



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

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

ISABELE BARBIERI DOS SANTOS

**COMPARAÇÃO ENTRE A CITOPATOLOGIA, HISTOPATOLOGIA,
IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA EM DIFERENTES
AMOSTRAS BIOLÓGICAS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Rio de Janeiro

2011

TESE DPCDI - IPEC I.B.SANTOS 2011

Comparação entre a citopatologia, histopatologia,
imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes
amostras biológicas no diagnóstico da leishmaniose
visceral canina

ISABELE BARBIERI DOS SANTOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica
Evandro Chagas para obtenção do grau de
doutor em Ciências.

Orientador: Dra. Tânia Maria Valente
Pacheco

Rio de Janeiro

2011

ISABELE BARBIERI DOS SANTOS

Comparação a entre citopatologia, histopatologia,
imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes
amostras biológicas no diagnóstico da leishmaniose
visceral canina

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto
de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do
grau de doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Tânia Maria Valente Pacheco

Aprovada em: 11/ 03/2011

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Doutor em Biologia Parasitária

Dr. Armando de Oliveira Schubach
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Doutor em Ciências

Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Doutor em Ciências

Dr. Leonardo Pereira Quintella
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Doutor em Ciências

Dr. Rogerio Tortelly
Universidade Federal Fluminense – Doutor em Medicina Veterinária

Dedico este trabalho à minha família:
aos meus pais Luiz e Mariléa,
minha irmã Janaína e meu namorado Leonardo,
por todo amor, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por que ele é responsável por tudo.

À Dr^a. Tânia Maria Valente Pacheco (a chefia), por ter me recebido no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos quando eu estava apenas no segundo período da graduação, ter me apresentado ao vasto universo da pesquisa científica em Medicina Veterinária e além de tudo, por ser um exemplo profissional, orientadora, amiga, companheira e ter confiado e acreditado em mim.

Ao Dr. Armando de Oliveira Schubach (o grande chefe), pelo incentivo, apoio e carinho e por ter sempre um conselho que vale por dez.

Ao professor e amigo Rogerio Tortelly, pelo carinho, incentivo, dedicação, orientação e por ter me ensinado os encantos de Anatomia Patológica Veterinária.

Ao Dr. Rodrigo Caldas Menezes, pela seriedade profissional, incentivo, orientação, apoio e carinho mesmo com toda correria.

A Dra Maria de Fátima Madeira, pela orientação, auxílio, apoio, sem os quais este trabalho não seria realizado.

Ao Dr Leonardo Pereira Quintella, pelo incentivo, auxílio e apoio, mesmo com toda correria.

A Dra Isabela Dib gremião pelo estímulo, carinho, incentivo e bom humor.

Ao Dr Fabiano Borges Figueiredo auxílio e apoio, principalmente nas viagens a Baurú.

Aos meus avós João Barbieri e Ana Barbieri que são exemplos de vida e de amor e que de uma forma “fofa” sempre me apoiaram e me incentivaram. E a minha avó Gláucia dos Santos, que não está mais presente entre nós, mas tenho certeza que está muito feliz pela minha conquista.

A minha prima Roberta, pelo companheirismo e amizade.

À amiga Luisa (a lú), por me “suportar” no dia a dia das reações de imunohistoquímica, pelo carinho, incentivo, carinho, apoio, amizade e retaguarda irrestrita.

À amiga Roseli Lopes, pela amizade, estímulo e por me defender sempre que for preciso.

À amiga Thais (Japa), pelo incentivo e carinho.

Ao meu cão Tigrão (o “vira-lata” mais bonito do mundo), que foi minha primeira cobaia e mesmo assim é super carinhoso comigo até hoje. E as minhas cadelas Penélope e Neve pelo carinho.

Aos amigos Marina Furtado, Carolina Piree, Lorenzo Pissinat, André Nascimento, Luciana Vasconcellos Amado, Luiz Rodrigo Paes Leme, Thiago Teixeira, Neila Mello, Larissa Kaller, Carla Honse de Oliveira, e muitos outros pelo carinho e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, Andréia Medeiros, Denise, Ingrid, Amanda, Luciana, Adriana, Tuane e Sandro Pereira pelo apoio.

Aos colegas do Serviço de Anatomia Patológica – IPEC/FIOCRUZ Antônio Correia, Marco Francisco e Antônio Carlos pelo carinho e apoio técnico de alto padrão.

A equipe do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses - IPEC – Fiocruz, pela colaboração e dedicação nos exames realizados.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha família, meus animais e meus queridos amigos. Os momentos mais importantes da minha vida sempre incluem vocês.

Santos, I. B. **Comparação da citopatologia, histopatologia, imunocitoquímica e imuno-histoquímica em amostras de diferentes tecidos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** Rio de Janeiro, 2011. 88f. Tese [Tese em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária que acomete seres humanos e animais, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses são importante problema de saúde pública em vários países e estão incluídas entre as seis endemias de maior relevância mundial. Classicamente a leishmaniose visceral canina (LVC) se caracteriza por caquexia progressiva, anemia, febre intermitente, linfadenomegalia generalizada, sinais oculares (conjuntivite, ceratoconjuntivite, uveíte) e lesões cutâneas (dermatite exfoliativa, úlceras e alopecia). Para a confirmação do diagnóstico da LVC, é necessária a demonstração do agente etiológico nas amostras biológicas obtidas de lesões, aspirados de fígado, baço, medula óssea, pele íntegra ou de gânglios linfáticos. O presente estudo avaliou os exames citopatológico, histopatológico, imunohistoquímico e imunocitoquímico no diagnóstico da LVC, utilizando como padrão de referência a cultura parasitológica. Oitenta e um cães foram avaliados, foram incluídos no estudo 44 cães com isolamento em cultura parasitológica e caracterização de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, isolada a partir de amostras de pele íntegra da orelha e/ou baço e/ou lesão cutânea. Os cães foram submetidos à eutanásia e posteriormente a coleta de amostras biológicas para a realização do exame citopatológico (CP), exame histopatológico (HP), reação de imunocitoquímica (ICQ) e reação de imuno-histoquímica (IHQ). A maioria dos cães era do sexo masculino (61,3%; n=27). Treze cães (29,5%) foram provenientes do município do Rio de Janeiro e 70,5% (n=31) do município de Bauru-SP. A maioria dos cães apresentava bom estado geral (47,7%; n=21); 38,6% (n=17) estado geral ruim; 11,3% (n=5) estado geral regular. A presença de lesão cutânea foi observada em 11 (25%) animais. No CP foi possível à visualização de formas amastigotas em 29,5% (n=13) de raspados da escápula, 29,5% (n=13) de raspados da orelha; em 29,5% (n=13) de raspados do focinho; 45,5% (n=20) nos aspirados de medula óssea, 25% (n=11) nos aspirados de linfonodo cervical e 52,7% (n=23) nos aspirados do linfonodo poplíteo. No HP formas amastigotas foram observadas em 45,5% (n=20) de amostras de pele íntegra da escápula, 65,9% (n=29) do focinho e 52,3% (n=23) da orelha. Na ICQ formas amastigotas foram observadas em 47,8% (n=21) das amostras provenientes de pele íntegra da escápula, 68,2% (n=30) pele íntegra do focinho; 56,8% (n=25) pele íntegra da orelha; 63,6% (n=28) nos aspirados de medula óssea, 36,7% (n=16) nos aspirados de linfonodo cervical e 68,2% (n=30) nos aspirados do linfonodo poplíteo. Na IHQ formas amastigotas foram observadas em 52,3% (n=23) das amostras provenientes de pele íntegra da escápula, 88,6% (n=39) do focinho e 72,7% (n=31) da orelha. A IHQ dos fragmentos de pele íntegra do focinho apresentou maior sensibilidade quando comparado com CP e de raspados de pele íntegra da orelha, focinho, escápula e de lesões cutâneas e de aspirados de linfonodos e medula óssea e ao HP dos fragmentos de pele íntegra da escápula, do focinho e da orelha. A boa sensibilidade da IHQ em amostras biológicas obtidas de fragmentos de pele íntegra do focinho sugere a utilização desta técnica no diagnóstico parasitológico da leishmaniose canina, apesar do custo mais elevado, quando comparada ao CP e ao HP.

Palavras-chave: Cão, Leishmaniose, citopatologia, histopatologia, imunocitoquímica e imuno-histoquímica.

Santos, I. B. **Comparison of cytopathology, histopathology, immunocytochemistry and immuno-histoquímica in tissues samples from different sites to the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2011. 88f. Thesis [Doctorate in Clinical research in infectious diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, that affects humans and animals. In many countries Leishmaniasis are important public health problem and are included among the six world's most significant endemic diseases. According to literature canine visceral leishmaniasis (CVL) is usually characterized by progressive emaciation, anemia, intermittent fever, generalized lymphadenopathy, eye signs (conjunctivitis, keratitis, uveitis) and skin lesions (exfoliative dermatitis, alopecia and ulcers). To grant CVL diagnosis, the identification of the etiologic agent in biological samples obtained from lesions is primal. Sampling can be obtained from aspirates of liver, spleen, bone marrow, intact skin or lymph nodes. The aim of this study was to compare the cytopathological, histopathological, immunohistochemical and immunocytochemical diagnosis of leishmaniasis in dogs, using as reference the standard parasitological culture. Forty-four dogs with parasitological culture isolation and characterization of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated and from samples of intact skin of the ear and / or spleen and / or skin lesion, were included in the study. Subsequently the animals were euthanized and collection of biological samples for citopahatology test (CP), histopathology (HP), immunocytochemistry (ICC) and immunohistochemistry (IHC). Most dogs were male (61.3%, n = 27). Thirteen dogs (29.5%) were from Rio de Janeiro and 70.5% (n = 31) from Bauru, Brazil. There were 47.7%, (n = 21) intact dogs, 38.6% (n = 17) dogs in poor general health condition and 11.3% (n = 5) in regular general health state. Skin lesions were observed in 11 (25%) animals. In the CP was possible to identify the amastigotes in 29.5% (n = 13) from scapula scrapings, 29.5% (n = 13) of ear scrapings, 29.5% (n = 13) from snouts scrapings, 45.5% (n = 20) in bone marrow aspirates, 25% (n = 11) in cervical lymph node aspirates and 52.7% (n = 23) in the popliteal lymph node aspirates. In HP amastigotes were detected in 45.5% (n = 20) samples of shoulders, 65.9% (n = 29) snout and 52.3% (n = 23) the ear healthy skin. In ICQ amastigotes were observed in 47.8% (n = 21) samples from shoulder intact skin, 68.2% (n = 30) intact snout skin, 56.8% (n = 25) intact ear skin, 63.6% (n = 28) in bone marrow aspirates, 36.7% (n = 16) in cervical lymph node aspirates and 68.2% (n = 30) in the popliteal lymph node aspirates. In IHC amastigotes were placed in 52.3% (n = 23) samples from shoulder healthy skin, 88.6% (n = 39) of snout and 72.7% (n = 31) of the ear. IHC from fragments of intact snout skin showed higher sensitivity when compared with CP and shaved intact skin of the ear, nose, scapula and skin lesions and lymph node aspirates and bone marrow and also compared with the HP fragments of intact shoulder skin, muzzle and ear. The good sensitivity of IHC in biological samples obtained from fragments of intact snout skin suggests the use of this technique in parasitological diagnosis for canine leishmaniasis, despite the higher cost compared to the CP and HP.

Key words: Dog, Leishmaniasis, cytopathology, histopathology, immunohistochemistry and immunocytochemistry.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Cão. LVC. Exame clínico - palpação de linfonodo cervical. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.	36
Figura 2: Cão. LVC. Coleta de fragmento de pele íntegra da escápula. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.	36
Figura 3: Cão. LVC. Raspado de pele íntegra da orelha. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.	37
Figura 4: Cão. LVC. Colocação do raspado de pele íntegra da orelha em lâmina de vidro. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.	37
Figura 5: Cão. LVC. Aspirado de medula óssea. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.	38
Figura 6: Cão. LVC. Úlcera cutânea com bordos definidos e fundo granuloso localizada no membro anterior esquerdo. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.	40
Figura 7: Cão. LVC. Úlcera cutânea com bordos definidos e fundo granuloso localizada no focinho. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.	41
Figura 8: Cão. LVC. Múltiplas úlceras cutâneas com bordos definidos e fundo granuloso localizada no membro posterior esquerdo. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.	41
Figura 9: Cão. LVC. Descamação cutânea furfurácea e alopecia generalizada. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.	42
Figura 10: Cão. LVC. Onicogrifose. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.	42
Figura 11: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de pele íntegra	44

da orelha. Giemsa; Objetiva:100x.

Figura 12: Cão. LVC. Formas amastigotas em raspado de pele íntegra do focinho. Giemsa; Obj.:100x. 44

Figura 13: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de úlcera cutânea do focinho. Giemsa; Obj.:100x. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos - – IPEC – Fiocruz. 45

Figura 14: Cão. LVC. Formas amastigotas em aspirado de linfonodo poplíteo. Giemsa; Obj.:100x. 45

Figura 15: Cão. LVC. Formas amastigotas em aspirado de medula óssea. Giemsa; Obj.:100x. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos - – IPEC – Fiocruz. 46

Figura 16: Cão. LVC. Formas amastigotas no interior e exterior dos macrófagos em fragmento de pele normal da escápula. HE; Obj.:100x. 48

Figura 17: Cão. LVC. Formas amastigotas no interior e exterior dos macrófagos em fragmento de pele normal da orelha. HE; Obj.:100x. 48

Figura 18: Cão. LVC. Formas amastigotas no interior e exterior dos macrófagos em fragmento de pele íntegra do focinho. HE; Obj.:100x. 49

Figura 19: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de pele normal da orelha; Obj.: 100x. ICQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* 1:400. 52

Figura 20: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de pele normal do focinho. Obj.:100x. ICQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* 1:400. 52

Figura 21: Cão. LVC. Formas amastigotas em aspirado de linfonodo poplíteo; Obj.:100x. ICQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* 1:400. 53

Figura 22: Cão. LVC. Formas amastigotas em fragmento de pele normal da orelha; Obj.:40x. IHQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* – 1:400. 56

Figura 23: Cão. LVC. Formas amastigotas em fragmento de pele normal da escápula; Obj.:100x. IHQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* – 1:400. 56

Figura 24: Cão. LVC. Formas amastigotas em fragmento de pele normal do focinho; Obj.:100x. IHQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* – 1:400. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: isolamento e caracterização de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> em 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.	35
Tabela 2: Positividade dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica de amostras de pele íntegra do focinho, da orelha, da escápula e dos aspirados de medula óssea e de linfonodos poplíteo e cervical dos 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo, 2007-2009.	58
Tabela 3: Resultado dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes amostras biológicas, de 44 cães com LVC oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.	59
Tabela 4: Positividade dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica de lesões cutâneas dos 11 cães que apresentavam úlceras cutâneas, oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.	60
Tabela 5: Resultado dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes amostras biológicas de lesões cutâneas dos 11 cães com LV, oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.	61
Tabela 6: Sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e o teste Kappa dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e de imuno-histoquímica de amostras de pele íntegra do focinho, da orelha, da escápula e dos aspirados de medula óssea e de linfonodos poplíteo e cervical dos 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.	62
Tabela 7: Sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e o teste Kappa dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e de imuno-histoquímica em amostras de lesões cutâneas dos 11 cães com LV, oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009..	63
Tabela 8 Comparação entre a sensibilidade dos exames citopatológico, histopatológico, imunocitoquímico e imuno-histoquímico em diferentes	64

amostras biológicas dos 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Albumina Sérica Bovina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DAB - Diaminobenzidina

CP - Exame citopatológico

HP – Exame histopatológico

ELISA - Ensaio imunoenzimático

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HE - Hematoxilina-eosina

ICQ - Imunocitoquímica

IHQ - Imuno-histoquímica

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

LT – Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

SFB - soro fetal bovino

TBS - Tris-Buffered-Saline

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES	1
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	3
1.3 EXAME CITOPATOLÓGICO	13
1.4 EXAME HISTOPATOLÓGICO	14
1.5 IMUNOCITOQUÍMICA	16
1.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	21
3.2. CRITÉRIOS DE DIVISÃO DOS GRUPOS	22
3.2.1 Grupo 1	22
3.2.2 Grupo 2 (grupo controle)	22
3.3. ROTINA DE EXAMES NOS ANIMAIS	23
3.3.1. Exame clínico	23
3.3.2. Eutanásia	24
3.3.3. Coleta de material de pele <i>post mortem</i>	24
3.3.3.1. Fragmentos de lesões cutâneas e de pele íntegra	24
3.3.3.2. Raspado de lesão cutânea e pele íntegra	25
3.3.3.3 Fragmentos de baço	25
3.3.3.4 Aspirados de linfonodos e de medula óssea	25
3.4. ROTINA DE EXAMES LABORATORIAIS	26
3.4.1. Isolamento de <i>Leishmania</i> sp. em cultura	26
3.4.2. Tipagem bioquímica dos isolados de <i>Leishmania</i> sp. pela técnica de isoenzimas	27
3.4.3. Exame histopatológico	28
3.4.4. Exame citopatológico	28
3.4.5. Imuno-histoquímica e imunocitoquímica - estreptavidina-biotina-peroxidase com soro policlonal anti-<i>Leishmania</i>	29

3.4.5.1. Obtenção do soro policlonal de coelho anti- <i>Leishmania</i>	29
3.4.5.2. Reação de imunocitoquímica - estreptavidina-biotina- peroxidase	31
3.4.5.3. Reação de imuno-histoquímica - estreptavidina-biotina- peroxidase	32
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS	39
4.1 DADOS CLÍNICOS	39
4.2 EXAME CITOPATOLÓGICO	43
4.3 EXAME HISTOPATOLÓGICO	47
4.4 REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA - ESTREPTAVIDINA-BIOTINA- PEROXIDASE COM SORO POLICLONAL ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	50
4.5 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA - ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE COM SORO POLICLONAL ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	54
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

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

S237

Santos, Isabele Barbieri dos.

Comparação entre a citopatologia, histopatologia, imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes amostras biológicas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. / Isabele Barbieri dos Santos. – Rio de Janeiro, 2011.

xi, 88 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2011.

Bibliografia: f. 77-88

1. Cão. 2. Leishmaniose. 3. Citopatologia. 4. Histopatologia. 5. Imunocitoquímica. 6. Imuno-histoquímica. I. Título.

CDD 636.7

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária que acomete seres humanos e animais, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses são importante problema de saúde pública em vários países e estão incluídas entre as seis endemias de maior relevância mundial (WHO 2011). São classificadas em tegumentar (LT) cutânea e mucocutânea - e visceral (LV). A transmissão ocorre através de picada de insetos flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). No trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, *Leishmania* sp. é encontrada na forma promastigota (flagelada e extracelular) e no citoplasma dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados, é encontrada na forma amastigota (sem flagelo visível) (Lainson & Shaw, 1987).

A epidemiologia das leishmanioses é complexa e grande parte dos fatores ambientais que interferem na cadeia epidemiológica ainda não estão bem esclarecidos. Evidências sugerem que alguns parasitos, assim como seus vetores possam adaptar-se às mudanças ambientais, transformando padrões clássicos de transmissão (Lainson & Shaw, 1987; Marzochi & Marzochi, 1994). Considerada inicialmente uma zoonose silvestre, hoje os padrões epidemiológicos revelam normalmente uma endemia, principalmente em áreas onde a floresta primária foi substituída pela mata remanescente ou residual (Marzochi et al., 1992), promovendo

a instalação de focos em centros totalmente urbanizados com o envolvimento de animais domésticos no ciclo biológico (Marzochi & Marzochi, 1994).

O impacto das leishmanioses na saúde pública esteve extremante subestimado durante muitos anos e considera-se que 2 milhões de casos novos (1,5 milhões para LT e 500.000 para LV) ocorram anualmente, com uma estimativa de 12 milhões de pessoas infectadas atualmente em todo o mundo (WHO, 2011).

Em diferentes focos de leishmaniose no Mundo, observa-se uma grande variedade de animais mamíferos incriminados como reservatório de diferentes espécies de *Leishmania*, pertencentes a distintos grupos taxonômicos, tanto silvestres quanto domésticos. Entre eles, destacamos o cão doméstico (*Canis familiaris*), principalmente pela proximidade com o homem. Este animal tem sido encontrado naturalmente infectado pelas seguintes espécies de *Leishmania*: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) peruviana* (Dantas-torres, 2009). Pode ocorrer também infecção mista, ou seja, cães infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* (Madeira et al., 2006a). No entanto, o cão doméstico tem importância epidemiológica como reservatórios domésticos no ciclo de transmissão somente de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, devido a presença de cães infectados em áreas endêmicas de leishmaniose visceral e ao intenso parasitismo da pele sã dos cães (Deane & Deane 1955; Marzochi et al., 1985; Madeira et al., 2004; Madeira et al., 2006b; Xavier et al., 2006; Verçosa et al., 2008; Madeira et al., 2009; Calabrese et al., 2009).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV, também conhecida como calazar, é uma zoonose que ocorre nas regiões subtropicais e tropicais, causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania Leishmania infantum*, no Novo e no Velho Mundo, respectivamente. Alguns autores acreditam que *L. (L.) chagasi* e *L. infantum* sejam a mesma espécie (Mauricio, et al. 1999; Marcondes, et al., 2010). É endêmica em 62 países e cerca de 200 milhões de pessoas estão sob risco de adquirir a doença (WHO, 2011). A maioria dos casos de LV ($\geq 90\%$) está concentrada em países como Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (Desjeux, 1996; Chappuis et al., 2007). Entretanto vem ocorrendo como doença emergente em humanos na Europa (Ready, 2010) e em cães e gatos nos Estados Unidos (Petersen, 2009).

Os agentes etiológicos da LV são *Leishmania (L.) infantum* (região do Mediterrâneo, Ásia, China e norte da África), *Leishmania (L.) donovani* (Sudão, Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal), e *Leishmania (L.) chagasi* (América Latina, exceto Chile e Uruguai) (Chappuis et al., 2007). Alguns autores consideram a *L. (L.) infantum* semelhante à *L. (L.) chagasi*, questionando sua classificação separadamente. Entretanto, diferenças entre estas espécies quanto a estrutura molecular e sua antigenicidade foram evidenciadas, o que reforça a discriminação entre 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). Epidemiologicamente, 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* e de *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, sudeste e sul (Pocai et al. 1998; Monteiro, 2002; Souza et al., 2009). 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; Marzochi et al., 2009).

A LV no país apresentava eminentemente caráter rural, mas atualmente vem se expandindo para as áreas urbanas devido à degradação ambiental e falta de sanitização, associada à recente migração das populações rurais para os subúrbios das grandes cidades e a adaptação do inseto vetor às modificações ambientais (Marzochi & Marzochi, 1997; Costa-Val et al., 2007).

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), vem ocorrendo a peri-urbanização e urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos em Teresina (PI), Natal (RN), São Luíz (MA), Fortaleza (CE), Araçatuba (SP), Bauru (SP); Corumbá (MT), Campo Grande (MS), Palmas (TO); Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG); Monte Carlos (MG); Três Lagoas (MS); Rio Grande do Sul (Santa Maria e São Borja) [(Pocai et al. 1998; Silva et al., 2001; Barata et al., 2004; Michalsky et al., 2007; Souza et al., 2009)].

A espécie *L. (L.) chagasi* é o agente etiológico responsável pela LV no Brasil, sendo o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* incriminado como principal vetor na sua transmissão. Entretanto, recentemente *L. cruzi* foi descrita no Estado do Mato Grosso do Sul exercendo esse papel (Genaro et al., 1990; Santa Rosa & Oliveira, 1997; Palatnik-De-Sousa et al., 2001; Ministério da Saúde, 2006). Os reservatórios no ambiente silvestre são os roedores, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Na área urbana o cão doméstico (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção para o flebótomo (Ministério da Saúde, 2006).

O primeiro caso de LV canina no Brasil foi descrito em 1938 (Chagas et al., 1938), entretanto Deane & Deane, em 1955, constataram a presença de formas amastigotas na pele de cães infectados, fato que facilitava a infestação pelos vetores, passando a incriminar o cão como um dos prováveis elos no ciclo de transmissão no ambiente doméstico. Desde então, a notificação de cães infectados em áreas endêmicas, associado ao aparecimento dos casos humanos, tem sugerido que o cão infectado possa manter e amplificar ciclos instalados no peridomicílio (Alencar & Cunha, 1963; Alencar, 1978; Marzochi et al., 1985; Paranhos-Silva et al., 1998). No Brasil, por essa razão, levando os órgãos sanitários competentes passaram a adotar medidas para interromper este ciclo de transmissão, por meio da detecção e eliminação dos cães infectados (Ministério da Saúde, 2006).

A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção destes tem sido mais prevalente do que nos humanos (Deane & Deane, 1955; Marzochi & Marzochi, 1994; Paranhos-Silva et al., 1996; Galimberti et al., 1999; Palatnik-De-Sousa et al., 2001). A LV humana e canina coexistem de forma endêmica em bairros localizados no município de Bauru – São Paulo e no Município

do Rio de Janeiro, no entorno do maciço da Pedra Branca (Realengo, Bangú, Senador Camará e Campo Grande) e na região litorânea (Barra de Guaratiba) (Marzochi et al., 1985; Cabrera et al., 2003). A LVC é considerada mais importante que a LV humana do ponto de vista epidemiológico, pois, além de ter maior prevalência, apresenta grande contingente de animais assintomáticos (Marzochi et al., 1985).

O quadro clínico da LVC é variável, apresentando-se desde aparente estado sadio a quadros severos de caquexia associada a outras complicações (Marzochi et al., 1985; Alvar et al., 2004). A doença também é bastante variável, podendo ser de uma forma aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas, evoluir de uma forma lenta, que pode durar anos, acompanhados ou não de sintomas que pode evoluir para uma forma grave (Alencar, 1959; Marzochi et al., 1985).

Classicamente, a LVC se caracteriza por caquexia progressiva, anemia, febre intermitente, linfadenomegalia generalizada, sinais oculares (conjuntivite, ceratoconjuntivite, uveíte) e lesões cutâneas (dermatite exfoliativa, úlceras e alopecia) e onicogribose. Outros sinais tais como: colite, ceratoconjuntivite e insuficiência renal podem estar presentes. Formas atípicas também têm sido descritas (Blavier, et al., 2001). Acredita-se que o amplo espectro da apresentação clínica dependa da fase da doença e da condição imunológica do cão, o que pode dificultar o diagnóstico clínico. Outras doenças com manifestações semelhantes também podem contribuir para dificultar o diagnóstico.

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.

Na LVC, a distribuição do parasito pode ser extensa, alcançando principalmente órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele, medula óssea. (Alvar et al., 2004). São também descritos acometimentos do sistema nervoso central, rins, pâncreas, testículo, olho, glândula lacrimal, glândula adrenal, placenta e trato gastrintestinal (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon) (Ferrer et al., 1988; Tafuri et al., 1996; Bourdoiseau et al., 1997; Silva et al., 2002; Solano-Galeno et al., 2004; Tafuri et al., 2004; Ordenix et al., 2005; Naranjo et al., 2005; Dubey et al., 2005; Okamoto, 2006).

A pele íntegra apresenta intenso parasitismo em cães com LV. Locais como focinho, pavilhão auricular, abdômen e escápula são citados como principais sítios de intenso parasitismo de pele sã (Deane & Deane 1955; Madeira et al., 2004; Madeira et al., 2005; Xavier et al., 2006; Verçosa et al., 2008; Madeira et al., 2009; Calabrese et al., 2010). Entretanto, ainda não há definição do sítio de eleição para o diagnóstico dentre estes sítios citados acima.

Os linfonodos cervicais e poplíteos apresentam grande parasitismo. De acordo com Madeira et al. (2006) amostras biológicas de linfonodos cervicais apresentam maior positividade, quando comparado com amostras biológicas de linfonodos poplíteos. Entretanto, Lima et al. (2004) não observou diferença de parasitismo entre amostras biológicas de linfonodos cervicais e poplíteos.

Pela gravidade da LV, as ações sanitárias direcionadas a essa doença são mais rigorosas que aquelas direcionadas a LTA. A estratégia de controle da LV se resume em três medidas principais: 1) detecção e tratamento dos casos humanos, 2) borrifação no domicílio e peridomicílio com inseticidas apropriados, associada ao

monitoramento da fauna flebotomínica e 3) identificação e eliminação de cães sorologicamente positivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com título sorológico igual ou superior a diluição de 1:40 (Ministério da Saúde, 2006).

A estratégia da eutanásia de cães sorologicamente positivos é um assunto polêmico. De acordo com Costa et al. (1999) existe um risco duas vezes maior de contrair a infecção em residências onde vivem cães. Braga et al. (1998), constatou significativa redução no surgimento de novos casos quando cães infectados foram rapidamente retirados da área. No entanto, outros estudos sugerem que a eliminação de cães soro positivos exerce pouca ou nenhuma influência no surgimento de novos casos humanos ou caninos (Evans et al., 1992; Paranhos-Silva et al., 1998; Ashford et al., 1998). Nesse contexto, apesar da participação o cão doméstico (*Canis familiaris*), como reservatório ser conhecida, busca-se justificar com segurança a prática da eutanásia canina como uma das medidas de controle.

O diagnóstico das leishmanioses caninas baseia-se nos sinais clínicos, epidemiologia, demonstração do parasito por diferentes técnicas e testes sorológicos. Para a confirmação do diagnóstico, é necessária a demonstração do agente etiológico nas amostras biológicas obtidas das lesões, aspirado de fígado, baço, medula óssea, pele íntegra ou de gânglios linfáticos [(Beurey et al., 1975; Genaro et al., 1988; Kostman & DiNubile, 1993; Heller & Swartz, 1994; Ashford, 2000; Madeira et al 2006)]. A observação das formas amastigotas de *Leishmania* sp. pode ser realizada de forma direta, através da citopatologia, histopatologia, isolamento em cultura e inoculação em hamsters, ou indiretamente, através de técnicas imuno-histoquímicas, hibridização com sondas de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR) (Eys et al., 1987; Muller et al., 2003; Da Silva et al., 2010). A confirmação parasitológica e etiológica de cães suspeitos é de fundamental

importância, não só para o conhecimento das espécies circulantes nesses animais, mas também na contribuição de elementos que possam ser úteis nas ações de controle.

As coletas de amostras biológicas por meio do aspirado de fígado, baço e medula óssea, são técnicas invasivas, o que dificulta a obtenção destas amostras de cães, principalmente, em visitas domiciliares. Entretanto, amostras biológicas de linfonodos e de pele íntegra são coletadas por técnicas menos invasivas, o que facilita a coleta de amostras biológicas em cães, principalmente em visitas domiciliares.

Os testes sorológicos pelas técnicas de RIFI e ensaio imunoenzimático (ELISA) são os mais utilizados em estudos epidemiológicos e inquéritos para medidas de controle da LVC, devido à facilidade da coleta de amostras, baixos custos, rapidez do diagnóstico e a devido à resposta imune humoral que ocorre nos cães com LV que facilita o diagnóstico sorológico (Nunes et al., 2001; Almeida et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Dantas et al., 2006; Ministério da Saúde, 2006; Ferreira et al., 2007; Almeida et al., 2009). Alguns autores questionam o valor destes testes sorológicos no diagnóstico das leishmanioses caninas pela existência de reação cruzada com outras enfermidades, como doença de Chagas e esporotricose (Reed et al., 1990; Reithinger & Davies, 1999; Santos et al., 2007), pela impossibilidade de identificação do parasito (De Paula, et al. 2003) e pela ocorrência de cães soronegativos que apresentavam cultura parasitológica positiva (Madeira et al., 2006).

Com base na expressiva resposta imune humoral apresentada por cães com LV, inquéritos soroepidemiológicos são realizados visando o rastreamento de cães supostamente infectados. Ainda que o diagnóstico de rotina da LVC se baseie em

dados sorológicos, para a confirmação da infecção é necessária a demonstração direta ou indireta do parasita por métodos parasitológicos, uma vez que a sorologia não possui poder discriminatório entre a forma tegumentar e visceral, e a garantia da circulação de uma dada espécie somente será possível após a identificação do agente etiológico. Entretanto, nos Municípios do Rio de Janeiro – RJ e de Bauru - SP, apesar da eutanásia canina de cães sororeatores ser realizada desde 1979, testes confirmatórios da infecção não são realizados sendo poucos os estudos que mencionam os agentes circulantes nesses animais (Lopes et al., 1984; Marzochi et al., 1985).

A cultura parasitológica detecta a presença de formas promastigotas de *Leishmania* sp. e tem a vantagem de possibilitar a identificação da espécie do parasito, realizada por meio de análise por eletroforese de isoenzimas (Cupolillo et al., 1994). A especificidade da cultura parasitológica é de aproximadamente 100%, entretanto, sua sensibilidade é em torno de 60% (Feitosa et al. 2000; Rey, 2001; Schubach et al., 2001; Madeira et al., 2006), podendo ser mais baixa dependendo da carga parasitária, tipo de material biológico coletado e processamento laboratorial da amostra.

O diagnóstico histopatológico depende da visualização do parasito. Podem ser encontradas no interior de células fagocitárias ou livres formas amastigotas que são ovaladas ou arredondadas, contendo um núcleo e um cinetoplasto. Além da observação das formas amastigotas, é importante observar também as alterações histopatológicas das amostras examinadas (Genaro, 1995).

No exame citopatológico (CP) o diagnóstico depende da visualização do parasito. As formas amastigotas são ocasionalmente visualizadas no interior de células fagocitárias ou livres, de aspecto morfológico semelhante ao encontrado na

histopatologia. (Pirmez et al., 1988a; Ministério da Saúde 2006; Barrouin-Melo et al., 2006).

Na LVC, os exames citopatológicos podem ser realizados em material aspirado de fígado, baço, medula óssea ou de gânglios linfáticos (Genaro et al., 1988, Ashford, 2000; Saridomichelakis et al., 2005; Moreira et al., 2007). Tais métodos são eficientes, porém invasivos, o que os torna de pouca aplicabilidade no diagnóstico de campo. O intenso parasitismo de pele sã (Deane & Deane 1955; Xavier et al., 2006; Verçosa et al., 2008; Madeira et al., 2009; Calabrese et al., 2010), pode facilitar a demonstração do parasito de forma menos invasiva por meio de raspados de pele íntegra.

A comparação entre a histopatologia e a citopatologia é controversa no diagnóstico das leishmanioses humanas, com alguns autores favorecendo o exame histopatológico (Schubach et al., 2001; Faber et al., 2003) e outros afirmando que este é menos sensível (Salman et al., 1999). Entretanto, não existem estudos que comparem a sensibilidade destes dois métodos no diagnóstico das leishamnioses caninas.

Embora, mesmo quando associados, o exame histopatológico, citopatológico e a cultura parasitológica, podem não detectar o microorganismo em um percentual significativo de casos, sendo insuficientes para diagnóstico da doença (Padilla et al., 2002). Esse problema pode ser solucionado com a detecção de antígenos parasitários “in situ”, por meio de técnicas mais sensíveis como a imuno-histoquímica (IHQ) e imunocitoquímica (ICQ).

As técnicas de IHQ e ICQ no diagnóstico das leishmanioses, baseiam-se na detecção de antígenos “in situ” por meio da utilização de um anticorpo (policlonal ou monoclonal), primário, relativamente específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo,

possibilitando sua visualização (Taylor, 1978; Ramos-Vara, 2005). O diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com amastigotas. As primeiras reações de IHQ e ICQ foram realizadas a cerca de meio século, detectando antígenos teciduais por meio da marcação de anticorpos com produtos fluorescentes. Estas técnicas apresentam grande sensibilidade e especificidade e por isso ocupam um papel em destaque na investigação e diagnóstico anatomopatológico (Filho et al., 1993).

A PCR, também pode ser aplicada com fins diagnósticos em cães com LV (Lopez et al., 1993; Ashford et al., 1995; Reale et al., 1999; Muller et al., 2003; Gomes et al., 2008; Da Silva et al., 2010), principalmente nos casos assintomáticos (Berrahal et al., 1996) ou mesmo, para avaliar protocolos terapêuticos. Mesmo considerada mais sensível, quando comparada aos métodos clássicos (Lopez et al., 1993; Ashford et al., 1995), a PCR não costuma ser utilizada na rotina diagnóstica, sendo indicada em situações especiais como uma ferramenta útil na confirmação de casos duvidosos.

A PCR é uma técnica altamente sensível e específica e baseia-se na amplificação de regiões específicas do DNA nuclear ou do cinetoplasto extraído de amostras biológicas como sangue e biopsia de lesões cutâneas ativas e cicatrizadas, frescas ou fixadas em formol podendo detectar parasitos de diferentes gêneros e espécies (Noli, 1999; Slappendel, 2000; Marfurt et al., 2003; Muller et al., 2003; Floeter-Winter & Shaw, 2004).

A PCR, utiliza uma polimerase de ácido nucléico, termoestável, com um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* que hibridizam com uma seqüência conhecida. Ciclos de hibridação-alongamento-desnaturação que amplificam determinado fragmento de ácido nucléico em progressão geométrica são

gerados quando a solução é submetida a variações de temperatura. Após a amplificação, o ácido nucléico é detectado por uma eletroforese em gel de agarose, corado por brometo de etídeo e observado sob luz ultravioleta (Saiki et al., 1988).

Os métodos morfológicos utilizados no diagnóstico da LVC serão, a seguir, abordados, em destaque.

1.3 EXAME CITOPATOLÓGICO (CP)

O CP pode ser realizado em esfregaços de material aspirado de fígado, baço, medula óssea, gânglios linfáticos, lesões cutâneas e de pele íntegra (Genaro et al., 1988, Ashford, 2000). Os esfregaços são fixados em álcool, geralmente metílico e, posteriormente corado pelo Giemsa. As colorações pela Hematoxilina-Eosina (HE), Leishman e Panótico rápido, também podem ser utilizadas (Neves, 2003).

Podem ser visualizadas formas amastigotas que são ovaladas ou arredondadas, medindo entre 1,5 X 3,0 e 3,0 X 6,5 μm , contendo um núcleo e um cinetoplasto, no interior de células fagocitárias ou livres. O cinetoplasto é uma organela característica de protozoários da ordem Kinetoplastida e geralmente aparece em forma de um bastão livre no citoplasma ou na forma de um ponto. A afinidade cromática do núcleo e do cinetoplasto é idêntica a do núcleo das demais células presentes no esfregaço e, a do citoplasma do parasito também é semelhante à do citoplasma da célula do hospedeiro. Na coloração pelo Giemsa o núcleo e o cinetoplasto coram-se

em violeta e o citoplasma de cinza azulado claro. Na HE, o núcleo e o cinetoplasto se coram de azul escuro e o citoplasma é fracamente eosinofílico (Genaro, 1995).

Por ser um método morfológico de diagnóstico o observador deve ser capaz de distinguir formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e trofozoítas de *Toxoplasma gondii* das formas amastigotas de *Leishmania* sp. (Rey, 2001).

Este método tem como vantagens ser simples, barato e rápido e como desvantagens a necessidade de examinador treinado, baixa sensibilidade, tempo consumido para leitura e impossibilidade de identificação da espécie do parasito (Pirmez et al., 1988a).

1.4 EXAME HISTOPATOLÓGICO (HP)

Para realização do HP a amostra pode ser obtida por meio de biopsia do bordo da lesão cutânea ativa, fígado, baço, gânglios linfáticos, e de pele íntegra. A seguir, o material é fixado em solução de aldeído fórmico (formol) neutro a 10%, processado, incluído em parafina, cortado em micrótomo e corado com HE (Montenegro & Franco, 2004).

O diagnóstico definitivo depende da visualização do parasito. As formas amastigotas são visualizadas no interior de células fagocitárias ou livres, de aspecto morfológico semelhante ao descrito no tópico anterior, e também devem ser distinguidas das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, dos trofozoítas de *Toxoplasma gondii*, estruturas leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii* (Rey, 2001; Padilla et al., 2002; Schubach et al., 2006, Santos 2007). Para

correta visualização de características do parasito é imprescindível o exame em grande aumento (objetiva de 100X) em imersão.

O HP apresenta grande valor na análise diagnóstica diferencial, pois permite realizar diagnóstico de outras doenças que apresentam úlceras cutâneas, principalmente neoplásicas, e também infecciosas.

O HP pode ser influenciado por fatores relacionados à amostra, técnica de processamento e ao observador. Por esse fato, para otimizar o desempenho da histopatologia para o diagnóstico parasitológico das leishmanioses, deve-se contar com: um patologista experiente nesse diagnóstico e disposto a dedicar um tempo, à procura da estrutura parasitária que é muito pequena e possui detalhes sutis; uma amostra que contenha a transição da úlcera com a pele íntegra; e um material bem processado em cortes finos (não mais que 5 μ m).

1.5 IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)

A ICQ - estreptavidina-biotina-peroxidase foi utilizada recentemente para detecção da população celular do sangue periférico e do baço em cães com LV e para a detecção de formas amastigotas em linfonodos poplíteos (Barrouin-Melo., et al 2006; Moreira et al., 2007). O PC do aspirado de medula óssea e gânglios linfáticos é utilizado como rotina para diagnóstico das leishmanioses caninas, entretanto, podem não detectar formas amastigotas em cães positivos para LVC

(Ministério da Saúde, 2006). É possível que nestes casos, a técnica de ICQ para a demonstração de antígenos de *Leishmania* sp. em cães, represente uma alternativa no diagnóstico da leishmaniose. Além disso, a ICQ pode ser utilizada em material obtido do raspado de pele sã, que é coletado de forma menos invasiva para o animal e facilita o trabalho do veterinário em visitas domiciliares.

1.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Para realização da IHQ o fragmento de tecido pode ser fixado em solução de formol, processado, incluído em parafina, cortado em micrótomo e colocado em lâmina silanizada ou conservado em bloco de congelamento, cortado no criostato e colocado em lâmina silanizada (Montenegro & Franco, 2004).

O diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com amastigotas.

A IHQ - estreptavidina-biotina-peroxidase com anticorpo policlonal, vem sendo utilizada para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em cortes histológicos conservados em blocos de parafina de pele íntegra, linfonodo, fígado, baço, rim, glândula adrenal, trato gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon), olho, glândula lacrimal, testículo, placenta em cães com LV. Apresenta desempenho diagnóstico superior ao exame histopatológico corado pela Hematoxilina-Eosina, abreviando o tempo do exame dos preparados, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados (Ferrer et al., 1988; Tafuri et al., 1996;

Bourdoiseau et al., 1997; Silva et al., 2002; Solano-Galeno et al., 2004; Tafuri et al., 2004; Ordenix et al., 2005; Naranjo et al., 2005; Dubey et al., 2005; Giunchetti et al., 2008; Santana et al., 2008; Costa et al., 2008; Tasca et al., 2009).

Na LV canina, para detecção de formas amastigotas nos órgãos por meio da técnica de IHQ, a maioria dos estudos relatam a utilização de soros de cão naturalmente infectado com *L. (L.) chagasi* ou *L. (L.) infantum* (Tafuri et al., 1996; Bourdoiseau et al., 1997; Tafuri et al., 2004); e de soros de cabra e coelho imunizados com promastigotas obtidas de cultura (Ferrer et al., 1988; Ordeix et al., 2005), como anticorpo primário.

De acordo com Hayat (2002), a IHQ com anticorpo monoclonal é mais sensível do que com anticorpo policlonal no diagnóstico de doenças infecciosas, otimizando o resultado. No entanto, um estudo que compare a sensibilidade destes dois tipos de anticorpos não foi realizado no diagnóstico das leishmanioses caninas.

As técnicas de IHQ e ICQ apresentam grande sensibilidade e especificidade (Filho et al., 1993; Ramos-Vara, 2005). Logo, é possível que a demonstração de antígenos de *Leishmania* sp. em cães, por meio das técnicas de IHQ e ICQ, em amostras de fácil obtenção como a pele íntegra e aspirados de linfonodos, seja importante para a confirmação parasitológica em cães selecionados para eutanásia pelos programas de controle de leishmaniose;

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar a sensibilidade das técnicas de citopatologia, histopatologia, imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes amostras biológicas no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utilizando a cultura parasitológica como padrão de referência.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as alterações clínicas observadas nos cães com LVC.
- Verificar a sensibilidade do exame citopatológico e da reação de imunocitoquímica no diagnóstico da LVC em raspados de lesões cutâneas, pele íntegra (escapular, do focinho e do pavilhão auricular) e em aspirados de linfonodos cervical e poplíteo e medula óssea;
- Verificar a sensibilidade do exame histopatológico e da reação de imuno-histoquímica no diagnóstico de LVC em cortes histológicos de lesões cutâneas e de pele íntegra de 3 sítios: escapula, focinho e pavilhão auricular;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de investigação diagnóstica da LVC empregando diferentes técnicas laboratoriais.

Foram incluídos cães sororearotes com indicação de eutanásia, provenientes de inquéritos sorológicos realizados no Município do Rio de Janeiro – RJ e no Município de Baurú – SP, durante o período de 2007 a 2009.

As amostras biológicas coletadas dos 81 cães foi dividida em dois grupos (1 e 2), cujos critérios de divisão são descritos a seguir.

O protocolo de procedimentos realizados nos animais foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ) sob número de protocolo P0195-05.

3.2. CRITÉRIOS DE DIVISÃO DOS GRUPOS

3.2.1 Grupo 1

Foram incluídas neste grupo as amostras de 44 cães que cumpriram todo o protocolo de investigação e apresentaram isolamento em cultura parasitológica e caracterização de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, isolada e caracterizada a partir de amostras de pele íntegra da orelha e/ou baço e/ ou lesão cutânea (Tabela 1).

3.2.2 Grupo 2 (grupo controle)

Foram incluídas neste grupo as amostras de 37 cães que cumpriram todo o protocolo de investigação e apresentaram resultados negativos para isolamento de *Leishmania* sp em amostras de pele íntegra da orelha e/ou baço e/ ou lesão cutânea. Os animais deste grupo foram utilizados como controle negativo para o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo das técnicas diagnósticas utilizadas neste estudo.

3.3. ROTINA DE EXAMES NOS ANIMAIS

3.3.1. Exame Clínico

Todos os animais foram submetidos ao exame clínico (Figura 1) e dermatológico no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos - IPEC – Fiocruz ou no Centro de Controle de Zoonoses de Bauru.

De acordo com as alterações clínicas os animais foram classificados em: Sintomáticos – animais que apresentavam sinais clássicos de LV, como, alopecia, alterações cutâneas, onicogribose, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, caquexia e anemia. Oligossintomáticos – animais exibindo alguns sintomas clínicos da LV como linfadenomegalia, pequena perda de peso associados ou não com lesões cutâneas. Assintomáticos – animais aparentemente saudáveis. Esta classificação esta de acordo com Mancianti et al., (1988) e Lima et al., (2004).

No exame dermatológico foi observada a presença e localização de úlceras cutâneas, presença de dermatite exfoliativa e alopecia.

3.3.2. Eutanásia

A eutanásia dos cães soropositivos foi realizada com overdose de tiopental sódico por via intravenosa no local onde os animais foram submetidos a exame clínico e dermatológico.

3.3.3. Coleta de material de pele *post mortem*

3.3.3.1. Fragmentos de lesões cutâneas e de pele íntegra

Foram coletados fragmentos das bordas das lesões cutâneas ativas de pele íntegra escapular, do focinho e do pavilhão auricular (Figura 2), com de *punch* 3-5 mm. Foram retirados 2 fragmentos do pavilhão auricular e de lesões cutâneas ativas, o primeiro foi conservado em salina estéril contendo 1000U de penicilina G potássica e 50µg de 5-fluorocitosina para cada mL e enviado para cultura de *Leishmania* sp.. O outro fragmento foi conservado em formol tamponado a 10% e enviado para HP e para realização das técnicas de IHQ. Os fragmentos de pele íntegra escapular e do focinho foram conservados em formol tamponado a 10% e enviados para HP e para realização das reações de IHQ.

3.3.3.2. Raspado de lesão cutânea e pele íntegra

Foram realizados raspados da borda da lesão cutânea ativa e de pele íntegra do pavilhão auricular (Figuras 3 e 4), do focinho e escapula com bisturi. O primeiro foi colocado em lâmina de vidro, fixado com metanol e corado pelo Giemsa, para CP; o segundo foi colocado em lâmina de vidro silanizada e fixado com etanol álcool 95% por vinte e quatro horas, para realização da reação de ICQ.

3.3.3.3 Fragmentos de baço

Após evisceração, foram coletados fragmentos de baço. Estes fragmentos foram conservado em salina estéril contendo 1000U de penicilina G potássica e 50 μ g de 5'fluorocitosina para cada mL e enviado para cultura de *Leishmania* sp..

3.3.3.4 Aspirados de linfonodos e de medula óssea

Foram coletados aspirados com agulha fina dos linfonodos cervical e poplíteo e de medula óssea (Figura 5), para a realização de esfregaços em lâmina de vidro, para CP, e em lâminas de vidro silanizadas, para realização da reação de ICQ.

3.4. ROTINA DE EXAMES LABORATORIAIS:

O Isolamento de *Leishmania* sp. em cultura e a tipagem bioquímica dos isolados de *Leishmania* sp foram realizados no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses - IPEC – Fiocruz.

Os exames histopatológicos, citopatológicos e as reações de imuno-histoquímica e imunocitoquímica foram realizados no Serviço de Anatomia Patológica - IPEC – Fiocruz.

3.4.1. Isolamento de *Leishmania* sp. em cultura

Os fragmentos de baço, pele íntegra do pavilhão auricular e de lesões cutâneas ativas foram mantidos em solução salina contendo 1000U de penicilina G potássica e 50µg de 5'fluorocitosina (anti-fúngico) para cada mL, durante 24h a temperatura de 4°C. Após esse período, foram semeados em meio bifásico (NNN acrescido de meio Schneider's e 10% de SFB) e submetidos à temperatura de 26-28°C, em estufa biológica. A leitura foi realizada semanalmente através de exames à fresco, para verificar a presença de formas promastigotas, até completar 30 dias. Quando positivos, os isolados foram depositadas no Banco de Amostras, no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses - IPEC - Fiocruz, criopreservadas e preparadas para outras metodologias.

3.4.2. Tipagem bioquímica dos isolados de *Leishmania* sp. pela técnica de isoenzimas

Todas as amostras isoladas em cultura foram caracterizadas pela eletroforese de isoenzimas. Após obtenção de massa parasitária, foi preparado um gel de agarose (Tipo V), acrescida de tampão fosfato ou maleico, que depois de dissolvido e fundido foi colocado sobre um filme de poliestireno onde foram aplicadas as amostras teste. A corrida foi feita empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal devidamente acoplada a um banho circulador para manter a refrigeração em torno de 4°C. A revelação da atividade enzimática foi feita, colocando-se diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima já descritos na literatura (Cupolillo et al., 1994). A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% até que o excesso de corante fosse eliminado. A mobilidade eletroforética foi avaliada baseado em posições padrão de cepas de referência. Foram utilizados pelo menos, 5 sistemas (loci) enzimáticos: 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase, EC.1.1.1.43), GPI (fosfoglucose isomerase, EC.5.3.1.9), NH (nucleosídeo hidrolase, 2 loci, EC. 3.2.2.1), G6PDH (Glucose-6-fosfato desidrogenase, EC.1.1.1.49), MDH (malato desidrogenase, EC.1.1.1.37).

3.4.3. Exame histopatológico

Os fragmentos de lesões e pele íntegra da escápula, focinho e pavilhão auricular foram fixados em formol a 10% e processados, pelas técnicas habituais para inclusão em parafina e, posteriormente, corados pela hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas coradas pela HE foram examinadas em microscópio óptico, nas quais positividade foi considerada pela observação de ao menos uma forma amastigota característica (considerando-se fatores como forma, presença de cinetoplasto, tamanho e localização no interior de vacúolos de macrófagos ou livres), após observação de todos os campos da lâmina.

3.4.4. Exame citopatológico

Os raspados de lesão cutânea e de pele íntegra da escápula, focinho e pavilhão auricular e os aspirados de linfonodos cervical e poplíteo e de medula óssea, foram colocados em lâmina de vidro, fixados com metanol e posteriormente corados pelo Giemsa.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico, percorrendo-se todos os campos, a procura de formas amastigotas características (considerando-se fatores como forma, presença de cinetoplasto, tamanho e localização no interior de vacúolos de macrófagos ou livres), sendo necessária pelo menos uma forma para o exame ser positivo.

3.4.5. Imuno-histoquímica e imunocitoquímica - estreptavidina-biotina-peroxidase com soro policlonal anti-*Leishmania*

3.4.5.1. Obtenção do soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania*

Para a obtenção do soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* sp. foram realizadas duas etapas: a produção dos antígenos e imunização dos coelhos.

A produção dos antígenos foi realizada no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do IPEC – Fiocruz. Foi utilizada amostra de *L. (L.) chagasi* cepa (MHOM/BR/1974/PP75).

Esta amostra cultivada em meio bifásico (NNN acrescido de Schneider`s), em fase exponencial, foi transferidas para garrafas de cultivo celular contendo 10 mL de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) com inóculo aproximado de 10% do volume do meio.

O meio de cultura inoculado foi conservado em estufa sob temperatura de 26-28°C e no terceiro dia do inóculo, acrescentou-se mais 10 mL de meio Schneider suplementado com 10% de SFB. Após três dias esse volume (20 mL) foi dividido e transferido para outras garrafas contendo 50 mL de meio Schneider cada uma, perfazendo um total de 120 mL de cultura para a amostra.

Na fase exponencial de crescimento (4^o - 5^o dia), a cultura foi submetida a centrifugação durante 15 minutos a 7000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, re-suspenso em tampão fosfato (pH 7.2). O sedimento foi lavado, re-suspenso em 1,5 mL de tampão de lise contendo inibidores de protease e

transferindo para ultra-som para lise dos parasitos. Após a lise total controlada por microscopia óptica, submeteu-se a centrifugação refrigerada a 4°C (10.000 rpm por 5 minutos). O sedimento foi desprezado. O sobrenadante teve seu teor protéico dosado e foi estocado à temperatura de -20°C.

A imunização dos coelhos provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – Fiocruz para a obtenção do soro, foi realizada no biotério de experimentação do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, da seguinte forma: foram utilizados dois coelhos com peso entre 1800-2000g do sexo masculino.

Foram inoculados 0,2 mL da solução de 2 mg de proteínas totais emulsificada com adjuvante completo de Freund, com agulha 25 x 8, por via intramuscular no músculo da coxa (1º dose). Após 14 dias foi realizada a segunda inoculação, injetando 0,1 mL no dorso dos animais por via intradérmica da solução de 200 microgramas de proteínas totais emulsificada com adjuvante completo de Freund (2º dose). Esperaram-se 7 dias até a outra dose. Após 7 dias foi realizada a terceira inoculação (3º dose), injetando 100 microgramas de proteínas sem adjuvante pela mesma via e no mesmo local da 2ª dose, onde foi observada a reação de Arthus imediata. Após 3 dias foram retirados 2,0 mL de sangue da veia jugular, com agulha 20 x 5,5 mm para verificação do título de anticorpos pela técnica de imunodifusão. Esperou-se 7 dias até a outra dose.

Na quarta inoculação, foram inoculados 100 microgramas de proteínas sem adjuvante pela mesma via e no mesmo local da 2ª e 3ª doses. Após sete dias, como o título sorológico de anticorpos nos coelhos para a marcação dos aos antígenos na imuno-histoquímica foi satisfatória, os coelhos foram anestesiados com 50 mg de quetamina por kilo de peso, associada a 1 mg de diazepam ou acepromazina por kilo

de peso, por via intramuscular com agulha 25 x 7 mm e foi realizada a punção cardíaca com agulha 40 x 12 mm para a retirada total de sangue.

Este procedimento foi aprovado pela CEUA sob número de protocolo P.0238-05.

3.4.5.2. Reação de imunocitoquímica - estreptavidina-biotina-peroxidase

A técnica de imunocitoquímica - estreptavidina-biotina-peroxidase indireta foi realizada para pesquisa de formas amastigotas nos raspados de lesão cutânea ativa, pele íntegra da escápula, focinho e pavilhão auricular e em aspirados de linfonodos poplíteo e cervical e de medula óssea.

Os esfregaços desses raspados foram colocados em lâminas silanizadas fixados pelo etanol 95% e submetidos à inibição da peroxidase endógena e a partir deste ponto, foram realizadas todas as etapas iguais as etapas de técnica de IHQ.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico, percorrendo-se todos os campos. A positividade foi considerada pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho e morfológicamente compatível com uma amastigota (considerando-se fatores como forma, presença de cinetoplasto, tamanho e localização no interior de vacúolos de macrófagos ou livres e textura).

3.4.5.3. Reação de imuno-histoquímica - estreptavidina-biotina-peroxidase

A técnica de imunoperoxidase - estreptavidina-biotina-peroxidase indireta foi realizada para pesquisa de formas amastigotas nos fragmentos de lesões cutâneas ativas e pele íntegra da escápula, focinho e pavilhão auricular.

Os cortes histológicos obtidos de blocos de parafina foram incubados em estufa a 56°C, por 20 minutos e, em seguida, embebidos em xilol em uma etapa de 20 minutos e outra de 2 minutos em temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi feita em banhos de álcool em concentrações decrescentes (100% a 70%), seguido por banhos em água corrente e destilada. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio a 13,5% e metanol, por 40 minutos, seguida por banhos em água corrente e destilada. Os cortes sofreram recuperação antigênica em panela de vapor com tampão citrato pH 7,0 (4,2g de ácido cítrico para 2 litros de água destilada; quando havia necessidade o pH era ajustado com hidróxido de sódio a 2%), durante 3 a 5 minutos de ebulição e, foram, posteriormente, resfriados a temperatura ambiente. Os cortes foram incubados em solução de albumina bovina a 1,5%, por 40 min, temperatura ambiente, para inibição das reações inespecíficas. A seguir, foram incubados com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania (L.) chagasi* na diluição de 1:400, em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. Após a incubação, os cortes, em temperatura ambiente, foram lavados com (Tris-Buffered-Saline) TBS para remoção mecânica do soro anti-*Leishmania*. A solução de lavagem ficou sobre a lâmina por 3 a 5 minutos; esta etapa foi repetida 3 vezes. O excesso da solução de lavagem foi drenado e o anticorpo secundário biotilado universal (DAKO LSAB+ System Kit, Dako

Corporation, CA, EUA) aplicado sobre a lâmina até cobrir o corte. A incubação foi de 20 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados, semelhante à etapa de lavagem anterior, e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB+ System kit, Dako Corporation, CA, EUA) foi então aplicado e os cortes foram incubados por 20 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados novamente antes da revelação. Nesta etapa de revelação foi utilizada a solução de diaminobenzidina (DAB TABLETS, DAKO código de catálogo S300, DAKO Corporation, CA, EUA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (15 microlitros de H₂O₂ para 2mL de DAB). A revelação foi acompanhada ao microscópio óptico, em objetiva de 20x, através do controle positivo previamente selecionado pela riqueza em parasitos, interrompendo-se a reação com água destilada no momento em que as formas amastigotas, acastanhadas, se destacavam no tecido. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados com banhos seqüenciais em álcool a concentrações crescentes (70% a 100%) e xilol, seguido da montagem das lâminas, com lamínula e bálsamo.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico, percorrendo-se todos os campos. A positividade foi considerada pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho (tonalidade conferida pela diaminobenzidina - DAB) e morfológicamente compatível com uma amastigota (considerando-se fatores como forma, tamanho e localização no interior de vacúolos de macrófagos e textura).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados em banco de dados Access 2000.

Foram realizados cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo no software Excel, para cada teste diagnóstico com as diferentes amostras biológicas, considerando a cultura parasitológica como padrão de referência.

Tabela 1: Isolamento e caracterização de *Leishmania (L.) chagasi* em 44 cães oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Cão	Baço	Pele íntegra da orelha	Lesão cutânea	Cães com isolamento e caracterização de <i>L. L. chagasi</i> em 1 amostra biológica	Cães com isolamento e caracterização de <i>L. chagasi</i> em 2 amostras biológicas	Cães com isolamento e caracterização de <i>L. chagasi</i> em 3 amostras biológicas
1	-	+	-	X		
2	-	+	-	X		
3	-	+	-	X		
4	+	+	-		X	
5	+	+	-		X	
6	+	+	+			X
7	+	-	-	X		
8	+	+	-		X	
9	-	+	+		X	
10	+	+	-		X	
11	-	+	-	X		
12	+	-	-	X		
13	+	+	+			X
14	+	+	-		X	
15	+	+	-		X	
16	-	+	+		X	
17	-	+	-	X		
18	+	+	-		X	
19	-	+	-	X		
20	+	-	-	X		
21	-	+	-	X		
22	+	-	+		X	
23	-	+	-	X		
24	+	-	-	X		
25	-	+	+		X	
26	-	+	-	X		
27	+	-	-	X		
28	-	+	-	X		
29	+	-	-	X		
30	+	-	+		X	
31	+	-	-	X		
32	+	-	-	X		
33	+	-	-	X		
34	-	+	+		X	
35	-	+	-	X		
36	-	+	-	X		
37	+	-	+		X	
38	-	+	-	X		
39	-	+	+		X	
40	+	-	-	X		
41	-	+	+		X	
42	-	+	-	X		
43	+	-	-	X		
44	+	-	-	X		
Total	24	29	11	26	26	2

+: amostra positiva para o isolamento e caracterização de *Leishmania (L.) chagasi*; -: amostra negativa para o isolamento e caracterização de *Leishmania (L.) chagasi*.



Figura 1: Cão. LVC. Exame clínico - palpação de linfonodo cervical. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.



Figura 2: Cão. LVC. Coleta de fragmento de pele íntegra da escápula. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.



Figura 3: Cão. LVC. Raspado de pele íntegra da orelha. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.



Figura 4: Cão. LVC. Colocação do raspado de pele íntegra da orelha em lâmina de vidro. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.

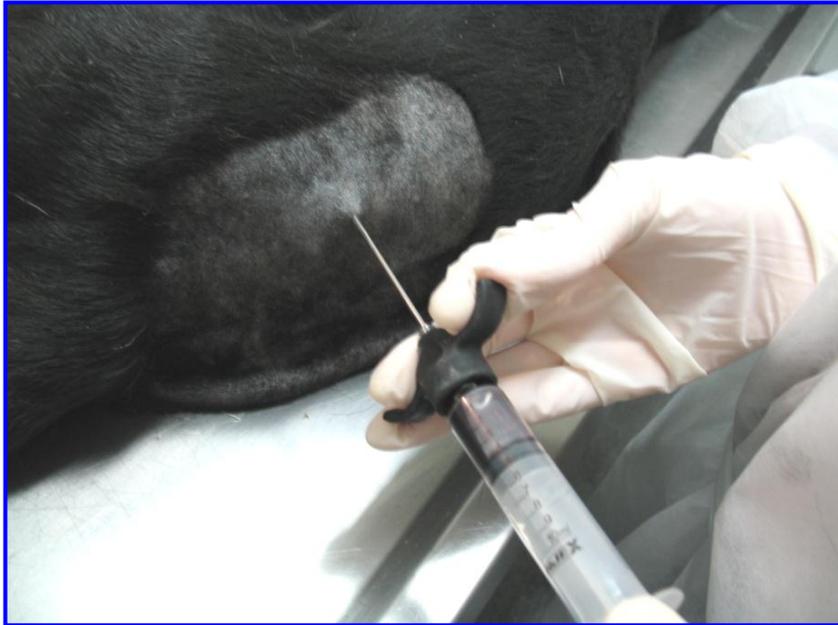


Figura 5: Cão. LVC. Aspirado de medula óssea. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Animais Domésticos – IPEC – Fiocruz.

4. RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS

A maioria dos cães era do sexo masculino (61,3%; n=27). Vinte e nove por cento (n=13) dos cães foram provenientes do município do Rio de Janeiro, sendo a maioria (20,5%; n=9) do bairro de Campo Grande e 70,5% (n=31) do município de Bauru-SP. Houve predomínio de cães em bom estado geral (47,7%; n=21); 38,6% (n=17) apresentavam estado geral ruim e 11,3% (n=5) estado geral regular.

A presença de lesão cutânea foi observada em 11 (25%) animais: 4 animais apresentaram lesão em uma única localização, 4 apresentaram lesão em duas localizações, 1 apresentou lesão em três localizações e 2 apresentaram múltiplas lesões.

De acordo com os sinais clínicos, os animais foram classificados em assintomáticos (n=13; 29,5%), oligossintomáticos (n=23; 52,3%) e sintomáticos (n=8;18,2%). As principais alterações clínicas observadas foram 34,9% (n=15) descamação cutânea furfurácea; 36,4% (n=16) onicogribose; 11,6% (n=5) alopecia generalizada; 6,8% (n=3) alopecia localizada; 25,0% (n=11) emagrecimento; 20,5% (n=9); caquexia; 81,8% (n=36) linfadenomegalia generalizada; 15,9% (n=7) pêlo opaco e 18,2% (n=8) esplenomegalia (Figuras 6 a 10).



Figura 6: Cão. LVC. Úlcera cutânea com bordos definidos e fundo granuloso localizada no membro anterior esquerdo. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.



Figura 7: Cão. LVC. Úlcera cutânea com bordos definidos e fundo granuloso localizada no focinho. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.



Figura 8: Cão. LVC. Múltiplas úlceras cutâneas com bordos definidos e fundo granuloso localizadas no membro posterior esquerdo. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.



Figura 9: Cão. LVC. Descamação cutânea furfurácea e alopecia generalizada. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.



Figura 10: Cão. LVC. Onicogribose. Centro de Controle de Zoonoses – Bauru - SP.

4.2 EXAME CITOPATOLÓGICO

Nos raspados de pele íntegra foi possível à visualização de formas amastigotas em 29,5% (n=13) de amostras da escápula, 29,5% (n=13) da orelha e em 29,5% (n=13) do focinho (Figuras 11 e 12). Nos aspirados de medula óssea (Figura 13) foi possível visualizar formas amastigotas em 45,5% (n=20) dos animais. Nos aspirados de linfonodo, formas amastigotas foram observadas em 25% (n=11) dos aspirados de linfonodo cervical e em 52,7% (n=23) nos aspirados do linfonodo poplíteo (Figura 14), (Tabelas 2 e 3).

Os resultados dos exames citopatológicos das lesões cutâneas (Figura 15)

dos 11 cães que apresentaram úlceras cutâneas estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

A sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos exames citopatológicos dos raspados e fragmentos de pele íntegra de amostras da escápula, da orelha e de lesões cutâneas e de aspirados de linfonodos e medula óssea estão descritos nas Tabelas 6 e 7

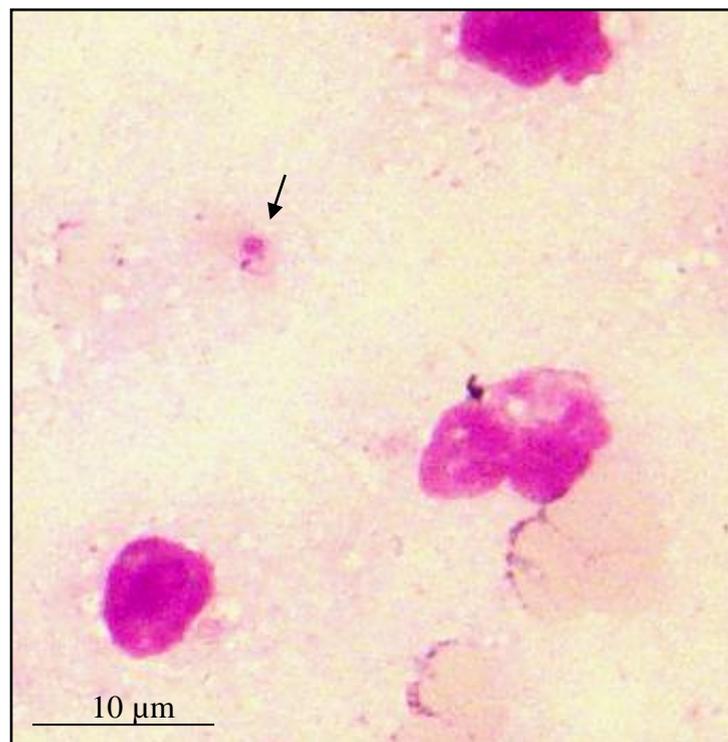


Figura 11: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de pele íntegra da orelha. Giemsa; Objetiva:100x.

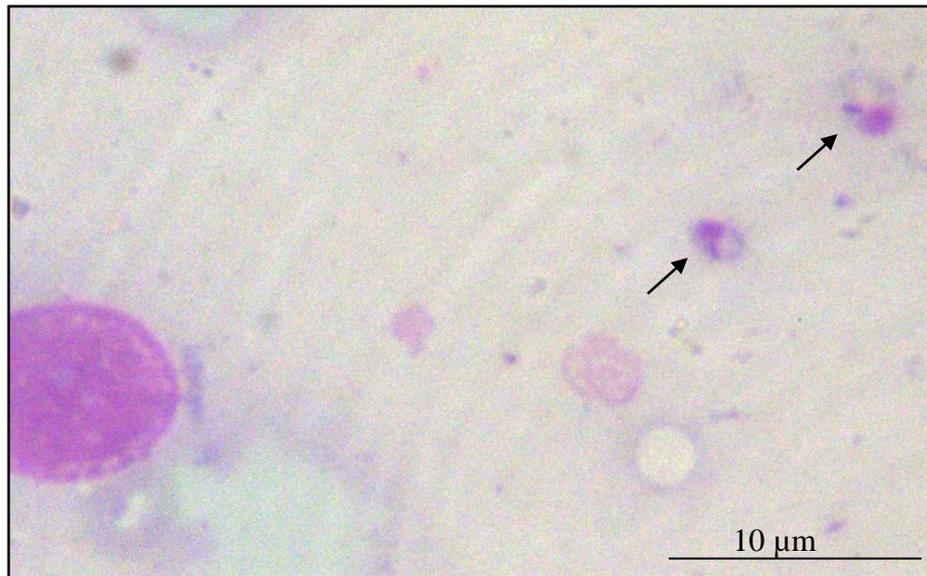


Figura 12: Cão. LVC. Formas amastigotas (setas) em raspado de pele íntegra do focinho. Giemsa; Obj.:100x.

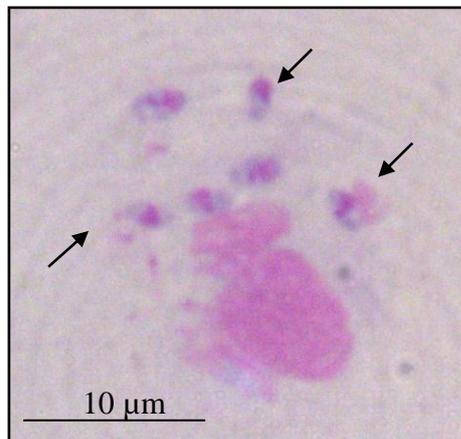


Figura 13: Cão. LVC. Formas amastigotas (setas) em aspirado de medula óssea. Giemsa; Obj.:100x.

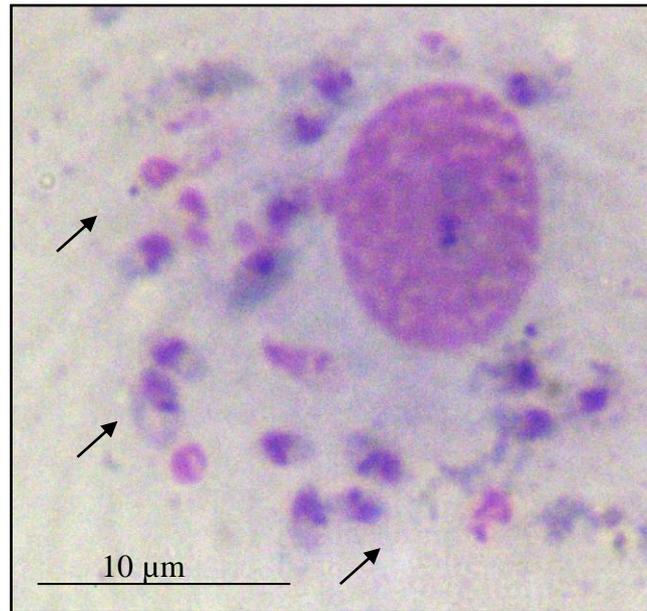


Figura 14: Cão. LVC. Formas amastigotas (setas) em aspirado de linfonodo poplíteo. Giemsa; Obj.:100x.

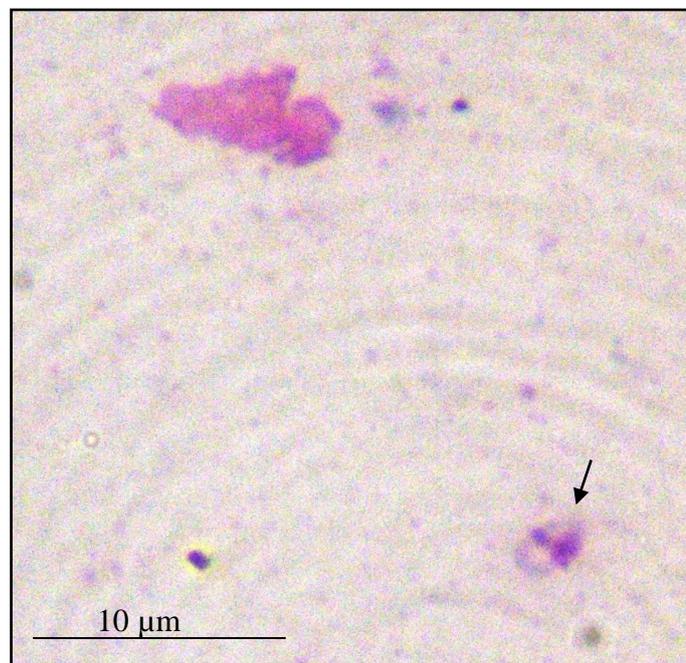


Figura 15: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de úlcera cutânea do focinho. Giemsa; Obj.:100x.

4.3 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Formas amastigotas foram observadas em 45,5% (n=20) de amostras de pele íntegra da escápula, 52,3% (n=23) da orelha e 65,9% (n=29) do focinho (Figuras 16, 17 e 18) (Tabelas 2 e 3).

Nas 31 amostras de pele íntegra da escápula, da orelha e do focinho as quais não foram encontradas amastigotas na citopatologia, foram visualizadas amastigotas em 7 amostras de escápula, 10 amostras orelha e em 16 amostras de focinho na HE (Tabela 3).

Os resultados dos exames histopatológicos das lesões cutâneas dos 11 cães que apresentaram úlceras cutâneas estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

A sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos exames histopatológicos dos fragmentos de pele íntegra de amostras da escápula, da orelha e de lesões cutâneas estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

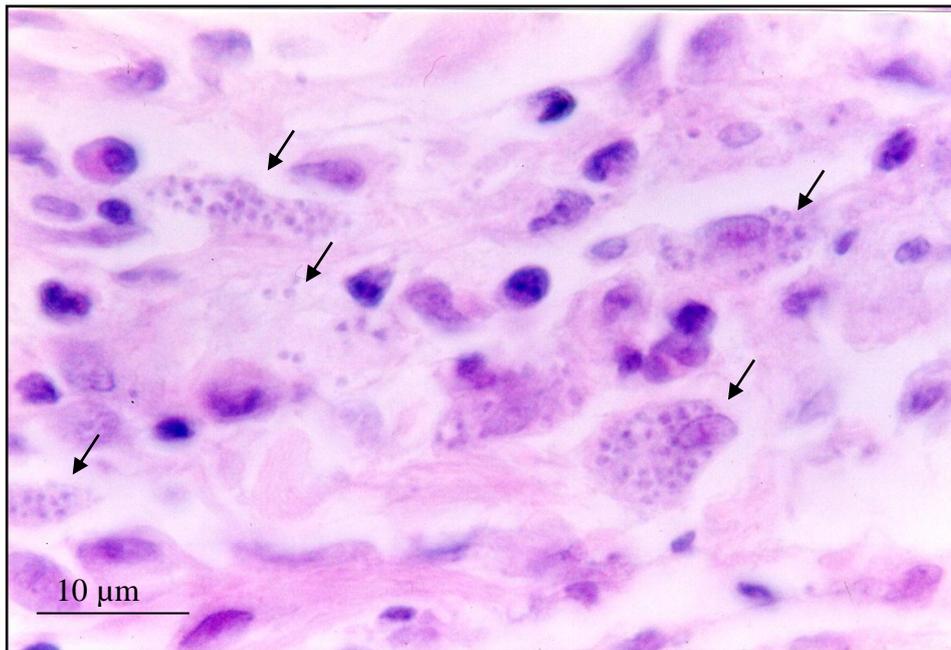


Figura 16: Cão. LVC. Formas amastigotas no interior e exterior dos macrófagos (setas) em fragmento de pele íntegra da escápula. HE; Obj.:100x.

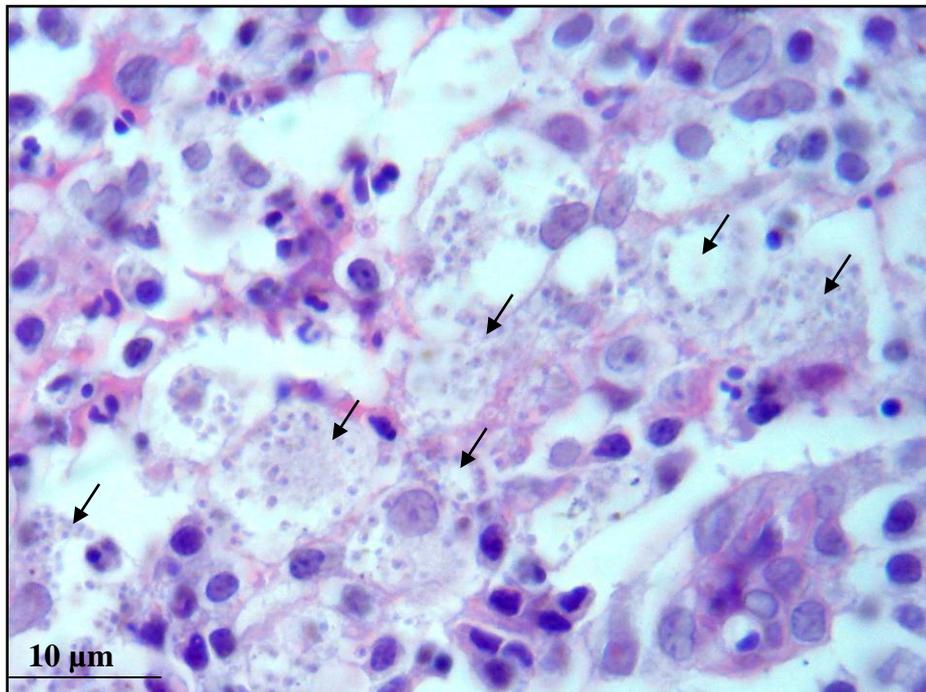


Figura 17: Cão. LVC. Formas amastigotas no interior e exterior dos macrófagos (setas) em fragmento de pele íntegra da orelha. HE; Obj.:100x.

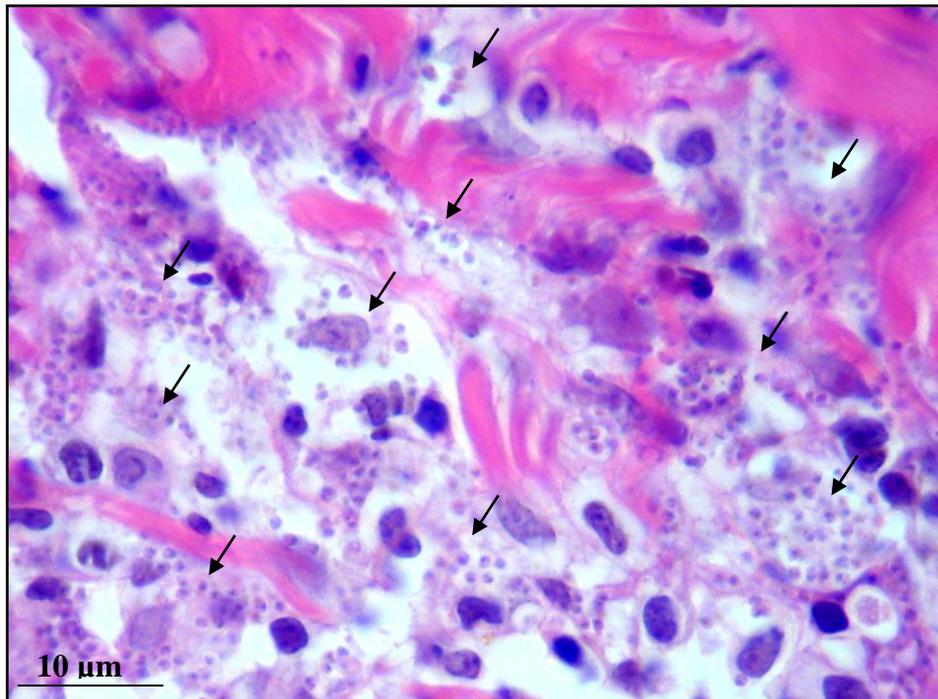


Figura 18: Cão. LVC. Formas amastigotas no interior e exterior dos macrófagos (setas) em fragmento de pele íntegra do focinho. HE; Obj.:100x.

4.4 REAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA - ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE COM SORO POLICLONAL ANTI-*LEISHMANIA*

Formas amastigotas foram observadas em 47,8% (n=21) das amostras provenientes de pele íntegra da escápula, 56,8% (n=25) da orelha (Figura 19) e 68,2% (n=30) do focinho (Figura 20). Nos aspirados de linfonodo cervical foi possível visualizar formas amastigotas em 36,7% (n=16) dos cães, em 63,6% (n=28) nos aspirados de medula óssea, e 68,2% (n=30) nos aspirados do linfonodo poplíteo (Figura 21) (Tabelas 2 e 3).

Nas 31 amostras de pele íntegra da escápula, da orelha e do focinho e em que não foram encontradas amastigotas na citopatologia, foram visualizadas amastigotas em 8 amostras de escápula, 12 de orelha e 17 de focinho na ICQ (Tabela 3).

Nas 33 amostras de aspirados de linfonodo cervical que não foram encontradas amastigotas no CP, foram visualizadas amastigotas em 5 amostras de aspirados de linfonodo cervical na ICQ. Nas 21 amostras de aspirados de linfonodo poplíteo que não foram encontradas amastigotas no CP, foram visualizadas amastigotas em 7 amostras de aspirados de linfonodo poplíteo na ICQ. Nas 24 amostras de aspirados de medula óssea que não foram encontradas amastigotas no CP, foram visualizadas amastigotas em 8 amostras de aspirados de medula óssea na ICQ (Tabela 3).

Nas 24 amostras de pele íntegra da escápula em que não foram encontradas amastigotas na histopatologia, foram visualizadas amastigotas em 1 amostra na ICQ. Nas 14 amostras de pele íntegra do focinho em que não foram encontradas

amastigotas no HP, foram visualizadas amastigotas em 1 amostra na ICQ. Nas 21 amostras de pele íntegra da orelha em que não foram encontradas amastigotas no HP, foram visualizadas amastigotas em 2 amostras na ICQ (Tabela 3).

Os resultados das reações de ICQ das lesões cutâneas dos 11 cães que apresentaram úlceras cutâneas estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

A sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo das reações de ICQ dos raspados e fragmentos de pele íntegra de amostras da escápula, da orelha e de lesões cutâneas e de aspirados de linfonodos e medula óssea estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

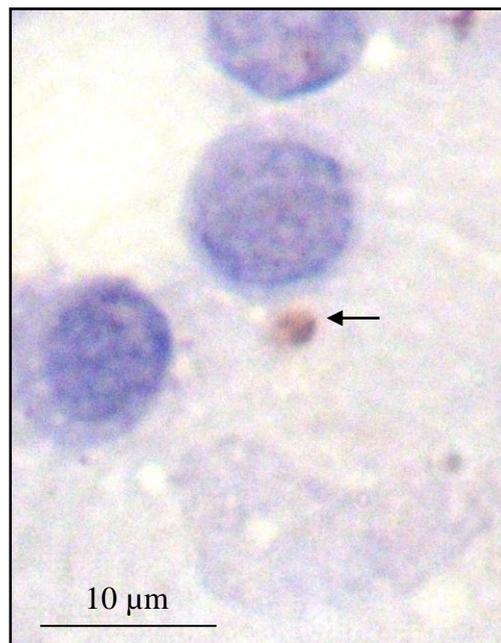


Figura 19: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de pele normal da orelha; Obj.: 100x. ICQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* 1:400.

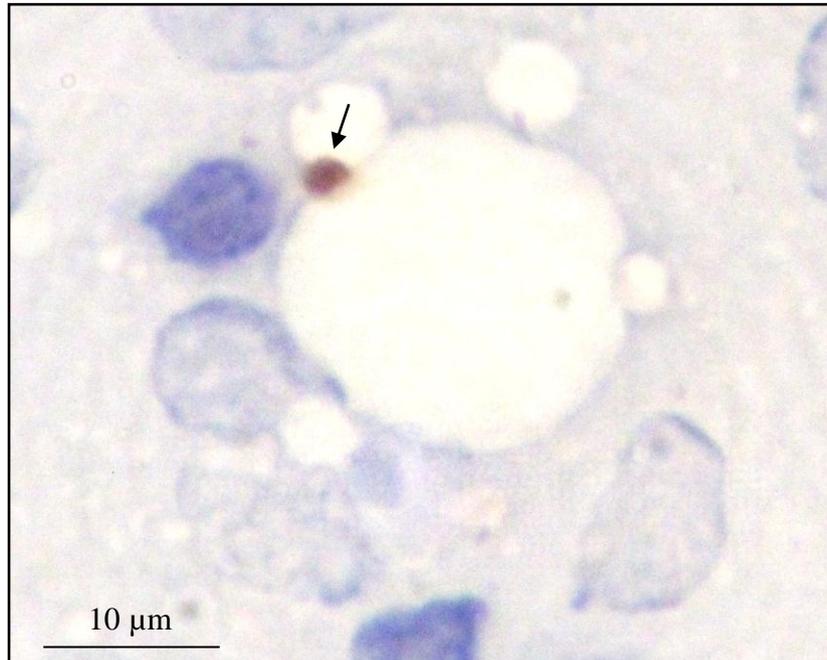


Figura 20: Cão. LVC. Forma amastigota (seta) em raspado de pele normal do focinho; Obj.:100x. ICQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* 1:400.

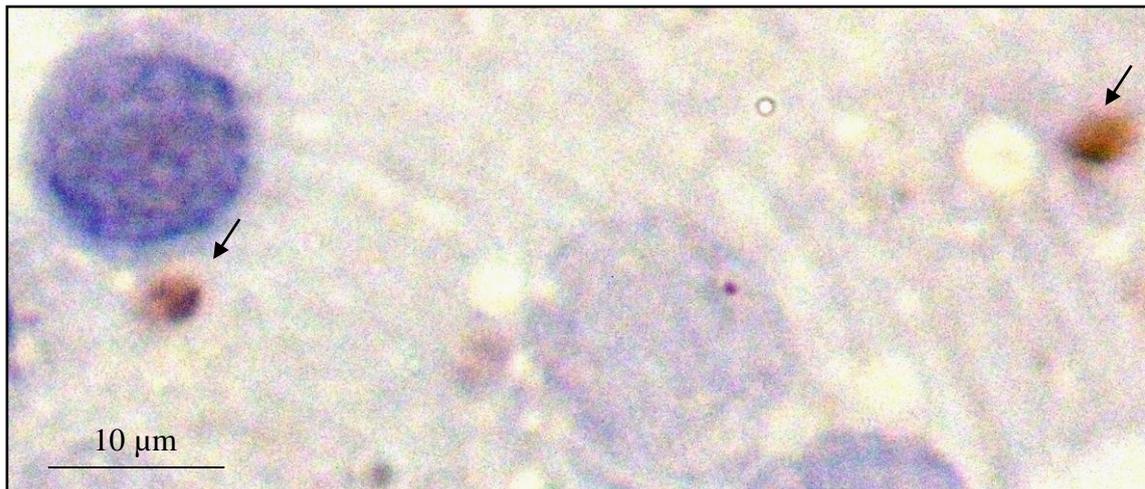


Figura 21: Cão. Linfonodo poplíteo. LVC. Formas amastigotas (setas) em aspirado de linfonodo poplíteo. Obj:100x. ICQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* 1:400.

4.5 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PELA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE - (ESTREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE) COM SORO POLICLONAL ANTI-LEISHMANIA

Formas amastigotas foram observadas em 52,3% (n=23) das amostras provenientes de pele íntegra da escápula, 72,7% (n=31) da orelha e 88,6% (n=39) do focinho (Figuras 22, 23 e 24), (Tabelas 2 e 3).

Nas 31 amostras de pele íntegra da escápula, da orelha e do focinho em que não foram encontradas amastigotas no CP, foram visualizadas amastigotas em 10 amostras de escápula, 18 amostras de orelha e 26 de focinho na IHQ (Tabela 3).

Nas 24 amostras de pele íntegra da escápula em que não foram encontradas amastigotas no HP, foram visualizadas amastigotas em 3 amostras na IHQ. Nas 21 amostras de pele íntegra da orelha em que não foram encontradas amastigotas no HP, foram visualizadas amastigotas em 8 amostras na IHQ. Nas 15 amostras de pele íntegra do focinho em que não foram encontradas amastigotas no HP, foram visualizadas amastigotas em 10 amostras na IHQ (Tabela 3).

Nas 23 amostras de pele íntegra da escápula em que não foram encontradas amastigotas na ICQ, foram visualizadas amastigotas em 2 amostras na IHQ. Nas 19 amostras de pele íntegra da orelha em que não foram encontradas amastigotas na ICQ, foram visualizadas amastigotas em 6 amostras na IHQ. Nas 14 amostras de pele íntegra do focinho em que não foram encontradas amastigotas na ICQ, foram visualizadas amastigotas em 9 amostras na IHQ (Tabela 3).

Os resultados das reações de IHQ das lesões cutâneas dos 11 cães que apresentaram úlceras cutâneas estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

A sensibilidade, especificidade, o valor preditivo positivo E o valor preditivo negativo das reações de IHQ dos raspados e fragmentos de pele íntegra de amostras da escápula, da orelha e de lesões cutâneas e de aspirados de linfonodos e medula óssea estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

A comparação entre a sensibilidade dos exames citopatológicos, histopatológicos e das reações de ICQ e IHQ em diferentes amostras biológicas dos cães com leishmaniose visceral é apresentada na tabela 8.

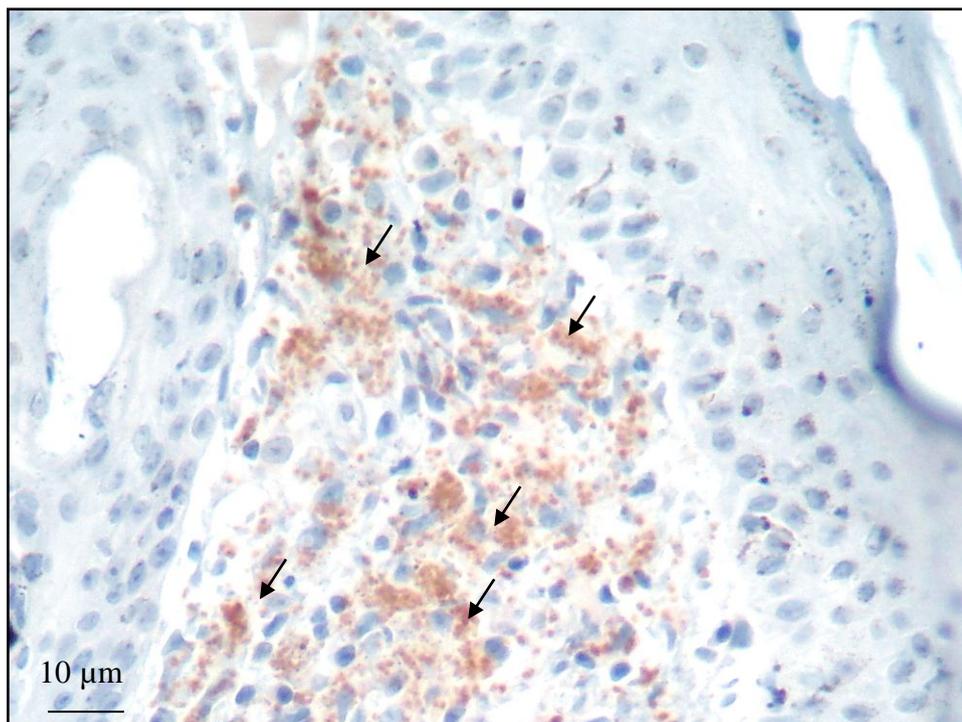


Figura 22: Cão. LVC. Formas amastigotas em fragmento de pele normal da orelha. IHQ soro anti-*L. (L.) chagasi*; Obj.:40x. IHQ com soro policlonal anti-*L. (L.) chagasi* – 1:400.

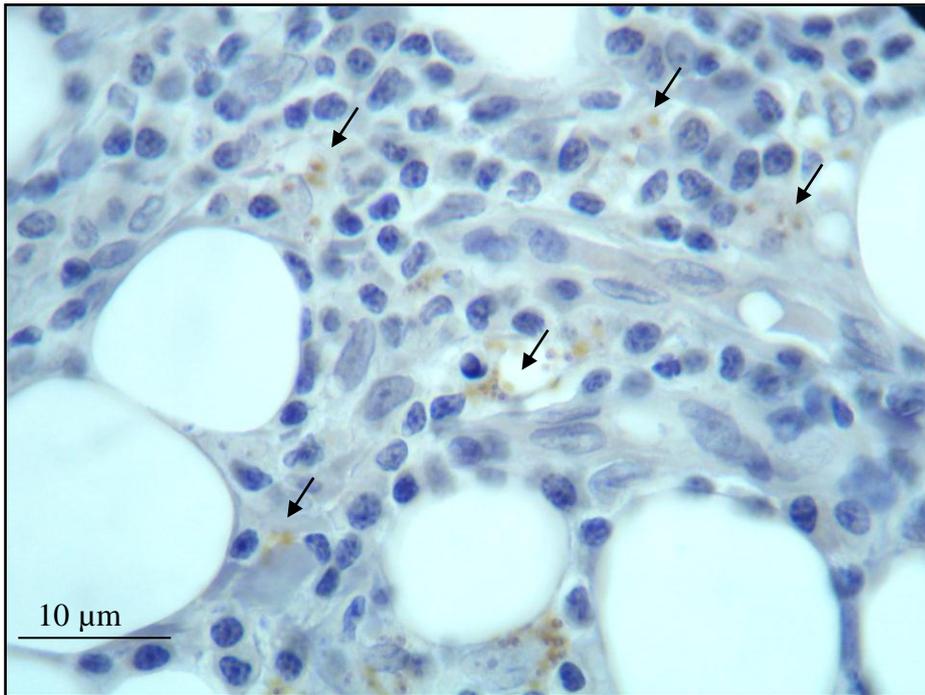


Figura 23: Cão. LVC. Formas amastigotas em fragmento de pele normal da escápula. IHQ soro anti-*L. (L.) chagasi*; Obj.:100x. IHQ – estreptavidina biotina peroxidase – com soro policlonal anti-*Leishmania (L.) chagasi* – 1:400.

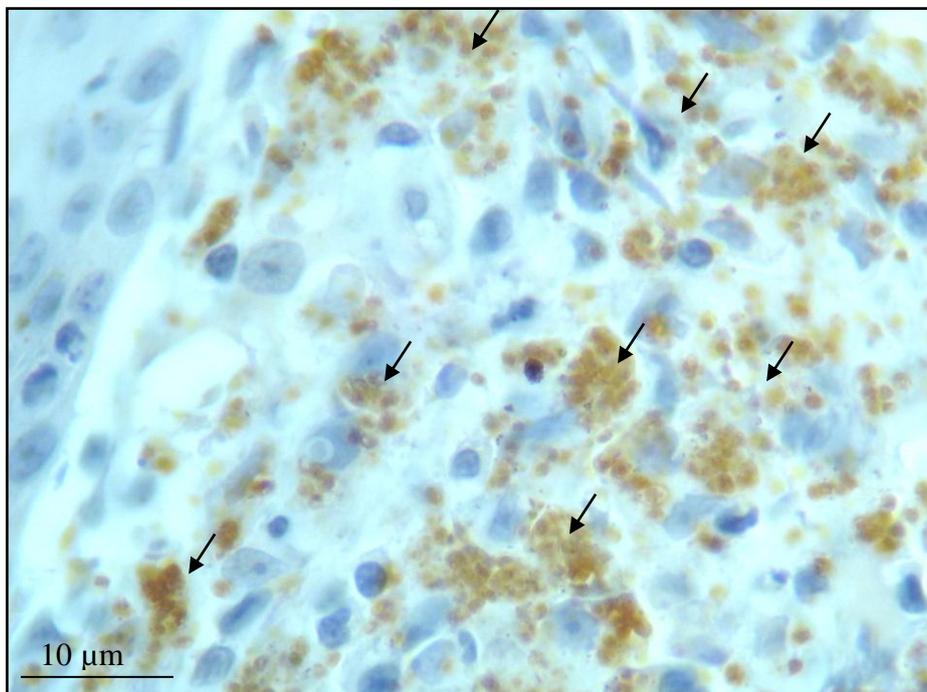


Figura 24: Cão. LVC. Formas amastigotas em fragmento de pele normal do focinho. IHQ soro anti-*L. (L.) chagasi*; Obj.:100x. IHQ – estreptavidina biotina peroxidase – com soro policlonal anti-*Leishmania (L.) chagasi* – 1:400.

Tabela 2: Positividade dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica de amostras de pele íntegra do focinho, da orelha, da escápula e dos aspirados de medula óssea e de linfonodos poplíteo e cervical, de 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Amostras biológicas	EC	EH	ICQ	IHQ
FPI do focinho	NR	65,9% (n=29)	NR	88,6% (n=39)
FPI da orelha	NR	52,3% (n=23)	NR	72,7% (n=31)
FPI da escápula	NR	45,5% (n=20)	NR	52,3% (n=23)
RPI do focinho	29,5% (n=13)	NR	68,2% (n=30)	NR
RPI da orelha	29,5% (n=13)	NR	56,8% (n=25)	NR
RPI da escápula	29,5% (n=13)	NR	47,8% (n=21)	NR
A. de medula óssea	45,5% (n=20)	NR	63,6% (n=28)	NR
A. de linfonodo poplíteo	52,7% (n=23)	NR	68,2% (n=30)	NR
A. de linfonodo cervical	25% (n=11)	NR	36,7% (n=16)	NR

RPI: raspado de pele íntegra; A: aspirado; EC: exame citopatológico; EH: Exame histopatológico; ICQ: reação de imunocitoquímica; IHQ: reação de imuno-histoquímica; NR: não realizado.

Tabela 3: Resultado dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes amostras biológicas de 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Cães	C RO	C RF	C RE	C MO	C LC	C LP	H FO	H FF	H FE	ICQ RO	ICQ RF	ICQ RE	ICQ LP	ICQ LC	ICQ MO	IHQ FO	IHQ FF	IHQ FE
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
17	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
18	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
25	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
29	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
36	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
43	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
44	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: C: exame citopatológico; H: exame histopatológico; ICQ: imunocitoquímica; IHQ: imunohistoquímica; RO: raspado de pele íntegra da orelha; RF: raspado de pele íntegra do focinho; RE: raspado de pele íntegra da escápula; MO: aspirado de medula óssea; LP: aspirado de linfonodo poplíteo; LC: aspirado de linfonodo cervical; FO: fragmento de pele íntegra da orelha; FF: fragmento de pele íntegra do focinho; FE: fragmento de pele íntegra da escápula

Tabela 4: Positividade dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica de lesões cutâneas dos 11 cães com LV que apresentavam úlceras cutâneas, oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Localização das lesões cutâneas	Número das lesões cutâneas	Positividade do EC	Positividade do EH	Positividade da ICQ	Positividade da IHQ
Membro posterior	n=5	1	4	4	4
Membro anterior	n=5	-	3	3	4
Orelha	n=4	-	1	1	1
Focinho	n=4	-	4	4	4
Lábio	n=1	-	-	-	-
Cauda	n=1	-	-	-	-

EC: exame citopatológico; EH: Exame histopatológico; ICQ: reação de imunocitoquímica; IHQ: reação de imuno-histoquímica; -: negativo.

Tabela 5: Resultado dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e imuno-histoquímica em diferentes amostras biológicas de lesões cutâneas dos 11 cães oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Cães	C LF	C LMA	H LF	H LMA	H LMP	H LO	ICQ LF	ICQ LMA	ICQ LMP	ICQ LO	IHQ LF	IHQ LMA	IHQ LMP	IHQ LO
1	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: C: exame citopatológico; H: exame histopatológico; ICQ: imunocitoquímica; IHQ: imunohistoquímica; LF: raspado de lesão do focinho; LMA: raspado de lesão do membro anterior; LMP: raspado de lesão do membro posterior; LO: raspado de lesão da orelha.

Tabela 6: Sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e o teste Kappa dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e de imuno-histoquímica de amostras de pele íntegra do focinho, da orelha, da escápula e dos aspirados de medula óssea e de linfonodos poplíteo e cervical dos cães dos 44 cães com LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Amostras biológicas		Métodos de diagnóstico	Sensibilidade dos métodos de diagnóstico	Especificidade e VPP dos métodos de diagnóstico	VPN dos métodos de diagnóstico
FPI do focinho	EH		61,36%	100%	68,52%
	IHQ		84,09%	100%	84,09%
FPI da orelha	EH		47,73%	100%	61,67%
	IHQ		65,91%	100%	71,15%
FPI da escápula	EH		40,91%	100%	58,73%
	IHQ		47,73%	100%	61,67%
RPI do focinho	EC		29,55%	100%	54,41%
	ICQ		63,64%	100%	69,81%
RPI da orelha	EC		29,55%	100%	54,41%
	ICQ		52,27%	100%	63,79%
RPI da escápula	EC		29,55%	100%	54,41%
	ICQ		43,18%	100%	59,68%
A. de medula óssea	EC		45,45%	100%	60,66%
	ICQ		53,26%	100%	65,78%
A. de linfonodo poplíteo	EC		52,27%	100%	63,79%
	ICQ		63,64%	100%	69,81%
A. de linfonodo cervical	EC		25,00%	100%	52,86%
	ICQ		31,52%	100%	37,56%

RPI: raspado de pele íntegra; A: aspirado; EC: exame citopatológico; EH: Exame histopatológico; ICQ: reação de imunocitoquímica; IHQ: reação de imuno-histoquímica; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Tabela 7: Sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e o teste Kappa dos exames citopatológico e histopatológico e das reações de imunocitoquímica e de imuno-histoquímica em amostras de 11 cães com lesões cutâneas LV oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo 2007-2009.

Localização das lesões cutâneas	Métodos de diagnóstico	Sensibilidade dos métodos de diagnóstico	Especificidade e VPP dos métodos de diagnóstico	VPN dos métodos de diagnóstico
F. de lesão do membro posterior	EH	6,82%	100%	47,44%
	IHQ	9,09%	100%	48,05%
F. de lesão do membro anterior	EH	6,82%	100%	47,44%
	IHQ	6,82%	100%	47,44%
F. de lesão da orelha	EH	2,27%	100%	46,25%
	IHQ	2,27%	100%	46,25%
F. de lesão do focinho	EH	9,09%	100%	48,05%
	IHQ	9,09	100%	48,05%
R. de lesão do membro posterior	EC	-	-	-
	ICQ	9,09%	100%	48,05%
R. de lesão do membro anterior	EC	2,27%	100%	46,25%
	ICQ	6,82%	100%	47,44%
R. de lesão da orelha	EC	-	-	-
	ICQ	2,27%	100%	46,25%
R. de lesão do focinho	EC	4,55%	100%	46,84%
	ICQ	9,09%	100%	48,05%

R: raspado; EC: exame citopatológico; EH: Exame histopatológico; ICQ: reação de imunocitoquímica; IHQ: reação de imuno-histoquímica; NR: não realizado; -não foram observadas amostras positivas.

Tabela 8 Comparação entre a sensibilidade dos exames citopatológico, histopatológico, imunocitoquímico e imuno-histoquímico em diferentes amostras biológicas dos 44 cães com LV, 2007-2009 oriundos do Rio de Janeiro e de São Paulo.

Exames laboratoriais e amostras biológicas	Porcentagem
Exame citopatológico	
Raspados de lesões cutâneas dos membros anteriores	2,27
Raspados de lesões cutâneas do focinho	4,55
Aspirados de linfonodos cervicais	25,00
Raspados de pele íntegra da orelha	29,55
Raspados de pele íntegra da escápula	29,55
Raspados de pele íntegra do focinho	29,55
Aspirados de medula óssea	45,45
Aspirados de linfonodos poplíteos	52,27
Exame histopatológico	
Fragmentos de lesões cutâneas da orelha	2,27
Fragmentos de lesões cutâneas dos membros posteriores	6,82
Fragmentos de lesões cutâneas dos membros anteriores	6,82
Fragmentos de lesões cutâneas do focinho	9,09
Fragmentos de pele íntegra da escápula	40,91
Fragmentos de pele íntegra da orelha	47,73
Fragmentos de pele íntegra do focinho	61,36
Reação de imunocitoquímica	
Raspados de lesões cutâneas da orelha	2,27
Raspados de lesões cutâneas dos membros anteriores	6,82
Raspados de lesões cutâneas dos membros posteriores	9,09
Raspados de lesões cutâneas do focinho	9,09
Aspirados de linfonodos cervicais	31,52
Raspados de pele íntegra da escápula	43,18
Raspados de pele íntegra da orelha	52,27
Aspirados de medula óssea	53,26
Raspados de pele íntegra do focinho	63,64
Aspirados de linfonodos poplíteos	63,64
Reação de imuno-histoquímica	
Fragmentos de lesões cutâneas da orelha	2,27
Fragmentos de lesões cutâneas dos membros anteriores	6,82
Fragmentos de lesões cutâneas dos membros posteriores	9,09
Fragmentos de lesões cutâneas do focinho	9,09
Fragmentos de pele íntegra da escápula	47,73
Fragmentos de pele íntegra da orelha	65,91
Fragmentos de pele íntegra do focinho	84,09

5. DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral 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) que apresenta grande diversidade e complexidade de seus agentes etiológicos e transmissores (Chappuis et al., 2007), e vem se tornando 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, 2011).

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). Cães domésticos, considerados os principais reservatórios da LV fora do ambiente silvestre, desempenham um papel fundamental na sua transmissão e manutenção da doença no país (Di Lorenzo et al., 2000), uma vez que a infecção pode se manter clinicamente inaparente nos cães durante um longo período (Alvar et al., 2004).

Silva et al., (2011) descreveram que no ano de 2008, 155 cães obtiveram titulação maior do que 1:40 na RIFI realizado em amostras de sangue coletado em papel filtro, no Município do Rio de Janeiro. Estes cães foram submetidos à eutanásia e foram coletadas amostras biológicas para realização de cultura parasitológica, PCR e ensaios sorológicos. Entretanto, 59% dos 155 cães obtiveram resultados negativos para Leishmaniose em todos os testes realizados, o que demonstrou que o programa de controle de leishmaniose visceral precisa ser ajustado para que cães

não infectados não sejam submetidos eutanásia e um maior número de cães infectados seja submetido a eutanásia.

Devido a todos estes fatos citados acima, neste trabalho foi realizado um estudo citopatológico e imunocitoquímico de raspados de pele íntegra de orelha, escápula e focinho e de aspirados de medula óssea e linfonodos poplíteo e cervical e em estudo histopatológico e imuno-histoquímico de fragmentos de pele íntegra de orelha, escápula e focinho, de 44 cães com isolamento em cultura e identificação de *L. (L.) chagasi*, oriundos do Município de Bauru – SP e do Município do Rio de Janeiro - RJ. A comparação destas técnicas de diagnóstico foi realizada para tentar se obter uma técnica com boa especificidade e sensibilidade e um sítio anatômico que apresente parasitismo, que possam ser utilizados para confirmação parasitológica em cães selecionados para eutanásia pelos programas de controle de leishmaniose.

Cães com LV apresentam intenso parasitismo na pele íntegra do focinho, pavilhão auricular, abdômem e escápula (Deane & Deane 1955; Madeira et al., 2004; Madeira et al., 2006; Xavier et al., 2006; Verçosa et al., 2008; Madeira et al., 2009; Calabrese et al., 2010). Entretanto, ainda não há definição do sítio de eleição para o diagnóstico. Devido a este fato, neste estudo coletamos amostras de pele íntegra da escápula, do focinho e da orelha com finalidade de obter um sítio de eleição para o diagnóstico da LVC.

O diagnóstico parasitológico estabelecido por isolamento em cultura (padrão de referência) e identificação do parasito dos cães com LV deste estudo, permitiu o diagnóstico definitivo de leishmaniose e possibilitou o cálculo da sensibilidade e especificidade dos exames citopatológicos e histopatológicos e das reações de ICQ

e IHQ, quando comparadas com o padrão de referência e a comparação das sensibilidades e especificidades destes quatro métodos de diagnóstico.

No presente estudo as características clínicas dos cães com LVC, estão de acordo com o descrito por Madeira et al. (2006); Troncalerri et al. (2009). Não foi observada predisposição sexual, etária ou racial nos cães, o que está de acordo com os seguintes autores (Abranches et al., 1991; Fisa et al., 1999; Feitosa et al., 2000).

Os principais locais das úlceras cutâneas nos cães do presente relato foram o membro posterior, membro anterior, orelha, focinho, lábio e cauda o que está de acordo com (Marzochi et al., 1985; Alvar et al., 2004; Silva et al., 2001; Lima et al., 2004; Madeira et al., 2006; Travi et al., 2009). É importante ressaltar que em todas as amostras de lesões cutâneas do focinho foram observadas formas amastigotas, o que demonstra que amostras de lesões cutâneas localizadas no focinho, devem ser consideradas para a confirmação parasitológica da LVC, entretanto, neste estudo, somente 4 cães apresentavam lesão cutânea no focinho.

A descamação cutânea furfurácea; alopecia generalizada; alopecia localizada; emagrecimento e caquexia, sinais clínicos observados nos cães com LVC deste estudo, estão de acordo com o relatado na literatura (Longstaff & Guy, 1985; Kontos & Koutinas, 1993; Ciaramella & Corona, 2003; Alvar et al., 2004; Lima et al., 2004; Moreira et al., 2007; Travi et al., 2009). A esplenomegalia esteve presente em um reduzido número de animais, concordando com os achados de Kontos & Koutinas, (1993) e Lima et al. (2004) e discordando dos achados de Slappendel & Ferrer, (2000); Ciaramella & Corona, (2003), podendo ser atribuída à fase da doença em que se encontravam os cães. A onicogribose comumente relatada na LVC (Ferrer 1994; Kontos & Koutinas, 1993, Feitosa et al., 2000; Verçosa et al., 2008), foi

observada em somente cinco animais, concordando com Slappendel, (1988) e Slappendel & Ferrer, (2000) e Travi et al. (2009), que relataram que tal evento ocorre em pequena proporção.

O CP dos raspados de pele íntegra da orelha, focinho e escápula dos cães deste estudo apresentou baixa sensibilidade, o que sugere que a análise citopatológica de raspados de pele íntegra não é um bom método de diagnóstico para a LVC. Este fato pode estar associado à menor quantidade de material coletada em raspados, quando comparado ao tamanho do fragmento que vai ser utilizado para a cultura parasitológica, o que pode influenciar negativamente a positividade dos raspados.

A análise citopatológica dos raspados de pele íntegra, dos aspirados dos linfonodos cervicais e dos raspados de úlceras cutâneas dos cães deste estudo, apresentou baixa sensibilidade. Estes dados sugerem que a análise citopatológica de aspirados de linfonodos cervicais e dos raspados de úlceras cutâneas não é um bom método de diagnóstico para a leishmaniose visceral canina, devido a sua baixa sensibilidade. Entretanto, a análise citopatológica dos aspirados de medula óssea e de linfonodos poplíteos apresentou maior sensibilidade diagnóstica, quando comparada à análise citopatológica de amostras biológicas de pele íntegra, lesões cutâneas e de linfonodos cervicais.

De acordo com Maderia et al. (2006) as amostras biológicas de linfonodos cervicais apresentam maior positividade, quando comparado com amostras biológicas de linfonodos poplíteo. Entretanto, neste estudo foi observada maior positividade na análise de amostras de aspirados dos linfonodos poplíteos, o que também não está de acordo com Lima et al. (2004) que não observaram diferença de parasitismo entre os aspirados de linfonodo cervical e poplíteo no seu estudo. Saridomichelakis et al. (2005) observaram maior positividade em amostras de

aspirados de linfonodos poplíteos em relação ao exame citopatológico de aspirados de medula óssea, semelhante aos resultados da presente pesquisa.

O HP dos fragmentos de pele íntegra da orelha e escápula apresentou sensibilidades semelhantes. O HP dos fragmentos de pele íntegra do focinho apresentou melhor sensibilidade quando comparado a análise histopatológica dos fragmentos de pele íntegra da orelha e escápula. De acordo com Xavier et al. (2006) a orelha e o focinho são os melhores sítios para coleta de amostras biológicas para diagnóstico das leishmanioses. Entretanto, no presente estudo, observamos que o melhor sítio para coleta de amostras biológicas para realização do HP é o focinho. Verçosa et al. (2008) relataram que a pele íntegra das orelhas apresenta maior positividade na análise histopatológica, o que também não está de acordo com o presente estudo.

A comparação entre o HP e o CP é controversa no diagnóstico das leishmanioses humanas, com alguns autores favorecendo o exame histopatológico (Schubach et al., 2001; Faber et al., 2003) e outros afirmando que este é menos sensível (Salman et al., 1999). Neste estudo observamos que o HP apresenta maior sensibilidade quando comparada ou CP no diagnóstico da LVC, em amostras biológicas de pele íntegra da orelha, do focinho e da escápula e de lesões cutâneas.

É importante resaltar que todos os casos positivos no EC também o foram pela HE. Convit et al. (1997) admitem que a coloração pelo Giemsa em cortes histológicos seja a mais eficiente para demonstração do parasito. Entretanto, neste trabalho, utilizamos cortes finos, corados pela HE, que foram igualmente eficientes.

Este estudo demonstrou que o diagnóstico parasitológico por meio do HP corado pela HE de fragmentos de pele íntegra da orelha, escápula, focinho e úlceras cutâneas e do exame citopatológico corado pelo Giemsa de raspados de pele

íntegra da orelha, escápula, focinho e úlceras cutâneas e de aspirados de medula óssea e de linfonodos cervicais e poplíteos, mesmo quando associados, podem não detectar o parasito em um percentual significativo de casos, sendo insuficientes para diagnóstico da doença, o que está de acordo com o descrito por Bourdoiseau et al. (1997) Tafuri et al. (2004); Sollano-Galeno et al. (2004).

A produção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* sp. é fundamental para a aplicação em técnicas imunológicas de diagnóstico. A utilização de coelhos neste processo tem sido amplamente utilizada apresentando bom rendimento na obtenção de anticorpos específicos (Froés et al., 2005). As reações de IHQ e ICQ - estreptavidina-biotina-peroxidase deste estudo, foram realizadas com anticorpo obtido a partir da imunização de coelhos com *L. (L.) chagasi*.

O exame imunocitoquímico dos raspados de pele íntegra do focinho e dos aspirados dos linfonodos poplíteos apresentou maior sensibilidade quando comparado com o exame imunocitoquímico dos raspados de pele íntegra da escápula, da orelha e dos aspirados de medula óssea e linfonodos cervicais. O que sugere que a análise imunocitoquímica deve ser realizada em amostras de pele íntegra do focinho e dos aspirados dos linfonodos poplíteos quando comparado com amostras de dos aspirados de medula óssea e linfonodos cervicais e com os raspados de pele íntegra da orelha e escápula e de lesões cutâneas. Outro achado importante é o fato de que todos os casos positivos na citopatologia e HE também o foram na IHQ.

Barrouin-Melo et al., 2006 estudaram a população celular de baços de cães infectados por *Leishmania chagasi infantum* por meio dos exames citopatológicos e imunocitoquímicos, demonstrando que a positividade do exame imunocitoquímico foi maior do que a positividade do CP em aspirados de baços de cães com LVC. Neste

estudo observamos maior sensibilidade do exame imunocitoquímico quando comparado ao CP em raspados de pele íntegra de orelha, focinho e escápula.

A ICQ mostrou-se mais sensível do que o CP e do que o HP provavelmente porque, pela coloração conferida pela reação, podemos em alguns casos, prescindir de alguns criterios morfológicos na identificação dos parasitos. Nesse contexto, nos casos em que não foi possível diagnosticar o parasito por este aparecer incompleto nos cortes histológicos e na citopatologia, na ICQ a marcação da estrutura parasitária pelo cromógeno possibilita a identificação da sua forma, localização e tamanho.

Uma outra vantagem da ICQ, é que pode ser realizada com amostras coletadas de forma menos invasiva para o cão, como os raspados de pele íntegra da orelha, do focino e da escápula, quando comparado com a coleta de fragmentos de pele íntegra da orelha, do focinho e da escápula para realização da histopatologia.

Neste estudo, a coleta de raspados e de fragmentos de lesões cutâneas e pele íntegra e de aspirados de linfonodos e medula óssea foi realizada após a eutanásia dos animais. É importante ressaltar, a possibilidade da utilização de anestesia local, se estes procedimentos fossem realizados in vivo, principalmente em coletas de amostras do focinho e a medula óssea, pois são locais de alta sensibilidade para o cão. Entretanto, sugerimos, a realização de estudos futuros que compare a coleta das amostras biológicas citadas acima, com e sem anestesia local, para que se possa verificar a viabilidade do procedimento em animais vivos.

No presente estudo, embora não tenha sido realizada uma análise sistemática, observamos que em alguns casos o tempo de leitura das lâminas dos aspirados e raspados submetidos a reação de ICQ – estreptavidina-biotina-peroxidase foi bastante curto, inferior ao dispendido para análise citopatológica e

histopatológica. Esta redução do tempo, ocorre pelo contraste obtido no preparado entre o castanho escuro da reação positiva e o fundo azul claro na ICQ. Entretanto, apesar de diminuir o tempo de visualização dos preparados, a ICQ é uma técnica de diagnóstico cara; sua realização é mais demorada e cautelosa em relação à coloração pelo Giemsa e pela HE; e a presença de artefatos na amostra biológica dificulta um pouco o diagnóstico, sendo necessário um patologista experiente para a visualização das formas amastigotas.

Embora os exames histopatológico, citopatológico e imunocitoquímico tenham apresentado especificidade de 100%, a sensibilidade foi moderada mesmo quando combinados, pois, mesmo quando combinados, o parasito foi observado em 68,2% dos casos.

O exame imuno-histoquímico dos fragmentos de pele íntegra do focinho apresentou maior sensibilidade quando comparado com os exames imunocitoquímico e citopatológico de raspados de pele íntegra da orelha, focinho, escápula e de lesões cutâneas e de aspirados de linfonodos e medula óssea e ao exame histopatológico dos fragmentos de pele íntegra da escápula, do focinho e da orelha. Entretanto, em 5 dos 44 cães estudados, não foram observadas formas amastigotas na reação de IHQ, o que sugere que novos estudos, com um maior número de animais comparando a sensibilidade da IHQ e a cultura parasitológica em cães com LVC, devem ser realizados para esclarecer essa questão.

A IHQ mostrou-se mais sensível que a HE e a citopatologia provavelmente porque, pela coloração conferida pela reação, podemos em alguns casos, observar alguns criterios morfológicos na identificação dos parasitos. Nesse contexto, nos casos em que não foi possível diagnosticar o parasito no HE e no Giemsa por este aparecer incompleto nos cortes histológicos e nos *imprints*, na IHQ a marcação da

estrutura parasitária pelo cromógeno possibilita a identificação da sua forma, localização e tamanho. Além disso, a quantidade de artefatos nos fragmentos de pele íntegra é menor quando comparada a presença de artefatos em raspados e aspirados.

De acordo com Kenner et al. (1999), na IHQ o tempo de observação necessário dos preparados para a identificação do parasito e a conclusão do exame é menor que na coloração pela HE. No presente estudo, embora não tenha sido realizada uma análise sistemática, observamos que em alguns casos o tempo de visualização dos cortes histológicos dos fragmentos de pele íntegra da escapula, focinho e orelha submetidos a reação de IHQ – estreptavidina-biotina-peroxidase foi mais curto. Esta redução do tempo, ocorre pelo excelente contraste obtido no preparado entre o castanho escuro da reação positiva e o fundo azul claro na IHQ.

Apesar de reduzir o tempo de visualização dos preparados, a IHQ é uma técnica de diagnóstico dispendiosa e sua realização é mais demorada em relação à coloração pelo Giemsa e HE. Para a IHQ - estreptavidina-biotina-peroxidase é necessário a preparação do soro policlonal hiperimune e dois dias para a realização da reação, enquanto a coloração pelo Giemsa leva 40 minutos e pela HE 5 minutos, sem a utilização de soro.

Uma outra vantagem da IHQ, é a facilidade de manipulação do material a ser submetido ao exame. A amostra de pele íntegra deve ser colocada em material fixador para tecidos, dispensando cuidados especiais como refrigeração (que é necessária para o isolamento em cultura), o que facilita o trabalho de busca ativa de cães, onde o material é coletado e pode demorar horas para chegar ao laboratório. Além disto, há também a possibilidade de se realizarem estudos retrospectivos com material incluído em blocos de parafina. É importante ressaltar que a IHQ é

particularmente útil no diagnóstico dos casos em que existem poucas formas amastigotas no tecido.

A reação de IHQ apresentou maior sensibilidade no diagnóstico da LVC, quando comparada a cultura parasitológica em fragmentos de pele íntegra da orelha. Devido a este fato, sugiro a realização de estudos futuros que comparem a sensibilidade entre a cultura parasitológica e a IHQ em fragmentos de lesões cutâneas e de pele íntegra da escápula, do focinho e da orelha.

A boa sensibilidade da IHQ - estreptavidina-biotina-peroxidase em amostras biológicas obtidas de fragmentos de pele íntegra do focinho indica a utilização desta técnica em amostras desse sítio anatômico no diagnóstico parasitológico da leishmaniose canina, apesar do maior custo, quando comparada à histopatologia e citopatologia.

6. CONCLUSÕES

1. As principais alterações clínicas observadas nos cães infectados são clássicas da LVC;
2. Os aspirados de linfonodos poplíteos são as melhores amostras biológicas para a realização do exame citopatológico para diagnóstico da LVC;
3. Os fragmentos e raspados de lesões cutâneas em cães com LV são excelentes amostras biológicas para a realização dos exames histopatológicos, imunocitoquímicos e imunohistoquímicos para diagnóstico da LVC;
4. O exame histopatológico para confirmação da LVC deve ser realizado

a partir de amostras de pele íntegra do focinho.

5. Os aspirados dos linfonodos poplíteos e raspados de pele íntegra do focinho são amostras mais indicadas para o diagnóstico imunocitoquímico da LVC;

6. O focinho foi o sitio de eleição para o diagnóstico da LVC, pelas diferentes técnicas.

7. A boa sensibilidade da IHQ em amostras biológicas obtidas de fragmentos de pele íntegra do focinho sugere a utilização desta técnica no diagnóstico parasitológico da leishmaniose canina.

8. Em locais que possuem pouco recurso para a realização do diagnóstico parasitológico da LVC, devem ser realizados os exames citopatológico e histopatológico, e caso estes sejam negativos, enviar amostras biológicas destes cães para a realização da técnica de imuno-histoquímica para um Centro de referência de diagnóstico da LVC.

7. 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; 13(5):537-50.

Alencar JE. Contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil: Calazar canino. 1959. Imprensa Oficial, Fortaleza, 342p.

Alencar JE, Cunha RV. Inquérito sobre o calazar no Ceará. Novos resultados. *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 1963; 15:391-403.

Almeida, MA., Jesus EE. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005; (127):227-32.

Almeida, ABPF, Faria RP, Pimentel, MFA, Dahroug MAA, Turbino, NCMRT Franco, VR ,Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso -Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiabá, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(2):156-159.

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

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hgy.* 1995; 53: 251-255.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(1):53-7.

Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13):1269-81.

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; 99(5):481-7.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Santos SO, Chagas-Junior AD, Paixão M, Aguir PHP et al. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: Assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitology.* 2006; 111:251-261.

Berrahal F, Mary C, Rose M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55: 273-277.

Beurey J, Weber M, Mazet J, Delrous JL. [Leg ulcers of rare cause]. *Rev Prat.* 1975; 25(13):997-1012.

Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J.* 2001; 162(2):108-20.

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997; 9(4):439-440.

Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(5):419-24.

Cabrera MA, Paula AA, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, da Silva AV et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003; 45(2):79-83.

Calabrese KS, Cortada VM, Dorval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Souza CS, Silva-Almeida M et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp Parasitol.* 2010; 124(3):253-7. Epub 2009 Oct 23.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Paumgartten MP. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos pela Comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1938; 33: 89-229.

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 Ver Microbiol.* 2007; 5(11):873-82.

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; 169(3):465-7.

Convit J. Protozoan Diseases of the skin. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson Jr B, editors. *Lever's Histopathology of the skin.* 8th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1997.

Costa CH, Pereira HF, Pereira FC, Tavares JP, Araujo MV, Goncalves MJ. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93(5):464.

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; 174(3):636-43.

Costa MMS, Lima WG, Figueiredo MM, Michalick, Tafuri WL, Tafuri WL. Histopathologic and Immunohistochemistry Study and Its Correlation with Facial Skin Lesions Cervical, Mandibular, and Parotid Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*: A Histopathologic and Immunohistochemistry Study and Its Correlation with Facial Skin Lesions. *Vet Pathol.* 2008; 45: 613.

Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A. General classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50(3):296-311.

Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2006; 140:54-60

Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors.* 2009; 26;2 Suppl 1:S1

Da Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, de Andrade HM, Yokoo M, Ribeiro ML et al. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. *Trop Med Parasitol.* 2010; 104(2):137-43.

De Paula A A , Da Silva AV. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *J Parasitol.* 2003; (89):832-6.

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

De S Pinto AG, Schubach TM, Figueiredo FB, Baptista C, Fagundes A, Da S Barros JH, De Paula CC, Toma HK, Madeira MF. Isolation of *Trypanosoma caninum* in domestic dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology.* 2010; 137(11):1653-60.

De Souza, W. J. Use of the indirect immunofluorescence test in the therapeutic follow-up of cutaneous leishmaniasis Americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1982; 77(3): 247-53.

Deane LM, Deane MP, Alencar JE. Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 1955; 7(1):131-41.

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.

Dubey J, Rosypal A, Pierce V, Scheinberg S, Lindsay D. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005; 227(8):1266-1269.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa Ade A et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992; 166(5):1124-32.

Eys G.J.J.M, Schoone GJ, Ligthart GS, Laarman JJ, Terpstra WJ. Detecton of *Leishmania* parasites by DNA in situ hybridization with non-radioactive probes. *Parasitol Res.* 1987; 73:199-202.

Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 49(1):70-74.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *Clín Vet* 2000; 36-44.

Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology.* 2007; 146:235-241.

Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res. Vet. Sci.* 1988; 44(2):194-196.

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

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; 15;83(2):87-97.

Filho GB, Pereira FEL, Pitella JEH, Bambilra EA, Barbosa AJA. Bogliolo. *Patologia Geral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.

Floeter-Winter LM, Shaw JJ. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of moleculat technique. *Res Adv Microbiol* 2004;. 4: 63-79.

Fortani PO. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 1960; 2:195-203.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2006; 30;137(3-4):214-21.

Froes AM, dos Santos CV, Penha-Filho ML, Teixeira MC, Correa Silva TM, Oliveira GG et al. Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies of different animal species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 99(3-4):135-141.

Galimberti, M. Z., Katz G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; (1):217.

Genaro O, Mayrink W, Michalick MSM, Dias M, Costa CA, Melo MN. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1988; 83: 43.

Genaro O, da Costa CA, Williams P, Silva JE, Rocha NM, Lima SL et al. Occurrence of kala-azar in the urban area of Grande Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rer. Soc. Bras. Med. Trop.* 1990; 23(2):121.

Genaro O. Leishmaniose tegumentar americana. In: Neves DP, editor. *Parasitologia humana.* São Paulo: Atheneu; 1995.

Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2008; 84(2):269-77.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J.* 2008; 175(1):45-52.

Gontijo B, Carvalho Mde L. American cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36(1):71-80.

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.

Hayat MA. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy.* New York: Kluwer Academic, 2002.

Heller HM, Swartz MN. Nodular lymphangitis: clinical features, differential diagnosis and management. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 1994; 14:142-158.

Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *J. Cutan. Pathol.* 1999; 26(3):130-136.

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

Kostman JR, DiNubile MJ. Nodular lymphangitis: a distinctive but often unrecognized syndrome. *Ann Intern Med.* 1993; 118(11):883-8.

Lacerda M. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1994; 89(3):489-495.

Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peteres, Killick-Kendrick., editors. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: Academic press; 1987.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33(1):159-74.

Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 2004; 92: 43-53.

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

Lopez MR, Inga M, Gangalaya J, Eschevarria A, Llanos-Cuentas C, Orrego, AJ. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49: 348-356.

Lopes UG, Momen H, Grimaldi G, Jr., Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol.* 1984; 70(1):89-98.

Madeira MF, Uchôa CM, Leal CA, Silva RM, Duarte R, Magalhães CM et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36(5):551-555.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Leal CA, Marzochi MCA Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* Isolated from Healthy Skin Symptomatic and Asymptomatic Dogs Soropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect.* 2004; 8: 440-444.

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; 97(1):73-6

Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA 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.* 2006; 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; 138:366-370.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.* 2009; 87(2):260-2.

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.

Marcondes M, Biondo AW, Gomes AA, Silva AR, Vieira RF, Camacho AA et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol.* 2011; 10;175(1-2):15-9.

Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I, Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3147-3153.

Marzochi MC, Coutinho SG, Souza WJ, Toledo LM, Grimaldi Junior G, Momen H et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1985; 80(3):349-357.

Marzochi MAC. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. *Bras Med.* 1992; 63(82-104).

Marzochi MAC, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública* 1994; 10:359-375.

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

Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, Mouta-Confort E et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 2(5):570-80.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999; 119 (3):237-46.

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; 20;147(1-2):67-76.

Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Ministério da Saúde SdVeS, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar americana. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

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

Montenegro MR, Franco M. Patologia processos gerais. 4ª ed. Rio de Janeiro, São Paulo, Riberão Preto e Belo Horizonte: Atheneu; 2004.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol. 2007; 30;145(3-4):245-52

Muller K, Bischof S, Sommer F, Lohoff M, Solbach W, Laskay T. Differential production of macrophage inflammatory protein 1gamma (MIP-1gamma), lymphotactin, and MIP-2 by CD4(+) Th subsets polarized in vitro and in vivo. Infect. Immun. 2003; 71(11):6178-6183.

Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Pena T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. Vet. Parasitol. 2005; 133(1):37-47.

Neves DP. Parasitologia dinâmica. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003.

Noli C. Leishmaniosis canina. Waltham Focus 1999;9:15-24.

Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinezzi RO, Savani ES, Ishikawa E et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34(3):299-300.

Oliveira LS, Julião FS, Souza VMM, Freitas DS, Souza BMPS, Paule BJA et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. Ciênc Am Bras. 2005; 6:41-47.

Okamoto, T. Avaliação Clínica e anatomopatológica das leishmanioses caninas no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado (Mestrado em medicina veterinária coletiva) – Universidade Federal Fluminense, 2006.

Ordeix L, Solano-Galeno L, Fondevila D, Ferrer L, Fondat A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. Vet. Dermatol. 2005; 16:187-191.

Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernández MM et al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Vet. Parasitol.* 2002; 110(1-2):1-10.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-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; 65(5):510-7.

Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJ, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55(1):39-44.

Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC et al. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop.* 1998; 69(1):75-83.

Perine P, Totten P, Widy-Wensky R. Evaluation of DNA-hybridization method for detection of African and Asian strains of *Neisseria gonorrhoeae* in men with urethritis. *J Infect Dis.* 1985; 152:59-63.

Petersen C.A., Leishmaniasis, an Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States Topics. *Companion Animal Medicine* Volume 24, Number 4, November 2009.

Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MC, Nunes MP, Grimaldi Júnior G. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania Braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* 1988a; 38(1):52-58.

Pirmez C, Marzochi MC, Coutinho SG. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1988b; 83(2):145-151.

Pocai EA, Frozza L, Headley SA, Graça DL. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural.* 1998; 28: 501-505.

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Carallapa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2931-2935.

Reed SG, Shreffler WG, Burns JM, Jr., Scott JM, Orge Mda G, Ghalib HW et al. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990; 43(6):632-639.

Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 2010; 15(10):p.195-205.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 2005; 42:405-426.

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 61(4):530-41.

Reithinger R, Canales Espinoza J, Llanos-Cuentas A, Davies CR. Domestic dog ownership: a risk factor for human infection with *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97(2):141-5.

Rey L. *Parasitologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239:487-491.

Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL. Parasite Immunol. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. 2008; 30(10):515-24.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clinica Veterinária.* 1997; (2):24-28.

Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin. Dermatol.* 1999; 17(3):291-296.

Santos IB, Schubach TMP, Paes-Leme LR, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA et al. Sporotrichosis—The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2007; 143(1):1-6;

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(1):82-6.

Serra CM, Leal CA, Figueiredo FB, Schubach TMP, Duarte R, Uchôa CMA et al. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Águias (Serra da Tiririca), Marica, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2003;19: 1877-1880.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP, Mattos MS et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2001; 96(7):987-996.

Schubach T, Schubach A, Okamoto T, Barros M, Figueiredo F, Cuzzi T et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med. Mycol.* 2006; 44(1):87-92.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 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; 101(5):577-579.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol.* 2011 Feb 3.

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; 96(3):285-91.

Silva FL, Tafuri WL, Oliveira MR, Tafuri WL. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A case report. *Arq Bras. Med. Vet. Zoo.* 2002; 54(4):340-344.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol.* 2004; 130(1):7-12.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis: A review based on 95 in Netherlands. *Vet Q.* 1988; 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; 496-504.

Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(8):1181-2.

Tafuri WL, Tafuri WL, Barbosa AJ, Michalick MS, Genaro O, França-Silva JC et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rer. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 1996; 38(2):81-89.

Tafuri WL, Santos Rde L, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods.* 2004; 292(1-2):17-23.

Tasca KI, Buzetti WA, Tenorio Mda S, Paulan SC, Lima FL, de Queiroz NM et al. Parasitological, immunohistochemical and histopathological study for *Leishmania*

chagasi detection in splenic tissues of dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009;18(1):27-33.

Taylor CR. Immunoperoxidase techniques. *Arch. Pathol. Lab. Med* 1978;102:113-121.

Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A et al. Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81(6) 994–1003.

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009; 14;164(2-4):118-23.

Verçosa BL, Lemos CM, Mendonça IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res.* 2008; 6;4:45.

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL. Cross-Reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1996; 38: 177-185.

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

World Health Organization (WHO). Health topics: Leishmaniasis. <http://www.who.int/en> (acessado em 26/fev/2011).

Xavier SC, Andrade HM, Hadad S, Chiarelli I, Lima WG, Michalick MSM et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res.* 2006; 2(17):1746-1756.