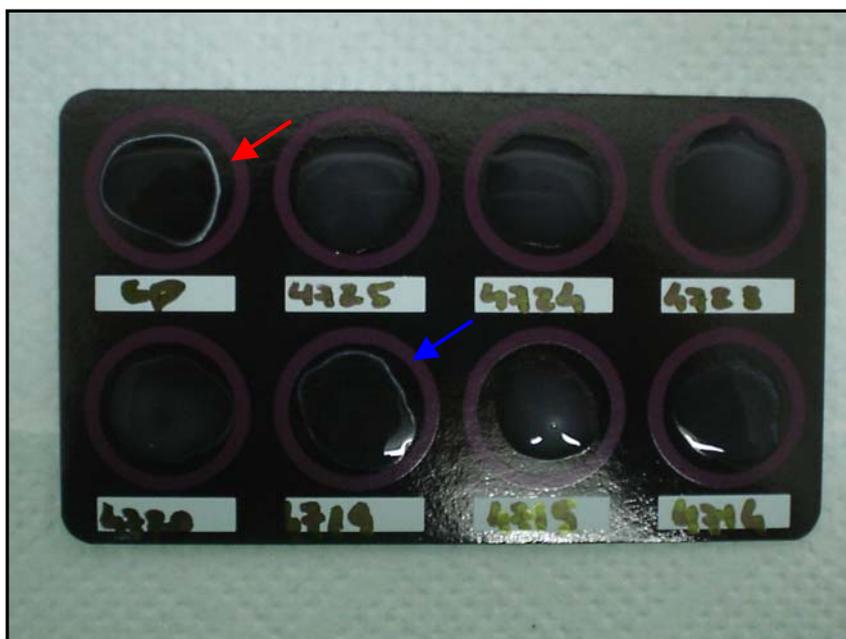


Figura 10. Teste de aglutinação em látex Dade® DIMERTEST em cão do grupo LVC. Seta vermelha, controle positivo; seta azul, amostra positiva para presença de produtos de degradação da fibrina.

4.4.2 Hemograma e proteína plasmática total

Anemia foi observada em 100% dos animais tanto do grupo LVC (n=11) quanto do grupo CNCP (n=24).

Anemia normocítica normocrômica esteve presente em 81,8% (9/11) dos cães do grupo LVC. Anemia normocítica hipocrômica (9,1%; n=1) e anemia microcítica

normocrômica (9,1%; n=1) também foram observadas. O grupo CNCP foi caracterizado por uma anemia normocítica normocrômica em 83,3% (20/24), anemia normocítica hipocrômica em 8,3% (2/24), anemia microcítica hipocrômica em 4,2% (1/24) e anemia macrocítica hipocrômica em 4,2% (1/24) dos animais.

As alterações observadas na hematoscopia dos cães dos grupos LVC e CNCP encontram-se na tabela 7.

Tabela 7. Alterações hematológicas observadas na hematoscopia dos cães pertencentes aos grupos LVC e CNCP no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)
Anisocitose	4 (33,3%)	7 (29,2%)
Policromasia	3 (25%)	2 (8,3%)
Rouleaux	2 (16,7%)	1 (4,2%)
Metarrubricitos	1 (8,3%)	3 (12,5%)
Howell Jolly	2 (16,7%)	1 (4,2%)
Linfócitos Reativos	5 (41,7%)	10 (41,7%)
Monócitos Ativados	8 (66,7%)	12 (50%)
Macroplaquetas	0 (0%)	5 (20,8%)
Ativação Plaquetária	0 (0%)	2 (8,3%)

Durante a pesquisa de hemoparasitas, em somente um animal, pertencente ao grupo CNCP, foram observadas mórulas de *Ehrlichia* sp. no citoplasma de monócitos.

Hiperproteinemia esteve presente em 63,6% (7/11) dos animais do grupo LVC; 42,8% (3/7) co-infectados por *E. canis*. O grupo CNCP apresentou 25,0% (6/24) dos cães com hiperproteinemia; 66,7% (4/6) infectados por *E. canis*, e 12,5% (3/24) animais com hipoproteinemia; 66,7% (2/3) infectados por *E. canis*.

Plaquetopenia foi observada em 63,6% (7/11) dos cães do grupo LVC; 42,8% (3/7) co-infectados por *E. canis*. No grupo CNCP, plaquetopenia foi observada em 50,0% (12/24) dos animais; 100,0% (12/12) infectados por *E. canis*.

O leucograma dos animais do grupo LVC apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade (Jain, 1993) em 72,7% (8/11) dos animais; estando presente leucopenia em 27,2% (3/11) dos cães, todos co-infectados por *E. canis*. O grupo CNCP também apresentou leucometria global dentro dos parâmetros de normalidade (Jain, 1993) em 75,0% (18/24) dos animais. Leucopenia foi observada em 20,8% (5/24) dos cães; 80,0% destes (4/5) infectados por *E. canis*. Além de leucocitose com desvio nuclear de neutrófilos à esquerda observada em um (4,7%) animal soro reator para anticorpos contra *E. canis*.

Nas tabelas 8 e 9 observam-se os valores da mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do eritrograma, plaquetometria e proteína plasmática total, e leucograma, respectivamente, dos cães do grupo LVC e grupo CNCP. Adicionalmente, os valores individuais de cada animal encontram-se no ANEXO B.

No ANEXO C é possível observar os resultados individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do hemograma e proteína plasmática total dos cães pertencentes ao grupo sadio.

Tabela 8. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do eritrograma, plaquetometria e PPT dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)	p*	Valores de Referência^a	Grupo Sadio (n=18)
Eritrócitos (x10⁶/μL)	4,00 (3,14-4,40)	4,40 (3,67-5,00)	0,29	5,5-8,5	6,57 (5,87-6,83)
Hemoglobina (g/dL)	8,6 (7,4-9,7)	10,15 (7,62-11,37)	0,12	12,0-18,0	15,40 (13,80-16,20)
Hematócrito (%)	25,0 (23,0-29,0)	31,00 (23,75-34,00)	0,11	37-55	46,0 (41,0-47,2)
VGM** (fL)	68,14 (62,50-75,65)	68,66 (66,69-71,14)	0,96	60-77	70,58 (68,14-72,45)
CHGM** (%)	33,10 (32,07-33,45)	32,66 (32,12-33,51)	0,73	32,0-36,0	33,67 (33,05-33,90)
Plaquetas (x10³/μL)	142 (79-238)	183 (92-267,25)	0,56	200-500	273 (241,25-368,5)
PPT** (g/dL)	8,6 (7,4-9,6)	7,10 (6,20-8,15)	0,02	6,0-8,0	7,1 (6,6-7,4)

*p, Teste de Mann-Whitney

** VGM, volume globular médio; CHGM, concentração globular média de hemoglobina; PPT, proteína plasmática total.

^a, Fonte: Jain (1993)

Tabela 9. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do leucograma dos cães pertencentes aos grupos LVC, CNCP e sadio no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)	p*	Valores de Referência^a	Grupo Sadio (n=18)
LG** (/µL)	6700 (5200-11600)	8950 (6175-11125)	0,35	6000-17000	9450 (7000-12075)
Basófilo (/µL)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,33	raros	0,00 (0,00-0,00)
Eosinófilo (/µL)	234 (39-405)	438 (58-963)	0,14	100-1250	688 (339-1134)
Mielócito (/µL)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	1,00	-	0,00 (0,00-0,00)
Metamielócito (/µL)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	1,00	-	0,00 (0,00-0,00)
Bastão (/µL)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,22	0-300	0,00 (0,00-0,00)
Segmentado (/µL)	4617 (4216-9520)	5894 (4392-8235)	0,27	3000-11500	6491 (4249-8472)
Linfócito (/µL)	1053 (464-1541)	794 (338-1221)	0,36	1000-4800	1894 (1212-2695)
Monócito (/µL)	434 (335-928)	637 (410-1099)	0,25	150-1350	603 (339-764)

*p, Teste de Mann-Whitney

**LG, leucometria global

^a, Fonte: Jain (1993)

-, Ausentes

4.4.3 Provas de função hepática

Na tabela 10 observam-se os resultados individuais, mediana e intervalo interquartil (25% e 75%) das provas de função hepática realizadas nos animais pertencentes ao grupo sadio.

Tabela 10. Valores individuais, mediana e intervalos interquartil (25 e 75%) das provas de função hepática dos 18 cães pertencentes ao grupo sadio no ano de 2007.

	ALT (g/dL)	FA (g/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)
S1	56,0	73	7,10	2,90	4,20
S2	32,0	68	5,60	2,90	2,70
S3	47,3	45	7,12	3,40	3,72
S4	47,1	107	5,80	3,00	2,80
S5	36,6	28	6,91	2,80	4,11
S6	41,9	49	7,12	3,20	3,92
S7	36,6	24	6,50	3,40	3,10
S8	41,9	33	6,04	3,20	2,84
S9	36,6	22	6,40	2,80	3,60
S10	37,0	30	6,20	3,30	2,90
S11	36,6	20	6,30	3,20	3,10
S12	47,1	33	6,10	3,30	2,80
S13	62,8	38	6,90	3,30	3,60
S14	41,9	20	5,94	2,90	3,04
S15	40,7	49	6,20	3,40	2,80
S16	41,9	33	7,13	4,00	3,13
S17	31,4	24	6,80	2,90	3,90
S18	31,4	33	5,80	2,70	3,10
Mediana	41,3	33,0	6,35	3,20	3,10
Intervalo 25-75%	36,6-47,1	24,0-49,0	6,01-6,95	2,90-3,32	2,80-3,76
Valores de Referência*	21,0-102,0	20,0-156,0	5,40-7,10	2,60-3,30	-

* Kaneko *et al.*. 1997

4.4.4 Detecção de antígenos de *Dirofilaria immitis* e anticorpos contra *Ehrlichia canis* e *Borrelia burgdorferi*

Seis (54,5%) animais pertencentes ao grupo LVC foram positivos no Teste SNAP 3Dx para presença de anticorpos contra *E. canis*. Destes seis animais, um apresentou sorologia positiva para presença de antígenos de *D. immitis* e anticorpos contra *B. burgdorferi*. Dos animais pertencentes ao grupo CNCP, 18 (75,0%) apresentaram sorologia positiva para anticorpos contra *E. canis* (Figura 11). Todos os animais pertencentes ao grupo sadio foram negativos para presença de anticorpos contra *E. canis* e *B. burgdorferi* e antígenos de *D. immitis* no Teste SNAP 3Dx (Idexx).

O ANEXO D apresenta os resultados do Teste SNAP 3Dx de cada animal do grupo LVC e CNCP.

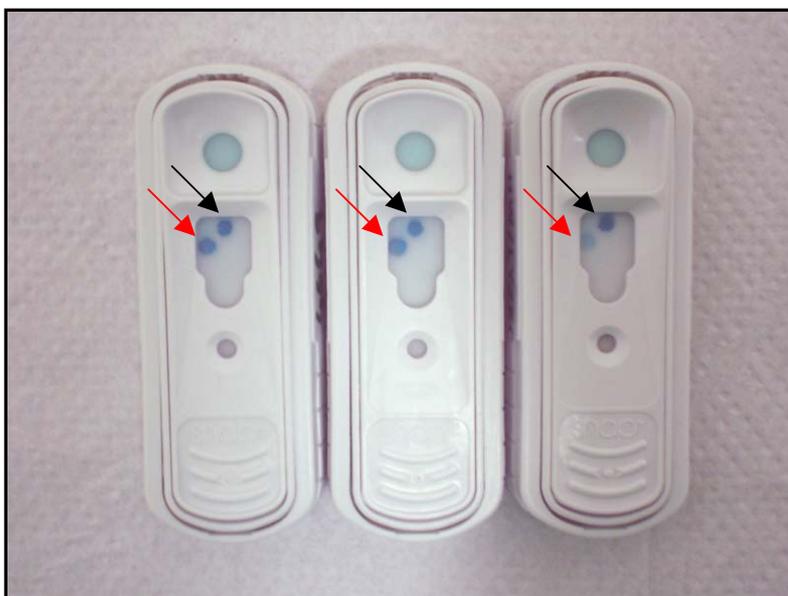


Figura 11. Resultados positivos para pesquisa de anticorpos contra *Ehrlichia canis* (seta vermelha) em soro canino. Controle positivo (seta preta) (Teste SNAP 3Dx).

4.5. NECROPSIA

A necropsia foi realizada nos 35 cães pertencentes ao grupo LVC (n=11) e CNCP e (n=24) e não foi observada qualquer alteração macroscópica sugestiva de diátese hemorrágica durante o procedimento. A tabela 11 apresenta os principais achados macroscópicos presentes no grupo LVC e no grupo CNCP.

Tabela 11. Alterações macroscópicas observadas durante a necropsia dos cães pertencentes aos grupos LVC e CNCP no ano de 2007.

	Grupo LVC (n=11)	Grupo CNCP (n=24)
Linfadenomegalia	7	5
Esplenomegalia	2	2
Hepatomegalia	1	0
Hidronefrose	3	1

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, *Leishmania* sp. foi isolada em 19 dos 43 animais sororeatores para leishmaniose. Porém, 24 cães foram parasitologicamente negativos e apresentaram baixos títulos sorológicos de 1:40 e 1:80. Esses resultados reforçam a possibilidade de reações cruzadas na RIFI para leishmaniose visceral com outros patógenos, porém, não descartam a presença de infecção por *Leishmania* sp., em virtude da baixa sensibilidade das técnicas parasitológicas (Schalling et al., 2002).

Teses sorológicas, como a RIFI, apesar de freqüentemente utilizados como triagem para diagnóstico da leishmaniose canina, apresentam inúmeras desvantagens como: a necessidade de pessoas capacitadas e treinadas para leitura e interpretação individual das lâminas, a utilização de variados ponto de corte empregados em diferentes laboratórios e as variadas respostas imunológicas apresentadas pelos animais, além de não distinguirem infecção passada de infecção presente, podendo resultar em falso-negativos ou falso-positivos (Alvar et al., 2004; Ferroglio et al., 2007).

Costa et al. (1991) relataram a presença de reação cruzada na RIFI para leishmaniose visceral quando amostras de soro obtidas de animais infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*, na porcentagem de 75% e 83% respectivamente, foram analisadas. Em um estudo realizado por Ferreira et al. (2007), a

RIFI para leishmaniose visceral apresentou reações cruzadas com *Leishmania (V.) braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Ehrlichia canis*.

De acordo com Madeira et al. (2005), cães com leishmaniose tegumentar podem apresentar sorologia positiva na RIFI para leishmaniose, o que torna diagnóstico diferencial com a LVC difícil. A ocorrência de infecção mista entre *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) chagasi* em cães de áreas suburbanas do Município do Rio de Janeiro (Madeira et al., 2006a), indicando sobreposição da LT e LV, enfatiza a importância de se complementar a investigação dos cães soro reatores usando métodos de diagnósticos parasitológicos e identificação das espécies de *Leishmania* (Madeira et al., 2006b). Neste estudo relatamos mais um caso de co-infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* no Município do Rio de Janeiro.

Aviles et al. (1999) sugerem que a cultura parasitológica seja utilizada em centros de referências para leishmaniose com a finalidade de diagnóstico e pesquisa.

Na presente dissertação não foram observadas predisposição sexual, etária ou racial nos cães com leishmaniose visceral, o que está de acordo com diversos autores (Abranches et al., 1991; Fisa et al. 1999; Feitosa et al., 2000). Entretanto, alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado a susceptibilidade de algumas raças à infecção por *L. (L.) chagasi* (Abranches et al., 1991; Sideris et al., 1996). Porém diversos autores não confirmam tal afirmação, que pode ser atribuída ao habitat do cão e sua exposição ao flebotomíneo (Pozio et al., 1981; Amela et al., 1995).

Com relação à linfadenopatia observada, os linfonodos poplíteos foram os mais acometidos nos cães do grupo LVC, seguidos dos linfonodos pré-maxilares, cervicais e pré-escapulares. Em contraste a este achado, Ciaramella et al. (1997) relatam um maior aumento dos linfonodos pré-escapulares quando comparados aos linfonodos poplíteos

e atribuem este achado à grande quantidade de lesões cutâneas, localizadas na região cranial dos animais estudados. Tal fato não foi evidenciado neste estudo, uma vez que cães com lesões cutâneas localizadas na região cranial apresentaram um maior aumento dos linfonodos poplíteos, estando de acordo os achados de Feitosa *et al.* (2000), que sugerem um envolvimento visceral para tal evento. Devido à co-infecção de alguns cães do grupo LVC por *E. canis*, é possível que a linfadenopatia observada esteja sendo exacerbada, já que na ehrliquiose canina este achado é freqüentemente encontrado nas fases aguda e crônica da doença (Cohn, 2003; Harrus et al., 1997), o que pode também explicar a hiperplasia dos linfonodos de cães do grupo CNCP.

Mucosas pálidas, freqüentemente relatadas na LVC (Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella et al., 1997), foram observadas na maioria dos animais do grupo LVC e confirmadas hematologicamente por quadros de anemia, estando de acordo com os achados observados por Ikeda et al. (2003) e Campos (2005). Aparentemente, relacionado a este achado, a maioria dos animais apresentou emagrecimento e apatia, estando de acordo com os relatos de Kontos & Koutinas (1993) e Alvar et al. (2004). Considerando a presença de anticorpos para *E. canis* no soro de alguns cães do grupo LVC, é possível supor que esses sinais clínicos estejam sendo agravados por esse agente infeccioso (Cohn, 2003; Shipov et al., 2008), assim como nos animais do grupo CNCP.

As alterações dermatológicas predominantemente observadas no grupo LVC estão de acordo com as relatadas na literatura (Longstaff & Guy, 1985; Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003; Alvar et al., 2004). Onicogrifose, comumente relatada na LVC (Ferrer 1994; Kontos & Koutinas, 1993, Feitosa et al., 2000), foi observada em somente dois animais, concordando com Slappendel (1988) e

Ferrer & Slappendel (2000), que relatam que tal evento ocorre em pequena proporção. Porém, é possível que neste estudo, esse achado seja atribuído a precoce retirada dos animais soropositivos para LVC pela Secretaria Municipal de Saúde. No grupo CNCP, as alterações dermatológicas observadas podem ser explicadas por infecções secundárias, em virtude da infecção por *E. canis* (Cohn, 2003).

No presente estudo, lesões oculares como ceratoconjuntivite e blefarite, comumente relatadas na LVC (McConnell et al., 1970; Longstaffe & Guy, 1985; Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella et al., 1997; Feitosa et al., 2000; Alvar et al., 2004) foram observadas nos cães do grupo LVC. Esplenomegalia e hepatomegalia (Slappendel & Ferrer, 2000; Ciaramella & Corona, 2003) estiveram presentes em um reduzido número de animais, concordando com os achados Kontos & Koutinas (1993) e pode ser atribuído à fase da doença em que se encontravam os cães.

A ausência de diátese hemorrágica observada nos cães com leishmaniose visceral no presente estudo contradiz os achados de Ferrer (1994), Moreno et al. (1998), Ciaramella & Corona, (2003), Ciaramella et al. (2005). Essa diferença também pode ser explicada pelo recolhimento precoce dos cães pela Secretaria Municipal de Saúde, minimizando a ocorrência de sinais clínicos graves ou até mesmo, atribuída à cepa de *Leishmania (L.) chagasi* envolvida na infecção. Nos animais do grupo CNCP, a tendência a sangramentos também não foi observada, inclusive nos animais infectados por *E. canis*, onde esse achado é comumente relatado por outros autores (Harrus et al., 1997; Harrus et al., 1999; Cohn, 2003; Shipov et al., 2008). Tal diferença pode ser atribuída aos diferentes estágios clínicos da doença (agudo, sub-agudo ou crônico) e/ou as cepas de *E. canis* envolvidas na infecção.

Através da determinação do TS é possível obter uma avaliação indireta da contratilidade, contagem e função plaquetária (Moreno et al., 1998). Os valores de TS, mensurados nos animais do grupo sadio, encontraram-se dentro dos parâmetros de normalidade indicados pela literatura (Coles, 1984; Meyer & Harvey, 2004), porém diferem dos valores encontrados por Moreno et al. (1998), podendo esta diferença ser atribuída à metodologia utilizada.

Na maioria dos animais do grupo LVC e CNCP, o tempo de sangramento encontrou-se dentro dos parâmetros de normalidade, com exceção de um único animal em cada grupo (LVC e CNCP), onde foi observado aumento. Esse achado, juntamente com a plaquetopenia observada nestes dois animais, pode sugerir distúrbios primários da hemostasia envolvendo doença plaquetárias quantitativas e/ou qualitativas e vasculites (Moreno et al., 1998; Jain, 1993). Porém, no animal pertencente ao grupo LVC, essa alteração não deve ser atribuída somente ao protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, uma vez que esse cão era soro-positivo para presença de anticorpos contra *E. canis*; o que pode explicar o aumento do TS no animal do grupo CNCP.

Os valores de TP, mensurados nos cães do grupo sadio para a obtenção de valores de referência, foram semelhantes aos encontrados por Pelagalli et al. (2004) e Ciaramella et al. (2005) e Cortese et al. (2006). Já os valores de TTPA foram maiores que os citados por Moreno (1999), Pelagalli et al. (2004) e Ciaramella et al. (2005) e Cortese et al. (2006). Essas diferenças possivelmente são atribuídas à metodologia utilizada e aos reagentes empregados para detecção do TP e TTPA, confirmando assim a necessidade de utilização de valores próprios.

Em alguns animais do grupo LVC foi possível observar prolongados tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, o que sugere alterações na via extrínseca e intrínseca da coagulação sanguínea, respectivamente. Porém, este achado não deve ser atribuído exclusivamente ao patógeno *Leishmania (L.) chagasi*, uma vez que o aumento no TP e TTPA dos cães do grupo LVC foi observado, em sua maioria, em animais soro-positivos para presença de anticorpos contra *E. canis* (n=3 e n=4, respectivamente). Cortese et al. (2006) relatam a presença de valores normais de TP em cães infectados por *L. infantum*, *E. canis* e co-infectados por *L. infantum* e *E. canis* e atribuem esse fato à baixa sensibilidade dos testes comerciais de TP em plasma canino; e a presença de TTPA prolongado em cães infectados por *L. infantum* e co-infectados por *L. infantum* e *E. canis* quando comparados aos animais infectados por *E. canis* e grupo controle, sugerindo um sinergismo entre leishmaniose e ehrliquiose. De acordo com Ciaramella et al. (2005), cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam valores normais de TP, atribuindo tal fato à baixa sensibilidade dos testes comerciais de TP em plasma canino (Cortese et al., 2006); e TTPA prolongado, atribuindo esta alteração na via intrínseca da coagulação à possíveis danos renais, levando à perda de anti-trombina III, e hepáticos que podem influenciar na síntese e metabolismo dos fatores de coagulação. Recentemente, Shipov et al. (2008) observaram TP e TTPA prolongados em cães naturalmente infectados por *E. canis*, o que pode explicar os prolongados TP e TTPA dos animais infectados por este agente no grupo CNCP do presente estudo. De acordo com a análise estatística empregada, não houve diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$) nos valores de TP e TTPA entre o grupo LVC e CNCP.

A presença de produtos de degradação da fibrina, juntamente com resultados de prolongados TP e TTPA e presença de plaquetopenia em um animal do grupo LVC sorologicamente negativo para presença de anticorpos contra *E. canis*, sugerem o consumo de plaquetas e fatores de coagulação como ocorre na coagulação intravascular disseminada, achado também observado por Font et al. (1994) e Valladares et al. (1998) na leishmaniose visceral canina. Níveis normais de PDF em cães com leishmaniose visceral foram observados por Moreno (1999), Jüttner et al. (1991) e Ciaramella et al. (2005).

A anemia normocítica normocrômica observada nos animais infectados por *L. (L.) chagasi* tem sido relatada por diversos autores (Abranches et al., 1991; Kontos & Kountinas, 1993; Ciaramella et al., 1997; Ikeda et al., 2003; Campos, 2005; Reis et al., 2006). Embora não tenha sido realizada a contagem de reticulócitos, na maioria dos cães infectados não foram observados sinais de regeneração, o que sugere a presença de uma anemia não-regenerativa em consequência de uma diminuição da eritropoiese decorrente de hipoplasia ou aplasia da série eritróide, freqüentemente observada em doenças crônicas (Jain, 1993; Ciaramella et al., 1997; Feitosa et al., 2000; Costa-Val et al., 2007). É importante ressaltar a presença da co-infecção por *E. canis* na maioria dos animais, o que pode resultar no agravamento do processo, uma vez que anemia não-regenerativa é comumente relatada na ehrliquiose canina (Troy et al., 1980; Harrus et al., 1997; Meyer & Harvey, 2004). A anemia normocítica hipocrômica observada pode ser atribuída à deficiência de ferro decorrente de parasitismo intestinal ou enterite crônica, achado clínico relatado em alguns cães com LVC (Ferrer et al., 1991; Ciaramella & Corona, 2003).

A anemia da doença inflamatória (ADI), que frequentemente acompanha doenças inflamatórias crônicas (Jain, 1993 & Meyer & Harvey, 2004), também pode ter contribuído para a anemia observada nos cães do grupo LVC. Anormalidades como a indisponibilidade de ferro apreendido por macrófagos, produção de mediadores inflamatórios que inibem a eritropoiese e redução da meia vida dos eritrócitos associados a danos de membrana, causados por oxidantes endógenos gerados durante a inflamação podem ser responsáveis por este processo. De acordo com Kontos & Koutinas (1993) e Campos (2005), ADI pode ser um dos principais mecanismos envolvidos na hipoplasia eritróide e anemia observadas nos animais com leishmaniose visceral.

Causas como perda de sangue e diminuição da meia-vida das hemácias associada à produção de auto-anticorpos, levando ao seqüestro esplênico também não devem ser excluídas (Keenan et al, 1984; De Luna et al., 2000). Em estudos realizados por Slappendel (1988) e Kontos & Koutinas (1993), um mecanismo imunomediado foi descrito em alguns cães com LVC, que apresentaram teste de “Coombs” positivo e presença de título para anticorpo antinuclear (ANA). De acordo com Bildik et al. (2004), a lesão oxidativa dos eritrócitos causa uma diminuição da meia-vida e subsequente hemólise, contribuindo para anemia observada na leishmaniose visceral.

No presente estudo, a presença de policromasia, metarrubríctos e corpúsculos de Howell Jolly observados em alguns animais do grupo LVC e CNCP, foram insuficientes para classificar a anemia encontrada como uma anemia regenerativa, já relatada na LVC (Longstaffe & Guy, 1985 e Ikeda et al., 2003).

A anemia observada no grupo CNCP foi em sua maioria normocítica normocrômica. A ausência de sinais de regeneração sugere a existência de um

processo não-regenerativo, que pode ser explicado nestes animais pela infecção por *E. canis*, levando a diminuição da eritropoiese decorrente de hipoplasia ou aplasia da série eritróide comumente observada em doenças crônicas (Harrus et al., 1999; Meyer & Harvey (2004) ou devido à ADI. A presença de anemia normocítica hipocrômica e microcítica hipocrômica em alguns cães pode ser explicada pela deficiência de ferro decorrente de enterites crônicas (Cohn, 2003; Meyer & Harvey, 2004) ou atribuída à ADI (Meyer & Harvey, 2004).

A hiperproteinemia presente nos cães do grupo LVC confirma os achados de outros autores (Slappendel, 1988; Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella *et al.* 1997; Ciaramella & Corona, 2003) sendo atribuída à ativação policlonal de linfócitos B e conseqüente produção de anticorpos, freqüentemente observados na leishmnirose canina (Koutinas *et al.*, 1999). Em alguns animais, co-infectados por *E. canis*, este achado pode estar sendo exacerbado. No grupo CNCP, os valores de proteína plasmática total encontraram-se dentro dos parâmetros de normalidade (Jain, 1993) na maioria dos animais. A hiperproteinemia observada em alguns cães deste grupo (n=2) pode ser atribuída à desidratação ou aumento da síntese de globulinas ou explicada pela infecção por *E. canis* (n=4), onde comumente é observada hiperglobulinemia (Harrus *et al.*, 1997; Frank & Breitschwerdt, 1999). Baixos valores de proteína plasmática total podem ser atribuídos à diminuição da ingestão de alimento, perda renal e gastrintestinal e diminuição na produção de albumina por lesão hepática (Harrus *et al.*, 1999; Meyer & Harvey, 2004). Cães com ehrliquiose em fase crônica podem sofrer complicações como glomerulonefrite associada à síndrome nefrótica ou enteropatias, levando a perda de proteínas, principalmente albumina (Cohn, 2003; Meyer & Harvey,

2004), o que pode justificar os baixos valores de PPT de dois cães do grupo CNCP, soro-positivos para presença de anticorpos contra *E. canis*.

No presente estudo, a plaquetopenia observada nos cães do grupo LVC está de acordo com o relato de outros autores (Longstaffe & Guy, 1985; Ciaramella et al., 1997; Ciaramella & Corona, 2003; Costa-Val et al, 2007) e pode ser atribuída a mecanismos imunomediados, levando a formação de anticorpos anti-plaquetas e diminuição por consumo, explicada pela esplenomegalia e vasculite (Slappendel & Greene, 1990). Neste estudo, é importante considerar a presença da co-infecção por *E. canis* (n=3) exacerbando o quadro trombocitopênico, uma vez que este é o achado laboratorial mais comum e consistente encontrado em cães com ehrliquiose naturalmente e experimentalmente infectados (Waner et al., 1995; Harrus et al., 1999).

Nos animais do grupo LVC e CNCP, soro-positivos para presença de anticorpos contra *E. canis*, além dos mecanismos imunomediados e destruição por consumo, comumente observados na fase aguda da ehrliquiose canina, uma diminuição na produção plaquetária devido a hipoplasia megacariocítica (Woody & Hoskins, 1991) é considerada a principal razão da trombocitopenia observada em animais em fase crônica severa.

Uma grande variedade de resultados referentes à contagem total de leucócitos é relatada na LVC (Longstaff & Guy, 1985; Slappendel, 1988; Koutinas et al., 1999; Ikeda et al., 2003; Ciaramella & Corona, 2003; Campos, 2004). Neste estudo, a maioria dos animais do grupo LVC apresentou resultados de leucometria global dentro dos parâmetros de normalidade descritos por Jain (1993), estando de acordo com os achados de Campos (2004) e Costa-Val et al. (2007). A leucopenia observada nestes animais (n=3), já descrita por alguns autores na LVC (Longstaffe & Guy, 1985,

Slappendel, 1988), pode ser atribuída a co-infecção por *E. canis* (Harrus 1997; Cohn, 2003). Linfopenia, observada em alguns animais, tem sido relatada por alguns autores na LVC (Bourdoiseau et al., 1997; Reis et al., 2006) e conferida a natureza imunossupressora da doença. Em contraste com os relatos de Yamaguchi et al. (1983) e Ikeda et al. (2003), monocitose foi observada em somente dois animais do grupo LVC e pode ser atribuída a uma possível migração de monócitos ao tecido. No grupo CNCP, a leucopenia e leucocitose com neutrofilia e desvio nuclear de neutrófilos à esquerda observadas podem estar associados à infecção por *E. canis* (Harrus et al., 1997) e atribuídas à fase de infecção ao qual se encontravam os animais.

Neste estudo, nenhuma alteração macroscópica sugestiva de diáteses hemorrágicas foi observada no grupo LVC, estando de acordo com Slappendel & Ferrer (2000). Entretanto, Pumarola et al. (1991) relataram severos quadros de hemorragia durante a necropsia de cães com LVC. Os resultados do presente estudo podem estar relacionados com o recolhimento precoce dos cães pela Secretaria Municipal de Saúde, minimizando a ocorrência de alterações macroscópicas graves ou a cepa de *Leishmania (L.) chagasi* envolvida na infecção. Nos animais do grupo CNCP, também não foram observadas alterações macroscópicas hemorrágicas, até mesmo nos animais soro-positivos para presença de anticorpos contra *E. canis*, o que pode ser atribuído à fase da doença (aguda, sub-aguda ou crônica) em que se encontravam os cães.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo foi possível chegar as seguintes conclusões:

1. Em virtude da presença de anticorpos contra *Ehrlichia canis* no soro de alguns cães do grupo LVC, não foi possível atribuir as alterações encontradas na hemostasia primária e secundária desse grupo, exclusivamente ao agente *Leishmania (Leishmania) chagasi*.
2. A leishmaniose visceral canina pode induzir a coagulação intravascular disseminada.
3. Os cães com leishmaniose visceral não apresentaram predisposições etárias, sexuais e raciais.
4. Os principais sinais clínicos observados nos cães com leishmaniose foram linfadenopatia, mucosas hipocoradas, emagrecimento e áreas de alopecia.
5. Os linfonodos poplíteos foram os mais acometidos nos cães com leishmaniose visceral.

6. Os cães com leishmaniose visceral não apresentaram sinais clínicos de hemorragia.
7. Os cães com leishmaniose visceral apresentaram anemia, trombocitopenia e hiperproteinemia.
8. Os cães com leishmaniose visceral não apresentaram alterações macroscópicas hemorrágicas durante procedimento de necropsia.
9. Nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi observada entre o grupo LVC e o grupo CNCP mediante os resultados laboratoriais de hemostasia e hemograma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991 Sep;13(5):537-50.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1-88.

Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachón I, Cañavate C, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol* 1995 Apr;11(2):157-61.

Aoki T, Tomiyama Y, Honda S, Mihara K, Yamanaka T, Okubo M, et al. Association of the antagonism of Von Willebrand factor but not fibrinogen by platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonism with prolongation of bleeding time. *J Thromb Haemost* 2005 Oct;3(10):2307-14.

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnosis methods. *J Parasitol* 1999 Apr;85(2):181-7.

Barata RA, França-Silva JC, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV, et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004 Aug;99(5):481-7.

Barros, CSL. Guia da técnica de necropsia dos mamíferos domésticos. Santa Maria: Imprensa Universitária; 1988.

Bernardini S, Bick MD, Fekete LE. Antithrombin III patterns in disseminated intravascular coagulation. *Am J Clin Pathol* 1980 Apr;73(4):577-583.

Bildik A, Kargin F, Seyrek K, Pasa S, Ozensoy S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2004 Aug;77(1):63-6.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* – infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1997 Oct 6;59(1Suppl2):21-30.

Campos KCH. Avaliação citológica da medula óssea, estoques de ferro medular, hemograma e níveis séricos de proteína total, albumina e globulina em cães (*Canis familiares*) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Niterói; 2005. Mestrado [Dissertação em Cirurgia e Clínica Veterinária] – Universidade Federal Fluminense.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov;5(11):873-82.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997 Nov 22;141(21):539-43.

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2003 May;25(5):358-69.

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, et al. Altered platelet aggregation on coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J* 2005 May;169(3):465-7.

Cohn LA. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003 Jul;33(4):863-84.

Coles EH. *Patologia Clínica Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Manole; 1984.

Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Manco A, Lombardi P, et al. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006 Dec;53(10):546-8.

Costa CA, Genaro O, Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MSM. Leishmaniose visceral canina: Avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos sorológicos. Rev Soc Bras Med Trop 1991;24:21-25.

Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexandrer B, Williams P, et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. Vet J 2007 Nov;174(3):636-43.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962 May-Jun;4:198-212.

De Luna R, Ferrante M, Severino L, Ambrosio R, Piantedosi D, Gradoni L, Lucisano A, Persechino A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. J Comp Pathol 2000 Feb-Apr;122(2-3):213-6.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996 Sep-Oct;14(5):417-23.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004 Sep;27(5):305-18.

Di Lorenzo C, Proietti FA, Assunção RM. A urbanização da leishmaniose visceral no Brasil – uma breve revisão. Rev Soc Bras Med Trop 2000;33(1):316-7.

Dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol 1998 Jul;12(3):315-7.

Dupha N, Littman MP. Epistaxis. Compend Contin Educ Pract Vet 1992;14:1033-41.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MC, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). Clínica Veterinária 2000 Set-Oct; 5(28):36-43.

Ferreira EC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007 May 31;146(3-4):235-41.

Ferrer L, Juanola B, Ramos JA, Ramis A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol* 1991 Jul;28(4):342-3.

Ferrer, L. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD. *Terapeutica Veterinaria de los Pequeños Animales*. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; 1994. XI.v. p.296-301.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol*. 2007 Mar 15;144(1-2):162-6.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 1999 Jun 15;83(2):87-97.

Font A, Closa JM, Molina A, Mascort J. Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 1993 Sep;34(9):466-470.

Font A, Gines C, Closa JM, Mascort J. Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. *Am Vet Med Assoc* 1994 Apr 1;204(7):1043-4.

Frank JR, Breitschwerdt EB. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 1999 May-Jun;13(3):194-201.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 1989 Dec;41(6):687-725.

Harrus S, Kass PH, Klement E, Waner T. Canine monocytic ehrlichiosis: A retrospective study of 100 cases and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec* 1997 Oct 4;141(14):360-3.

Harrus S, Waner T, Hylton B, Jongejan F, Cornelissen AWCA. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1999 Sep;37(9):2745-9.

Ikeda FA, Ciarlini PC, Feitosa MM, Gonçalves ME, Luvizotto MVR, Lima VMF. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica Veterinária* 2003 Nov-Dez;8(47):42-8.

Jain NC. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.

Jandl JH. *Blood: Textbook of Hematology*. Boston: Little, Brown and Company; 1987.

Jüttner C, Rodríguez Sánchez M, Rollán Landeras E, Slappendel RJ, Fragío Arnold C. Evaluation of the potencial causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec* 2001 Aug 11;149(6):176-9.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. New York: Academic Press; 1997.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog II – Pathology. *Vet Pathol* 1984 Jan;21(1):80-6.

Kontos VJ, Koutinas AF. Old world canine leishmaniasis. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1993 Jul;15(7):949-959.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999 Sep-Oct;35(5):376-83.

Lainson R. The American Leishmaniasis: Some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(5):569-96.

Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 1993;32:161-259.

Longstaffe JA, Guy MW. Leishmaniasis in dogs. *Veterinary Annual* 1985;25:358-67.

Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1912;4:84-95.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Serra CM, Pereira SA, Figueiredo FB, et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res* 2005 Aug;97(1):73-6

Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006a May;100(5):442-5.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006b Jun 15;138(3-4):366-70.

Makni S, Ayed K, Ben Said M, Ben Rachid MS. Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1989 Aug;83(4):349-55.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82(4):566-7.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Públ* 1994;10(2):359-75.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30:162-4.

McConnell EE, Chaffee EF, Cashell IG, Garner FM. Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1970, Jan 156(2):197-203.

Meyer DJ, Harvey JW. Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 3 ed. St. Louis: Saunders; 2004.

Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVM, França-Silva R, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol 2007 Jun 20;147(1-2):67-76.

Ministério da Saúde (MS). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: 2006; 120 p.

Ministério da Saúde (MS). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: 2007; 182 p.

Monteiro PS. Leishmaniose visceral no Brasil: Perspectivas de controle. Rev Soc Bras Med Trop 2002;35(1):335.

Moreno P, Lucena R, Ginel PJ. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. Vet Rec 1998 Jan 24;142(4):81-3.

Moreno P. Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. Vet Rec 1999 Feb 13;144(7):169-71.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 2001 Nov;65(5):510-7.

Pelagalli A, Ciaramella P, Lombardi P, Pero ME, Cortese L, Corona M, et al. Evaluation of adenosine 5'-diphosphate (ADP) and collagen-induced platelet aggregation in canine leishmaniasis. J Comp Pathol 2004 Feb-Apr;130(2-3):124-9.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect Immun 1994 Jan;62(1):229-35.

Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.* 1981 Dec;38(4):383-93.

Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L.. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Path* 1991 Oct;105(3):279-86.

Rebar AH, Boon GD. An approach to the diagnosis of bleeding disorders in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1991;17:227-32.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006 Aug;81(1):68-75.

Schalling HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroom CCM, Hommers M, Özvel Y, et al. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti leishmania antibodies in dogs. *Vet Parasitol* 2002;109:1-8.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994 Jul-Sep;89(3):471-8.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) chagasi* for the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006 Aug; 101(5):577-579.

Shipov A, Klement E, Reuveni-Tager L, Waner T, Harrus S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 2008 Jan 17; [Epub ahead of print].

Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A, Dotsika E. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. *Parasite* 1996 Jun;3(2):125-30.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais. Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001 Apr;96(3):285-91.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 2002 Mar;9(1):43-50.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis: A review based on 95 in Netherlands. *Vet Q* 1988 Jan;10(1):1-16.

Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE. *Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. 2 ed. México: Interamericana McGraw-Hill; 2000. p.496-504.

Slappendel RJ, Greene CE. Leishmaniasis. In: Greene CE. *Infections Diseases of the dog and the cat*. 2 ed. St Louis: WB Saunders; 1990.

Valladares JE, Ruiz De Gopegui R, Riera C, Alberola J, Gállego M, Espada Y, et al.. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res Vet Sci* 1998 May-Jun;64(3):195-8.

Troy GC, Vulgamott JC, Turnwald GH. Canine ehrlichiosis: A retrospective study of 30 naturally occurring cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1980;16(2):181-7.

Vasconcelos AC. *Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária*. Brasília: MEC/ABEAS; 1998.

Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31(2):85-92.

Yamaguchi RA, French TW, Simpson CF, Harvey JW. *Leishmania donovani* in the fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19:723-6.

Waner T, Harrus S, Weiss DJ, Bark H, Keysary A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995 Sep;48(1-2):177-82.

Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, et al. *Clinical Hematology*. 8 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1981.

Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991 Jan;21(1):75-98.

World Health Organization (WHO). Control of Leishmniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 793. Geneva: 1990; 158 p.

ANEXOS

ANEXO A – Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) dos 43 cães provenientes do inquérito sorológico realizado pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro no ano de 2007.

Tabela 1. Dados sorológicos da RIFI dos 43 cães do estudo provenientes do inquérito sorológico realizado pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro no de 2007.

	Animais (n)
1:40	16
1:80	14
1:160	2
1:320	1
1:640	5
1:1280	4
1:2560	1
Total	43

ANEXO B – Resultados individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) das provas de hemostasia, eritrograma, leucograma, plaquetometria e proteínas plasmáticas totais dos cães pertencentes ao grupo LVC e grupo CNCP utilizados neste estudo.

Tabela 1. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) das provas de hemostasia dos 11 cães pertencentes ao grupo LVC no ano de 2007.

	TS^a (s)*	TP^b (s)*	TTPA^c (s)*
A1	162	7,9	42,7
A2	180	7,8	46,4
A3	130	120,0	95,1
A4	263	120,0	38,1
A5	150	120,0	48,7
A6	178	7,1	128,0
A7	120	7,9	21,8
A8	171	8,7	38,3
A9	135	120,0	39,4
A10	210	7,6	50,7
A11	121	120,0	57,8
Mediana	162	8,7	46,4
Intervalo 25-75%	130,0-180,0	7,8-120,0	38,3-57,8

^a TS, tempo de sangramento; ^b TP, tempo de protrombina; ^c TTPA, tempo de tromboplastina parcial ativada

* (s), segundos

Tabela 2. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do eritrograma dos 11 cães pertencentes ao grupo LVC no ano de 2007.

	Eritrócitos (x10⁶/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Ht^a (%)	VGM^b (fL)	CHGM^c (%)
A1	3,68	7,40	23	62,50	32,17
A2	4,99	11,3	34	68,14	33,24
A3	3,14	7,60	23	73,25	33,04
A4	3,99	9,60	29	72,68	33,10
A5	4,30	9,30	29	67,44	32,07
A6	4,23	10,6	32	75,65	33,13
A7	5,37	8,60	25	46,55	34,40
A8	4,40	9,70	29	65,91	33,45
A9	3,26	7,90	25	76,69	31,60
A10	1,81	4,70	14	77,35	33,57
A11	2,28	4,20	14	61,40	30,00
Mediana	4,00	8,60	25	68,14	33,10
Intervalo 25-75%	3,14-4,40	7,40-9,70	23-29	62,50-75,65	32,07-33,45
Valores de Referência*	5,5-8,5	12,0-18,0	37,0-55,0	60,0-77,0	32,0-36,0

* Jain, 1993

^a Ht, hematócrito; ^b VGM, volume globular médio; ^c CHMG, concentração de hemoglobina globular média

Tabela 3. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do leucograma dos 11 cães pertencentes ao grupo LVC no ano de 2007.

	LG^a (/μL)	Bas.^b (/μL)	Eos.^c (/μL)	Miel.^d (/μL)	Metam.^e (/μL)	Bast.^f (/μL)	Seg.^g (/μL)	Linf.^h (/μL)	Mon.ⁱ (/μL)
A1	11600	0	0	0	0	0	10208	464	928
A2	7700	0	770	0	0	0	4466	2079	385
A3	5200	0	0	0	0	0	4316	364	520
A4	2600	0	52	0	0	0	2236	156	156
A5	6200	0	248	0	0	0	4216	1302	434
A6	6700	0	402	0	0	0	5226	938	134
A7	11700	0	234	0	0	0	9594	468	1404
A8	8100	0	405	0	0	0	4617	2592	486
A9	13600	0	1088	0	0	0	9520	1224	1768
A10	3900	0	39	0	0	0	2457	1053	351
A11	6700	0	67	0	0	0	4757	1541	335
Mediana	6700	0,00	234	0,00	0,00	0,00	4617	1053	434
Intervalo 25-75%	5200-11600	0,0-0,0	39-405	0,0-0,0	0,0-0,0	0,0-0,0	4216-9520	464-1541	335-928
Valores de Referência*	6000-17000	raros	100-1250	0	0	0-300	3000-11500	1000-4800	150-1350

^a LG, leucometria global; ^b Bas., basófilo; ^c Eos., eosinófilo; ^d Miel., mielócito; ^e Metam., metamielócito; ^f Bast., bastão; ^g Seg., segmentado; ^h Linf., linfócito; ⁱ Mon., monócito.
* Jain, 1993

Tabela 4. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da plaquetometria e proteína plasmática total dos 11 cães pertencentes ao grupo LVC no ano de 2007.

	Plaquetometria (/µL)	Proteína Plasmática Total (g/dL)
A1	343000	11,4
A2	79000	8,6
A3	238000	9,6
A4	46000	6,2
A5	97000	8,8
A6	206000	8,6
A7	192000	9,4
A8	334000	6,8
A9	142000	7,4
A10	20000	10,0
A11	121000	7,4
Mediana	142000	8,6
Intervalo 25-75%	79000-238000	7,40-9,6
Valores de Referência	200000-500000	6,0-8,0

*Jain, 1993

Tabela 5. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) das provas de hemostasia dos 24 cães pertencentes ao grupo CNCP no ano de 2007.

	TS^a (s)*	TP^b (s)*	TTPA^c (s)*
C1	169	7,5	70,0
C2	360	120,0	21,4
C3	150	120,0	27,8
C4	200	120,0	24,3
C5	187	120,0	82,3
C6	171	8,1	35,9
C7	165	7,4	50,7
C8	139	7,3	30,6
C9	139	120,0	28,2
C10	120	120,0	37,5
C11	174	7,6	54,7
C12	175	7,8	53,3
C13	173	7,5	18,0
C14	208	7,1	35,0
C15	124	8,3	49,4
C16	167	120,0	27,9
C17	169	120,0	33,5
C18	163	7,2	133,0
C19	137	7,3	42,3
C20	130	120,0	190,0
C21	120	120,0	60,9
C22	130	7,6	48,0
C23	229	8,9	39,7
C24	174	9,1	34,3
Mediana	168,0	8,6	38,6
Intervalo 25-75%	137,0-175,0	7,5-120,0	28,8-54,3

^a TS, tempo de sangramento; ^b TP, tempo de protrombina; ^c TTPA, tempo de tromboplastina parcial ativada

* (s), segundos

Tabela 6. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do eritrograma dos 24 cães pertencentes ao grupo CNCP no ano de 2007.

	Eritrócitos (x10⁶/μL)	Hemoglobina (g/dL)	Ht^a (%)	VGM^b (fL)	CHGM^c (%)
C1	3,76	8,30	28	74,47	29,64
C2	3,70	8,40	26	70,27	32,31
C3	4,36	9,80	30	68,81	32,67
C4	4,85	11,4	34	70,10	33,53
C5	4,88	11,5	35	71,72	32,86
C6	3,66	7,40	23	62,84	32,17
C7	5,03	11,3	35	69,58	32,29
C8	4,99	11,5	34	68,14	33,82
C9	5,12	11,3	35	68,36	32,29
C10	4,13	9,40	29	70,22	32,41
C11	2,11	4,50	13	61,61	34,62
C12	2,40	4,00	14	58,33	28,57
C13	1,18	2,70	8	67,80	33,75
C14	1,23	3,20	11	89,43	29,09
C15	5,11	11,3	34	66,54	33,24
C16	4,42	11,5	33	74,66	34,85
C17	3,80	9,70	29	76,32	33,45
C18	3,23	6,30	20	61,92	31,50
C19	5,32	12,2	38	71,43	32,11
C20	4,92	11,1	34	69,11	32,65
C21	5,00	10,9	34	68,00	32,06
C22	4,32	9,80	29	67,13	33,79
C23	4,67	10,5	32	68,52	32,81
C24	5,49	11,8	36	65,57	32,78
Média	4,40	10,15	31,0	68,66	32,66
Intervalo 25-75%	3,67-5,00	7,62-11,37	23,7-34,0	66,69-71,14	32,12-33,51
Valores de Referência*	5,5-8,5	12,0-18,0	37,0-55,0	60,0-77,0	32,0-36,0

* Jain, 1993

^a Ht, hematócrito; ^b VGM, volume globular médio; ^c CHMG, concentração de hemoglobina globular média

Tabela 7. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do leucograma dos 24 cães pertencentes ao grupo CNCP no ano de 2007.

	LG^a (/μL)	Bas.^b (/μL)	Eos.^c (/μL)	Miel.^d (/μL)	Metam.^e (/μL)	Bast.^f (/μL)	Seg.^g (/μL)	Linf.^h (/μL)	Mon.ⁱ (/μL)
C1	9000	0	1530	0	0	0	4320	2070	1080
C2	33000	0	0	0	0	990	24750	330	6930
C3	6900	0	0	0	0	0	6003	276	621
C4	7200	0	432	0	0	0	5760	288	720
C5	13400	0	0	0	0	0	10720	1608	1072
C6	4500	0	45	0	0	0	2790	1260	405
C7	16100	161	805	0	0	0	10143	4186	805
C8	14300	0	429	0	0	0	12441	1287	143
C9	9900	0	2079	0	0	0	6039	297	1485
C10	5100	0	51	0	0	0	4284	561	204
C11	7900	0	158	0	0	0	5688	948	1106
C12	3200	0	32	0	0	0	2400	192	576
C13	3100	0	527	0	0	0	2232	217	124
C14	2600	0	78	0	0	52	1872	364	234
C15	9000	0	900	0	0	0	7470	540	90
C16	13800	0	552	0	0	138	10350	1104	1656
C17	6100	0	366	0	0	0	4636	671	427
C18	11200	0	336	0	0	0	8400	1008	1456

C19	10000	0	1000	0	0	0	7500	900	600
C20	9500	0	1425	0	0	0	6175	1425	570
C21	8900	0	445	0	0	0	5785	890	1780
C22	8200	0	984	0	0	0	5494	820	902
C23	6400	0	576	0	0	0	4608	768	448
C24	10900	109	1853	0	0	0	7739	545	654
Média	8950	0,0	438	0,0	0,0	0,0	5894	794,00	637,00
Intervalo 25-75%	6175-11125	0,0-0,0	58-963	0,0-0,0	0,0-0,0	0,0-0,0	4392-8235	338-1221	410-1099
Valores de Referência*	6000-17000	raros	100-1250	0	0	0-300	3000-11500	1000-4800	150-1350

^a LG, leucometria global; ^b Bas., basófilo; ^c Eos., eosinófilo; ^d Miel., mielócito; ^e Metam., metamielócito; ^f Bast., bastão; ^g Seg., segmentado; ^h Linf., linfócito; ⁱ Mon., monócito.

* Jain, 1993

Tabela 8. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da plaquetometria e proteína plasmática total dos 24 cães pertencentes ao grupo CNCP no ano de 2007.

	Plaquetometria (μL)	Proteína Plasmática Total (g/dL)
C1	61000	10,0
C2	26000	5,4
C3	81000	9,0
C4	268000	7,0
C5	315000	8,2
C6	80000	9,2
C7	241000	8,2
C8	461000	9,4
C9	95000	7,4
C10	121000	7,4
C11	112000	6,8
C12	200000	5,4
C13	213000	7,0
C14	7000	6,2
C15	166000	6,0
C16	361000	7,6
C17	339000	6,4
C18	91000	7,8
C19	265000	6,2
C20	220000	7,0
C21	140000	7,2
C22	258000	8,0
C23	132000	6,2
C24	279000	5,8
Mediana	183000	7,10
Intervalo 25-75%	92000-267250	6,20-8,15
Valores de Referência*	200000-500000	6,0-8,0

* Jain, 1993

ANEXO C – Resultados individuais, mediana e intervalo interquartil (25% e 75%) das provas de hemostasia, eritrograma, leucograma, plaquetometria, proteínas plasmáticas totais e provas de função hepática dos cães pertencentes ao grupo sadio utilizados neste estudo.

Tabela 1. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) das provas de hemostasia dos 18 cães pertencentes ao grupo sadio no ano de 2007.

	TS^a (s)*	TP^b (s)*	TTPA^c (s)*
S1	125	7,4	30,8
S2	180	7,1	30,4
S3	134	7,3	36,0
S4	130	7,2	44,6
S5	190	7,3	37,9
S6	140	7,2	41,0
S7	170	7,3	34,7
S8	139	7,4	43,1
S9	128	7,3	45,4
S10	150	7,4	41,5
S11	137	7,3	28,7
S12	131	7,1	42,6
S13	123	7,3	44,4
S14	135	7,1	41,3
S15	170	7,2	26,0
S16	192	7,1	36,6
S17	144	7,2	26,7
S18	130	7,4	28,5
Mediana	138,0	7,3	37,2
Intervalo 25-75%	130,0-170,0	7,2-7,3	30,0-42,7

^a TS, tempo de sangramento; ^b TP, tempo de protrombina; ^c TTPA, tempo de tromboplastina parcial ativada
* (s), segundos

Tabela 2. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do eritrograma dos 18 cães pertencentes ao grupo sadio no ano de 2007.

	Eritrócitos (x10⁶/µL)	Hemoglobina (g/dL)	Ht^a (%)	VGM^b (fL)	CHGM^c (%)
S1	5,93	14,10	42	70,83	33,57
S2	6,76	15,60	46	68,05	33,91
S3	5,83	13,30	41	70,33	32,44
S4	6,60	15,20	45	68,18	33,78
S5	7,08	17,20	51	72,03	33,73
S6	6,30	16,30	47	74,60	34,68
S7	5,57	13,30	41	74,95	32,44
S8	6,72	15,70	46	68,45	34,13
S9	6,64	16,20	49	73,80	33,06
S10	7,59	16,00	46	60,61	34,78
S11	5,58	12,90	38	70,04	33,06
S12	7,09	17,20	51	71,93	33,73
S13	5,58	15,80	47	71,21	33,62
S14	7,06	16,20	48	67,99	33,75
S15	6,39	13,50	41	64,16	32,93
S16	5,89	14,10	42	71,55	33,57
S17	5,56	13,90	41	73,74	33,90
S18	6,55	15,20	46	70,23	33,04
Mediana	6,57	15,40	46,0	70,58	33,67
Intervalo 25-75%	5,87-6,83	13,80-16,20	41,0-47,2	68,14-72,45	33,05-33,90
Valores de Referência*	5,5-8,5	12,0-18,0	37,0-55,0	60,0-77,0	32,0-36,0

* Jain, 1993

^a Ht, hematócrito; ^b VGM, volume globular médio; ^c CHMG, concentração de hemoglobina globular média

Tabela 3. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) do leucograma (contagem absoluta) dos 18 cães do grupo sadio no ano de 2007.

	LG^a (/μL)	Basófilo (/μL)	Eosinófilo (/μL)	Miel.^b (/μL)	Metam.^c (/μL)	Bastão (/μL)	Segmentado (/μL)	Linfócito (/μL)	Monócito (/μL)
S1	10300	0	103	0	0	0	8755	618	824
S2	6700	0	102	0	0	0	4188	1846	564
S3	6100	0	305	0	0	0	4270	1220	305
S4	9900	0	990	0	0	0	5148	3168	594
S5	9400	0	1786	0	0	0	6486	846	282
S6	7400	0	666	0	0	0	4440	1998	296
S7	16900	0	1064	0	0	0	11200	3290	1346
S8	9600	0	1344	0	0	0	5088	2208	960
S9	12900	0	903	0	0	0	8901	1935	1161
S10	7000	0	350	0	0	0	3640	2660	350
S11	14200	0	710	0	0	0	9372	3692	426
S12	9500	0	380	0	0	0	6650	1900	570
S13	13200	0	3432	0	0	0	7920	1188	660
S14	7000	0	420	0	0	0	3500	2800	280
S15	6800	0	1428	0	0	0	3536	1224	612
S16	11800	0	826	0	0	0	8378	1888	708
S17	8900	0	178	0	0	0	6497	1513	712
S18	9300	0	372	0	0	0	7812	372	744
Mediana	9450	0,0	688	0	0	0	6491	1894	603
Intervalo 25-75%	7000-12075	0,0-0,0	339-1134	0,0-0,0	0,0-0,0	0,0-0,0	4249-8472	1212-2695	339-764
Valores de Referência*	6000-17000	raros	100-1250	0	0	0-300	3000-11500	1000-4800	150-1350

^a LG, leucometria global; ^b Miel., mielócito; ^c Metam., metamielócito

* Jain, 1993

Tabela 4. Valores individuais, mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados de proteína plasmática total e plaquetometria dos 18 cães do grupo sadio no ano de 2007.

	Plaquetometria (/µL)	Proteína Plasmática Total (g/dL)
S1	469000	7,4
S2	373000	6,4
S3	273000	7,2
S4	322000	7,6
S5	210000	7,2
S6	259000	7,4
S7	237000	6,8
S8	367000	6,6
S9	364000	6,6
S10	339000	6,6
S11	200000	7,4
S12	273000	6,8
S13	264000	7,6
S14	239000	7,0
S15	244000	7,2
S16	242000	7,6
S17	421000	7,0
S18	453000	6,6
Mediana	273000	7,1
Intervalo 25-75%	241250-368500	6,6-7,4
Valores de Referência*	200000-500000	6,0-8,0

* Jain, 1993

Tabela 5. Valores individuais, mediana e intervalos interquartil (25 e 75%) das provas de função hepática dos 18 cães pertencentes ao grupo sadio no ano de 2007.

	ALT^a (g/dL)	FA^b (g/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)
S1	56,0	73	7,10	2,90	4,20
S2	32,0	68	5,60	2,90	2,70
S3	47,3	45	7,12	3,40	3,72
S4	47,1	107	5,80	3,00	2,80
S5	36,6	28	6,91	2,80	4,11
S6	41,9	49	7,12	3,20	3,92
S7	36,6	24	6,50	3,40	3,10
S8	41,9	33	6,04	3,20	2,84
S9	36,6	22	6,40	2,80	3,60
S10	37,0	30	6,20	3,30	2,90
S11	36,6	20	6,30	3,20	3,10
S12	47,1	33	6,10	3,30	2,80
S13	62,8	38	6,90	3,30	3,60
S14	41,9	20	5,94	2,90	3,04
S15	40,7	49	6,20	3,40	2,80
S16	41,9	33	7,13	4,00	3,13
S17	31,4	24	6,80	2,90	3,90
S18	31,4	33	5,80	2,70	3,10
Mediana	41,3	33,0	6,35	3,20	3,10
Intervalo 25-75%	36,6-47,1	24,0-49,0	6,01-6,95	2,90-3,32	2,80-3,76
Valores de Referência*	21,0-102,0	20,0-156,0	5,40-7,10	2,60-3,30	-

* Kaneko *et al.*, 1997

^a ALT, Alanina aminotransferase; ^b FA, fosfatase alcalina

ANEXO D – Resultado do Teste SNAP 3Dx (Idexx) dos cães pertencentes ao grupo LVC e grupo CNCP utilizados neste estudo.

Tabela 1. Resultado do Teste SNAP 3DX (Idexx) dos 11 cães pertencentes ao grupo LVC no ano de 2007.

	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
A1	-	-	-
A2	-	-	-
A3	+	-	-
A4	+	-	-
A5	-	-	-
A6	+	-	-
A7	-	-	-
A8	+	+	+
A9	-	-	-
A10	+	-	-
A11	+	-	-

-, negativo

+, positivo

Tabela 2. Resultado do Teste SNAP 3DX (Idexx) dos 24 cães pertencentes ao grupo CNCP no ano de 2007.

	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
C1	+	-	-
C2	+	-	-
C3	+	-	-
C4	+	-	-
C5	+	-	-
C6	+	-	-
C7	-	-	-
C8	-	-	-
C9	+	-	-
C10	+	-	-
C11	+	-	-
C12	+	-	-
C13	-	-	-
C14	+	-	-
C15	+	-	-
C16	+	-	-
C17	-	-	-
C18	+	-	-
C19	-	-	-
C20	+	-	-
C21	+	-	-
C22	+	-	-
C23	+	-	-
C24	-	-	-

-, negativo

+, positivo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

**ALTERAÇÕES HEMOSTÁTICAS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
PROVENIENTES DE INQUÉRITOS SOROLÓGICOS
REALIZADOS PELA SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO
RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2008