

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Leishmaniose Visceral – Revisão da Literatura

Marianne Rachel Domiciano Dantas Martins

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

Leishmaniose Visceral – Revisão da Literatura

**Marianne Rachel Domiciano Dantas Martins
Graduanda**

**Prof. Dra. Marcia Almeida de Melo
Orientadora**

**Patos
Outubro de 2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Marianne Rachel Domiciano Dantas Martins
Graduanda**

**Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Medico Veterinário.**

ENTREGUE EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Assinatura

Prof. Dra. Marcia Almeida de Melo

Nota

Assinatura

Prof. Dr. Edísio Oliveira de Azevêdo

Nota

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevêdo

Nota

Hélton e Terezinha,

Dedico esta vitória a vocês com a mais profunda admiração e respeito. Acreditaram em mim, nos meus sonhos, abriram a porta do meu futuro e iluminaram meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo! Vocês são o meu maior orgulho, o meu amor maior. Essa conquista é pra vocês.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Sinto-me feliz nesse momento por agradecer as pessoas que mais amo nessa vida, que fizeram e fazem parte do que sou hoje.

Agradeço a **Deus** por ter me dado força, coragem, perseverança e muita fé para acreditar em mim e na realização do meu sonho dia após dia. Por não ter me deixado desistir diante das dificuldades. Por me acalmar nas noites em que adormecia chorando e acordava aliviada sabendo que de alguma forma eu não estava sozinha. Obrigada meu Deus por nunca desistir de mim.

**“E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou...
Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir”**

Agradeço aos meus pais, **Hélton e Terezinha**, por me apoiarem, acreditarem em mim, e muitas vezes terem sacrificado seus sonhos a favor do meu, trabalhando dobrado para me dar o melhor estudo e tudo que tenho hoje. Se não fosse por vocês não estaria aqui. Vocês são meu maior exemplo de superação, dedicação e amor. Agradeço a minha irmã **Sibelle** que, apesar de tão diferente, é meu exemplo de determinação, dignidade, o meu orgulho. Ao meu irmão **Hélder**, que sempre será alvo da minha proteção e cuidado. Por vocês, sinto o amor mais puro que existe.

**“Não existe amor maior que a coragem de dizer
que um dia se preciso for dou minha vida por
vocês”**

Aos meus avós maternos **Anair e José Domingos** e aos meus avós paternos **Zuca e Titila** por me ensinarem como ser correta, como crescer com esforço sem precisar perder a dignidade. Nada é capaz de medir a admiração e o orgulho que tenho de ser neta de pessoas tão maravilhosas, que não medem esforços para ver a família bem e feliz. Aos meus tios, tias, primos, sobrinhos, que não dá nem pra citar os nomes por a família ser tão grande. Agradeço por ter a oportunidade de sempre ter a presença de vocês em minha vida. Minha família é o bem mais precioso que tenho, é a minha alegria constante. Com defeitos e qualidades, vocês são tudo que eu mais amo nessa vida. Em especial agradeço a titia **Hélvia**, por todo amor dedicado a mim. Obrigada por não conseguir esconder a admiração

que tem por nós. A tia **Lúcia**, por cada palavra amiga, apoio, cada abraço e por ter me dado mais três irmãs, Janiele, Jêssica e Jamille. Além de tia, madrinha, é um anjo em minha vida.

“Nem mesmo o céu, nem as estrelas, nem mesmo o mar e o infinito não é maior que o meu amor, nem mais bonito...Como é grande o meu amor por vocês”

A vocês, **Jackson Moraes** e **João Ricardo** que sempre serão lembranças maravilhosas da minha graduação. A **Meire Maria**, por ter ido comigo do início ao fim. Te agradeço por tudo minha amiga. E em especial a **Werona Barbosa**, que foi alguém que ganhei quando mais perdia. Foi um anjo colocado em minha vida. Amo você e tenho certeza da nossa vitória.

Agradeço a minha orientadora **Marcia Melo** pela orientação, por ter acreditado no meu trabalho e a todos meus professores pelo conhecimento adquirido, em especial a **Pedro Isidro** e **Gildenor Xavier**. Admiro muito vocês como pessoa, como profissionais. A todos os funcionários da universidade, do que abria a porta e ligava o ar condicionado ao que nos levava para as aulas práticas. Com um carinho diferenciado, a secretária **Tereza** por dedicar sua vida pra nos ajudar.

A três pessoas que não tenho mais contato, mas, foram responsáveis por alegrar meus dias mais tristes em João Pessoa: **Cecília**, **Carol** e **Diógenes**. Sempre me lembro de vocês.

E por fim aos meus bons e poucos amigos verdadeiros por me aceitarem como sou, por acreditarem em mim e no meu sucesso. A **Yohana Rosaly**, que tem um coração do tamanho do mundo e só pensa em ajudar, que nunca me negou nada e sempre esteve comigo. Continue sendo verdadeira, me orgulho muito de você. A **Débora Brasileiro**, que é saudade constante em minha vida. Mesmo de longe sempre vou torcer pela tua felicidade. Você merece muito ser feliz, e não tenho dúvidas que será. A **Edinaldo Júnior**, por ser meu amigo mais lindo, meu amigo de infância que se orgulha de mim. Eu sempre serei sua “Maricota”. Obrigada por acreditar que sou capaz. A **Maria Helena** por cada minuto dedicado a me ajudar. Se não fosse por você tudo seria bem pior. Nada é capaz de descrever minha gratidão por você e sua família. A **Eros Araújo** que, enquanto presente, acreditou nos meus objetivos e não me deixou desistir, sempre me apoiando e mostrando as melhores saídas diante das dificuldades. Por fim, agradeço a todas as pessoas que

passaram por minha vida e deixaram algo positivo. Não dá pra agradecer a todos, mas os que são verdadeiros comigo sabem o tamanho da minha gratidão. Com certeza esqueci vários, me perdoem.

E sem esquecer, agradeço aos animais que com simples olhares alegam minha vida, transformam meus dias ruins em perfeitos. Olhares de sinceridade, fidelidade, compaixão, um carinho verdadeiro por você estar ao lado dele. Obrigada por proteger e cuidar dessas criaturas. Obrigada por ser uma Médica Veterinária!

Vocês fizeram parte da minha vitória!

**“Quando Deus constrói um laço o amor
jamais se acaba. Eu te trago no meu peito, por
amor e por direito mesmo que vocês jamais saibam
o preço desse amor”.**

OBRIGADA!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Definição.....	14
2.2. Epidemiologia.....	14
2.2.1. Distribuição.....	14
2.3. Etiologia.....	18
2.3.1. Classificação Taxonômica.....	18
2.3.2. Morfologia e Ciclo Biológico do Parasito.....	19
2.3.3. Vetor e Transmissão.....	20
2.3.4. Reservatório.....	23
2.4. Imunopatogenia.....	23
2.5. Sinais Clínicos.....	25
2.6. Diagnóstico.....	27
2.6.1. Diagnóstico Clínico.....	27
2.6.2. Diagnóstico Laboratorial.....	28
2.6.2.1. Método Parasitológico.....	28
2.6.2.2. Método Sorológico.....	29
2.6.2.3. Método Molecular.....	32
2.6.2.3.1. Reação em Cadeia Polimerase.....	32
2.7. Tratamento.....	33
2.8. Controle.....	35
2.9. Prevenção.....	36
2.9.1. Vacinas para Leishmanose Canina em Desenvolvimento.....	39
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratificação das áreas de Leishmaniose Visceral de acordo com o risco de transmissão.....	15
Figura 2 - Forma promastigota e amastigota.....	19
Figura 3 - Ciclo de transmissão.....	20
Figura 4 - <i>Lutzomyia longipalpis</i>	21
Figura 5 - Diferentes padrões de lesões cutâneas.....	26
Figura 6 - Diagrama para orientação do diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.....	33

RESUMO

MARTINS, MARIANNE RACHEL DOMICIANO DANTAS. Leishmaniose Visceral – Revisão de Literatura. 2012. 47 p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Patos, 2012.

A leishmaniose visceral canina é uma doença infecciosa, crônica, considerada uma importante zoonose em nível mundial, potencialmente fatal para os seres humanos e cães, que são considerados o principal reservatório de infecção para os seres humanos. É causada por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania chagasi* a espécie encontrada no Brasil. De distribuição cosmopolita, é endêmica em mais de 70 países do mundo, sendo apontada como doença reemergente, caracterizada por um nítido processo de transição epidemiológica. Manifesta-se por um amplo espectro de sinais clínicos e não há consenso científico suficiente sobre o manejo desta doença. Nos últimos anos, grandes descobertas científicas têm sido feitas no diagnóstico, tratamento e prevenção da leishmaniose. As estratégias de controle ainda são pouco eficazes e estão centradas no diagnóstico, na redução da população de flebotômíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde. Em virtude das características epidemiológicas, ao longo dos anos a aplicação, muitas vezes apenas parcial destas ações não proporcionou a redução da incidência da Leishmaniose Visceral no país.

Palavras-chave: Cão, leishmaniose, epidemiologia, diagnóstico, estratégias de controle.

ABSTRACT

MARTINS, MARIANNE RACHEL DOMICIANO DANTAS. Visceral leishmaniasis - Literature Review. 2012. 47 p. Monograph (Completion of Veterinary Medicine) – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Patos, 2012.

Canine visceral leishmaniasis is a chronic infectious disease, considered a major zoonosis worldwide, potentially fatal for humans and dogs, which are considered the main reservoir of infection for humans. It is caused by an intracellular protozoan of the genus *Leishmania*, and *Leishmania chagasi* species found in Brazil. Cosmopolitan distribution, is endemic in more than 70 countries worldwide, being appointed as reemerging disease, characterized by a clear process of epidemiological transition.

It is manifested by a wide spectrum of clinical signs and there is sufficient scientific consensus on the management of this disease. In recent years, scientific breakthroughs have been made in the diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. Control strategies are still weak and are focused on diagnosis, reducing the population of sandflies, reservoirs and elimination of health education activities. Given the epidemiological characteristics, over the years the application, often only partially provided these actions do not reduce the incidence of VL in the country.

KEY-WORDS: Dog, leishmaniasis, epidemiology, diagnosis, control strategies.

1 INTRODUÇÃO

A emergência da leishmaniose como um problema de saúde pública tem ocorrido devido a vários fatores, dentre eles, principalmente, estão as alterações ecológicas e demográficas decorrentes da destruição de florestas primárias, acompanhadas pelo rápido crescimento populacional e assentamentos de comunidades na periferia de cidades, o que leva a uma mudança na ecologia dos flebotomíneos vetores. Do ponto de vista epidemiológico a leishmaniose canina é considerada mais importante do que a humana, devido ao fato dos casos caninos precederem o humano, além dos cães serem um importante reservatório.

O diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública pela variedade de sinais clínicos semelhantes a outras doenças infecciosas, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste de diagnóstico 100% específico e sensível. O diagnóstico clínico é um problema para o veterinário devido ao amplo espectro de sinais clínicos, podendo ser aparentemente saudáveis e ainda assim transmitirem o parasito para o inseto vetor. Sendo assim, há uma busca constante por testes mais específicos, possibilitando maior segurança no controle.

As medidas de controle da leishmaniose visceral (LV), atualmente adotada pelos órgãos governamentais, preconizam o tratamento das pessoas doentes, o emprego de inseticidas nas residências para eliminação do vetor e a eutanásia de cães infectados. Porém, sabe-se que muitos cães que tem contato com o parasita não apresentam sinais clínicos da doença. Entretanto, todos esses animais são eutanasiados quando o diagnóstico da infecção é estabelecido. Por outro lado, sabe-se, também, que somente parte dos animais infectados, efetivamente, transmite a doença; que o parasitismo da pele de cães não ocorre na mesma intensidade em todas as fases da infecção, pois a infecção do vetor é mais provável de ocorrer quando ele se alimenta em cães em um estágio mais avançado da doença. Nesse contexto, o controle da LVC é de suma importância para a redução de casos humanos, mas esse controle deve ser feito de forma mais criteriosa, de modo a levar em consideração o cão como um fator de risco real para a transmissão da LV para o homem e não adotar, simplesmente, a eliminação indiscriminada de animais, muitos provavelmente sem potencial de transmissão, como forma de controle, até mesmo porque em muitos estudos a exterminação pura e simples de cães não tem reduzido a incidência da enfermidade.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo fazer uma revisão sobre os principais aspectos desta doença e levantar discussões sobre pontos críticos como as medidas de controle utilizadas, e a não permissão do tratamento canino no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição

A leishmaniose visceral é uma importante zoonose com distribuição mundial, emergente em diferentes áreas urbanas brasileiras. Atinge crianças, adultos jovens ou pessoas imunodeprimidas e quando não tratada pode apresentar letalidade de 95% (ALVES & BEVILACQUA, 2004; COSTA et al., 2007).

Segundo Paula et al. (2009), no Brasil, esta doença é um grande desafio à saúde pública principalmente pelo potencial endêmico que vem assumindo, sendo considerada importante pela morbimortalidade a ela associada e em virtude da sua rápida expansão geográfica registrada nas últimas décadas (OLIVEIRA et al., 2005).

2.2 Epidemiologia

2.2.1 Distribuição Geográfica

O estudo da distribuição geográfica tem sido ferramenta utilizada em inquéritos epidemiológicos relacionados à LV, permitindo identificar fatores sócio-econômicos e ambientais associados, bem como descrever a difusão das doenças. O primeiro relato de LV no Brasil foi feito em 1934 e somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará. Em meados dos anos 80 contatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica. A doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; GONTIJO & MELO, 2004).

A leishmaniose visceral encontra-se atualmente entre as sete endemias consideradas prioritárias no mundo, com distribuição cosmopolita, estando presente na África, Ásia, América do Norte e América do Sul (GÁLLEGO, 2004; MICHALSKY et al., 2011). Tem sido apontada como doença reemergente, caracterizada por um nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

Essa doença é endêmica em 88 países, relatados a cada ano cerca de 500.000 novos casos humanos, com aproximadamente 90% dos casos mundialmente notificados ocorrendo em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Na América Latina tem sido descrita em pelo menos 12 países, sendo cerca de 97% dos casos humanos descritos no continente americano procedentes do Brasil, estando presente em 19 dos 27 estados brasileiros (BENITES et al., 2011; MICHALSKY et al., 2011; MESTRE et al., 2011) (figura 1).

Em muitas regiões brasileiras, a leishmaniose visceral (LV) canina e humana ocorre endemicamente. O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos (GONTIJO & MELO, 2004; ALMEIDA et al., 2010). Isso se deve a um processo de urbanização associada a alterações no comportamento do vetor de transmissão, degradação ambiental, e a migração de populações caninas e humanas para grandes centros urbanos (PRADO et al., 2011).

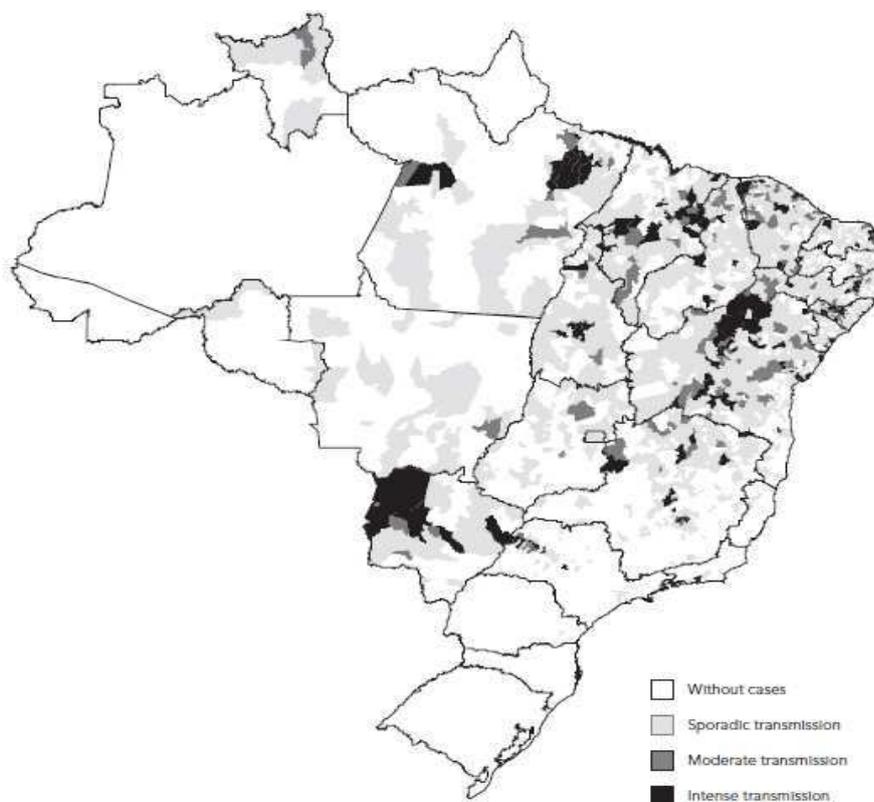


Figura 1- Estratificação das áreas de Leishmaniose Visceral de acordo com o risco de transmissão. Fonte: Caderno de Saúde Pública (2008)

Segundo Costa et al. (2007) o vetor se adapta facilmente às condições peridomésticas de áreas depauperadas e por outro lado cães abandonados vagando na periferia da cidade podem se infectar entrando em contato direto com reservatórios selvagens e, ao retornarem para o interior da cidade, servem como amplificadores da infecção para cães e humanos.

De acordo com Paula et al. (2009), os movimentos migratórios do homem com seus animais associado às alterações ambientais são fatores determinantes na disseminação da doença, uma vez que estes animais, muitas vezes, são trazidos infectados da região de origem, contribuindo para a infecção dos flebotomíneos presentes em áreas de desmatamento recente e em zonas peri-urbanas. O aumento da densidade do vetor, o convívio muito próximo do homem com o reservatório doméstico, o desmatamento acentuado e a constante mobilização de pessoas constituem os principais determinantes dos níveis epidêmicos da LV nos grandes centros urbanos (MESTRE & FONTES, 2007).

O processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e destruição ambiental, fatores que também podem ter influenciado na emergência da doença no meio urbano. Pobreza, desnutrição e a alta densidade de flebotomíneos, tanto no intradomicílio como no peridomicílio, estão associadas à elevada presença de animais domésticos, péssimas condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico em áreas de transmissão da LV (COSTA et al., 2007; MESTRE & FONTES, 2007).

Em um estudo realizado por Julião et al. (2007), a presença de galinhas no peridomicílio não foi significativa, embora alguns autores relatem seu envolvimento na epidemiologia da LV, como o estudo realizado por Drumond & Costa (2011) que observou que as aves domésticas devem ser vistas como fatores de risco na presença de vetores e hospedeiros, provavelmente por representarem uma fonte de alimentação, não só para o vetor, como para alguns animais silvestres.

De acordo com Gontijo & Melo (2004) e Drumond & Costa (2011) nos últimos cinco anos, ocorreram em média 3.500 casos humanos novos, sendo a maioria na região Nordeste do país. A partir dos anos 90, os estados Pará e Tocantins, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais e São Paulo passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil. O Estado da Bahia registrou no período de 1984-2002 uma incidência média de 790 casos por mês, sendo um dos estados mais atingidos pela doença, observando que a pobreza e desnutrição associadas às péssimas condições sanitárias são fatores determinantes para a ocorrência da doença (JULIÃO et al., 2007; MESTRE & FONTES,

2007). Este quadro é bem ilustrado pelo município matogrossense de Várzea Grande, cujo surgimento de núcleos residenciais nas periferias urbanas decorrentes da imigração da população de baixa renda, proporciona condições favoráveis para a transmissão da LV. Os primeiros casos de LV em Cuiabá foram notificados em 2005, e 5 dos 8 casos confirmados viviam em áreas urbanas (MESTRE & FONTES, 2007; MESTRE et al., 2011).

No Piauí, sabe-se da ocorrência da LV desde 1934. De 1971 a 1979, a LV apareceu como uma doença endêmica e a maioria dos casos relatados foram em Teresina. Uma epidemia tem sido observada no Piauí desde 1980, coincidindo com o crescimento da população que aumentou mais de 400%. No Estado de Pernambuco, a LV tem sido considerada endêmica, no entanto, alguns municípios, como Recife, são considerados livres de casos autóctones (DRUMOND & COSTA, 2011; DANTAS-TORRES et al., 2005).

Em um estudo realizado por Dantas-Torres & Brandão-Filho (2006) no Estado de Pernambuco, foi observado que houve uma acentuada expansão geográfica da LV, com surgimento de novos focos e persistência das antigas áreas de ocorrência da doença. Cesse (1999) realizou um estudo no município de Petrolina, que apresenta uma das maiores incidências de calazar no Estado, e verificou que o crescimento populacional associado à forma como a sociedade se organiza favorece a ocorrência de casos autóctones com expansão da doença. Esta expansão da cidade invadindo a mata resulta no estabelecimento nas áreas periurbanas de condições favoráveis à domiciliação do vetor do calazar, o flebótomo.

A LV é endêmica no município de Montes Claros, Estado de Minas Gerais, onde a doença constitui um sério problema de saúde pública (PRADO et al., 2011). Segundo Michalsky et al. (2011), o crescimento não planejado da área urbana de Janaúba, assim como ocorrido em diversas cidades do Brasil, em outros municípios do norte de Minas Gerais tem papel fundamental no desenvolvimento de agravos da saúde. Este crescimento desordenado implica em uma série de transformações do meio ambiente e possibilita a instalação e expansão das leishmanioses, principalmente da LV, no município. A presença do vetor na periferia de cidades que registraram grande número de casos de LV humana e elevadas taxas de infecção canina confirmam a transmissão urbana da endemia em Mato Grosso (MESTRE & FONTES, 2007).

2.3 Etiologia

O agente etiológico da leishmaniose visceral é um protozoário da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (PRADO et al., 2011; FEITOSA et al. 2000). As espécies parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral são divididas em três gêneros: *Leishmania chagasi* responsável pela forma clínica da leishmaniose visceral nas Américas Central e do Sul, *Leishmania donovani* causadores da doença na Ásia e África e *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África (ALMEIDA et al., 2005; PRADO et al., 2011).

Existem várias hipóteses relacionadas com a origem de *L. chagasi*, e, propõem que a LV na América pudesse ser causada por ambos parasitas *L.chagasi* e *L.infantum*. A controvérsia começou um ano após a descrição de *L. chagasi*, quando se concluiu que o agente da LV nas Américas é idêntica à *L. infantum*. No final de 1990, um novo estudo usando métodos como amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), análise de sequência de DNA da protease de superfície (gp63) e hibridização com a sonda de DNA Lmet9, sobre isolados de diferentes origens geográficas, não foi capaz de distinguir *L. chagasi* de *L. infantum*. Por outro lado, com base em pequenas diferenças fenotípicas e genotípicas, alguns autores separam *L. infantum* e *L. chagasi* em duas espécies. Outros também acreditam que estes parasitas são diferentes, mas decidiram separá-los em duas subespécies. Neste caso, os nomes *L. infantum infantum* e *L. i. chagasi* foram usados (POUBEL, 2010; DANTAS-TORRES, 2006).

2.3.1 Classificação Taxonômica

A espécie *Leishmania chagasi* é classificada taxonomicamente em:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Subfilo: Mastigophora

Classe: Zoomastigophora

Ordem: Kinetoplastida

Subordem: Trypanosomatina

Família: Trypanosomatidae

Gênero: Leishmania

Espécie: *Leishmania chagasi*

2.3.2 Morfologia e Ciclo Biológico do Parasito

Segundo Rath et al. (2003) foi verificado que a *Leishmania* se desenvolve no tubo intestinal do hospedeiro invertebrado, na forma promastigota. A forma infectante é a promastigota metacíclica e essa, uma vez introduzida nos mamíferos através da picada (repasto sanguíneo), é rapidamente fagocitada por células de defesa, especialmente os macrófagos, e dentro de um vacúolo transforma-se na forma amastigota (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). As leishmanias sob a forma amastigota são estruturas arredondadas ou ovaladas sem flagelos, com núcleo grande, oval e excêntrico, que parasitam o hospedeiro vertebrado em seu sistema fagocítico mononuclear, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos onde vivem e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros macrófagos gerando um ciclo vicioso. Junto ao núcleo encontra-se uma estrutura conhecida como cinetoplasto (extensão da mitocôndria), rica em DNA mitocondrial, o kDNA.

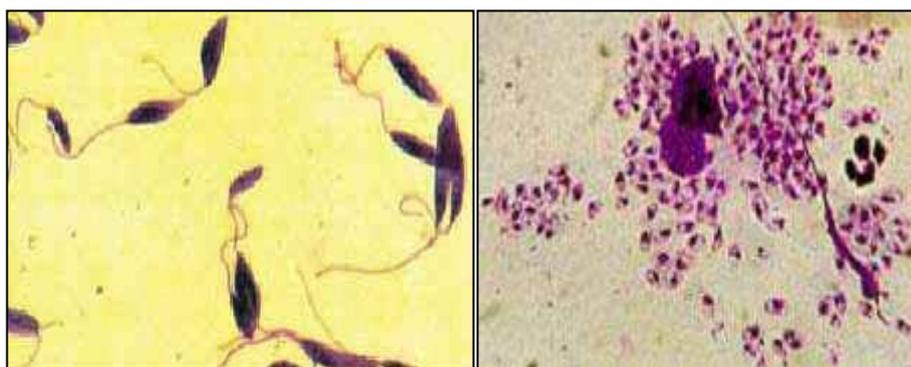


Figura 2- Forma promastigota e amastigota. Fonte: www.fcfrp.usp.br

Os insetos, ao picarem o homem ou animais infectados, adquirem o parasito através da ingestão de amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo. No tubo digestivo dos insetos, as leishmanias se transformam em formas alongadas, dotadas de um flagelo com cinetoplasto localizado na extremidade do flagelo, núcleo central, formado de

feixes paralelos de microtúbulos, envoltos em uma bainha citoplasmática. Essa forma é chamada de promastigota procíclica (Figura 2). Multiplicam-se intensamente por divisão binária no tubo digestivo do inseto. As formas procíclicas diferenciam-se para formas infectivas metacíclicas e migram para a proboscíde do inseto após 4 a 5 dias. Ao picarem novos hospedeiros, os promastigotas são regurgitados e, por esse mecanismo, infectam novos vertebrados (BASANO & CAMARGO, 2004; CAMARGO & BARCINSKI, 2003) (Figura 3).

De acordo com Camargo & Barcinski (2003) algumas leishmanias proliferam-se apenas em uma determinada espécie de flebótomo enquanto outras são promíscuas, adotando um largo espectro de vetores.

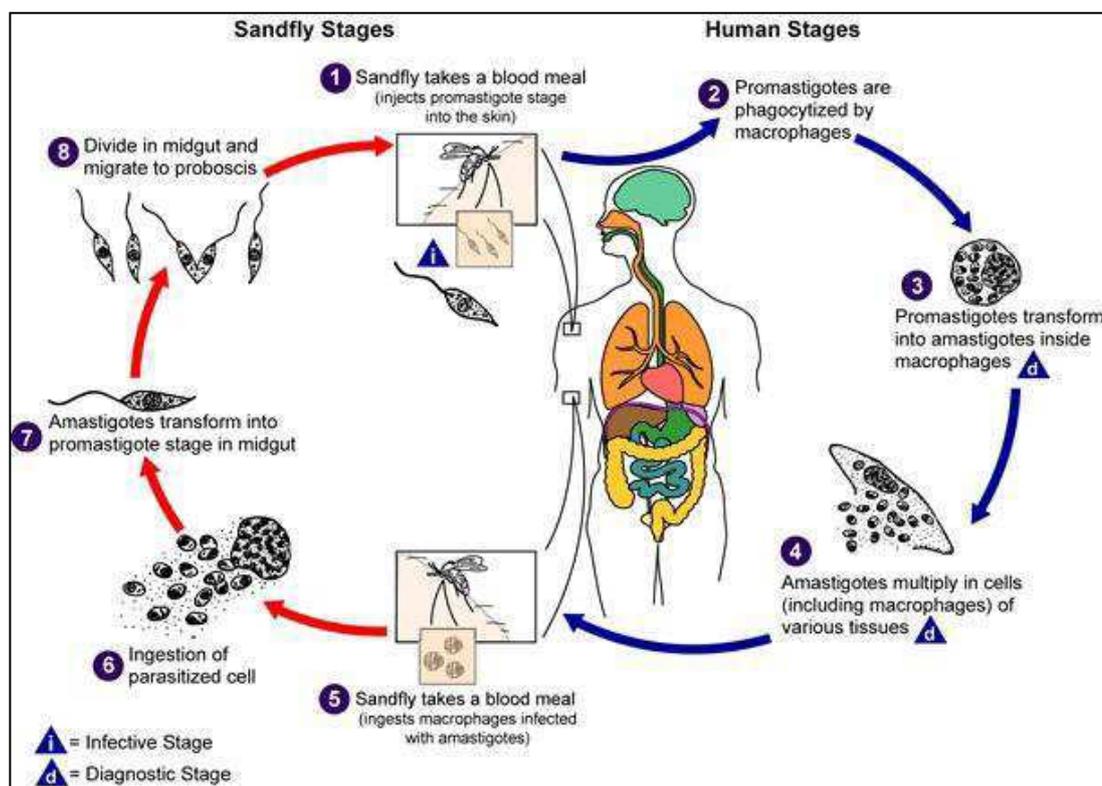


Figura 3 - Ciclo de transmissão. Fonte: www.caminhosdabio.wordpress.com

2.3.4 Vetor e Transmissão

Nas Américas, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania infantum chagasi* (ALMEIDA et al., 2010) e transmitida ao homem através da picada de fêmeas de insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae, tendo como principal vetor *Lutzomyia*

longipalpis (MICHALSKY et al., 2011; MONTEIRO et al., 2005). Os flebotomos são pequenos mosquitos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Voam aos saltos e mantêm as asas eretas mesmo em repouso, ao contrário de outros dípteros, o que facilita sua identificação. Apenas as fêmeas são hematófagas. Machos se alimentam dos sucos de flores e plantas (CAMARGO & BARCINSKI, 2003) (Figura 4).



Figura 4 - *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: lemur.amu.edu.pl

Apesar de no Brasil a transmissão ser atribuída principalmente a *Lutzomyia longipalpis*, outras espécies de flebotomíneos também são consideradas potenciais transmissores da doença. De acordo com Oliveira et al. (2010) no Pará, *Lutzomyia antunesi* pode ser considerado um vetor alternativo da leishmaniose visceral. Em Mato Grosso do Sul, *Lutzomyia cruzi* é a espécie predominante e simpátrica a *Lutzomyia forattinii* (OLIVEIRA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2005). De acordo com Rath et al. (2003), os dípteros tem atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e protegidos do vento, encontrados em tocas de animais silvestres e ocos de bambu. Em estudo realizado em Teresina (DRUMOND & COSTA, 2011), o maior percentual de insetos infectados com *Leishmania* sp foi encontrado quatro meses após o período de chuvas mais pesadas, sugerindo que fatores ambientais podem prever a abundância de flebotomíneos e o seu nível de infecção natural.

De acordo com Barata et al. (2005) a espécie *L. longipalpis* tem demonstrado uma grande capacidade de se adaptar em vários ambientes, aumentando a sua densidade dentro e ao redor de habitações humanas facilitando a transmissão da doença. Segundo Monteiro et al. (2005), esta espécie está bem adaptada ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se de

uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, entre aves, homem e outros animais silvestres ou domésticos.

Os flebótomos infectam-se ao picar o animal portador da doença, aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecidos e podem, assim, transmitir a doença ao homem (RATH et al., 2003). Segundo Benites et al. (2011) usualmente, a infecção ocorre entre um hospedeiro invertebrado para um hospedeiro vertebrado, entretanto, a transmissão na ausência do vetor já é conhecida. Além disso, casos autóctones de LV têm sido relatados nos Estados Unidos e no Reino Unido, onde não há adequado vetor biológico. Apesar da ocorrência de transmissão vertical em seres humanos, um estudo recente indica que esta via de transmissão não é provável de ocorrer em cachorros (DINIZ et al., 2005).

Um caso de transmissão direta através de transfusão sanguínea já foi documentado em um cão. Recentemente, foi comprovado que a *Leishmania chagasi* pode ser sexualmente transmissível de cães machos naturalmente infectados para fêmeas susceptíveis na ausência do vetor biológico (BENITES et al., 2011). Macerado de carrapatos e pulgas provenientes de cães positivos foi capaz de infectar hamsters por via oral e inoculação intraperitoneal. Apesar da possibilidade da infecção experimental, o fato não comprova a viabilidade destes ectoparasitos como vetores uma vez que formas promastigotas não foram evidenciadas nos esfregados de sangue do macerado (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO & LINARDI, 2007). Recentemente, na Alemanha, um caso de transmissão congênita foi relatado, embora a infecção provavelmente tenha sido no canal de parto e não através da placenta. No entanto, *Leishmania* sp. foi encontrado na placenta de cães que tiveram aborto espontâneo. A justificativa para a suspeita de transmissão vertical de *Leishmania* reside no fato de que existem vários parasitas capazes de atravessar a barreira da placenta em cães, incluindo os metazoários *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Dirofilaria* e os protozoários *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis*. A possibilidade de transmissão transplacentária baseia-se na circulação dos parasitas no interior de macrófagos. O sangue da placenta está em estreita proximidade com a circulação materna, e os parasitas podem passar para a circulação fetal (ANDRADE et al., 2002; NAUCKE & LORENTZ, 2012). Um estudo realizado por Andrade et al. (2002) analisou 63 filhotes de 18 adultos que foram naturalmente infectados e não encontrou nenhum resultado positivo indicando que se a

transmissão vertical ocorre, é muito raro, não contribuindo significativamente para a disseminação da doença.

É importante ressaltar que cães infectados naturalmente, muitas vezes desenvolvem lesões genitais associados com a presença de amastigotas, principalmente no epidídimo, prepúcio e glândula. Além disso, estas lesões genitais são associadas com o derramamento de *Leishmania* no sêmen de uma grande proporção de cães infectados. Por outro lado, nenhuma lesão específica foi observada no trato genital de cadelas naturalmente infectadas, apesar de estudos recentes de transmissão vertical nas cadelas gestantes. Estas observações suportam a VL hipótese de que é sexualmente transmissível (DINIZ et al., 2005; SILVA et al., 2009).

2.3.5 Reservatório

O cão (*Canis lupus familiaris*) é considerado o reservatório mais importante da LV, sendo responsável pela manutenção do agente na área urbana (MESTRE & FONTES, 2007; ALMEIDA et al., 2010; PAULA et al., 2009) e embora a doença possa manifestar-se de maneira bastante variável, o parasitismo da pele constitui uma das características mais importantes, fazendo desse animal um elo no ciclo epidemiológico (PAULA et al., 2009). Ainda de acordo com Almeida et al. (2010) os cães infectados, especialmente os assintomáticos, são potenciais fontes de infecção para o vetor.

A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.4 Imunopatogenia

A Leishmaniose Canina pode ser considerada como uma doença imunomediada devido à capacidade do parasito de modificar o sistema imunológico do hospedeiro, causando diminuição da resposta imune celular ao antígeno da *leishmania*, caracterizada

por promover hiperplasia de células do sistema fagocítico mononuclear (BACELLAR & CARVALHO, 2005; LARANGEIRA, 2008; LOPES & MOOJEN, 2008).

Os linfócitos T desempenham papel fundamental na modulação da Leishmaniose Visceral. As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção atuando como células apresentadoras de antígenos, e estimulando os linfócitos (CD4+) T helper (Th) tipo 1 ou Th tipo 2 (FEITOSA et al., 2000; BACELLAR & CARVALHO, 2005) e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade enzimática e produção de óxido nítrico. Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 e MIP-1, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (LARANGEIRA, 2008; LOPES & MOOJEN, 2008). Após a inoculação do parasito na pele, as formas flageladas – promastigotas – penetram nos macrófagos, transformam-se em amastigotas e multiplicam-se nos vacúolos parasitóforos. A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do fator de crescimento e transformação β (TGF- β). Essa citocina está relacionada com desativação de macrófago, inibição da ação do IFN- γ e redução da expressão de moléculas MHC classe II (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

A interação entre os ligantes dos parasitos e os receptores celulares ocorre direta ou indiretamente (através de moléculas como C3b/C3bi ou fibronectina). C3bi funciona como opsonina e facilita a ligação de promastigotas com o receptor de complemento tipo três, CR3, dos macrófagos. As promastigotas se protegem da lise pelo complemento através de vários mecanismos, incluindo a liberação do complexo de ataque à membrana e inativação de fatores do complemento (LARANGEIRA, 2008).

Lopes & Moojen (2008) afirmaram que quando os linfócitos Th 1 são ativados, ocorre a produção de citocinas, como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 2 (IL-2), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina 3 (IL-3) e interleucina 12 (IL-12), que irão promover a ativação de macrófagos. Após a ativação destes, estimulam a imunidade celular pela ativação de outras células ou por sua proliferação, eliminando assim a infecção, além de estimular a produção de anticorpos da classe IgG 2a (FEITOSA, et al., 2000). No entanto, TNF- α também pode contribuir para a perda de peso do animal, acentuando a desnutrição (BACELLAR & CARVALHO, 2005).

Porém, segundo Feitosa et al. (2000), quando a infecção está associada à indução dos linfócitos Th 2, há produção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6) e de fatores que desativam macrófagos como a interleucina-10 (IL-10), TGF- β e prostaglandina e que induzem a diferenciação de células B para a produção de anticorpos das classes IgG1 e IgE (LARANJEIRA, 2008). A IL-4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4, a IL 5 é importante para diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos, enquanto a IL-10 inibe a síntese de citocinas produzida pelos macrófagos, diminuindo a função destas células como apresentadoras de antígeno, além de inibir eventos metabólicos associados a sua ativação, interferindo na atividade leishmanicida do macrófago (LOPES & MOOJEN, 2008; BACELLAR & CARVALHO, 2005).

Na enfermidade natural, as duas vias de defesa serão ativadas, tanto o subtipo Th 1, quanto Th 2, produzindo uma grande variedade de sintomas, onde a gravidade dos mesmos dependem do equilíbrio entre os dois sistemas de defesa. Assim, em seres humanos e cães, o perfil de susceptibilidade na leishmaniose está associado à presença de manifestações clínicas, evidências de baixa resposta imune celular e presença de resposta imune humoral exacerbada (altos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* no soro) (LOPES & MOOJEN, 2008; LARANJEIRA, 2008).

2.5 Sinais Clínicos

A leishmaniose visceral canina pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas à imunocompetência individual do animal, podendo apresentar-se desde uma forma assintomática até uma doença sistêmica, muitas vezes levando o cão a morte (SILVA et al., 2011; BENITES et al., 2011).

É uma doença crônica e fatal, sendo os principais sinais clínicos as lesões cutâneas (alopecia, lesões crostosas, descamação furfurácea, dermatites, úlceras cutâneas, onicogribose) (Figura 5), sinais oculares (conjuntivites, queratoconjuntivites, blefarites, uveítes) e afecção visceral (febre, linfadenopatia local ou generalizada, perda de peso progressiva, poliúria, polidipsia, indisposição, anemia, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrites e falência renal crônica) (SILVA, 2007; GÁLLEGO, 2004; IKEDA et al., 2005). De acordo com Sangioni et al. (2007) a onicogribose é acompanhada de hipersensibilidade das almofadas plantares e que, por vezes, ocorre a hiperqueratose destas.



Figura 5 - Diferentes padrões de lesões cutâneas. Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov

Segundo Silva (2007) cães assintomáticos e infectados naturalmente podem apresentar acentuado parasitismo nos linfonodos comparados com animais oligo e sintomáticos. Por outro lado, cães com sintomatologia típica podem apresentar ausência de formas amastigotas na pele.

A contagem de eritrócitos pode ser muito baixa, sendo a anemia, na maioria dos casos, normocítica, normocrômica, em geral grave devido à diminuição da eritropoiese decorrente de hipoplasia ou aplasia medular, associada à destruição celular no baço. O quadro anêmico pode ser agravado por perda de sangue ou diminuição da meia vida das hemácias associadas à produção de auto-anticorpos. No que se refere às alterações na série leucocitária na fase inicial da doença ou em animais infectados que apresentam bom estado clínico, há linfocitose, enquanto animais em estágio mais avançado da doença, com quadro clínico grave, apresentam linfopenia (SILVA, 2007; IKEDA et al., 2003; FEITOSA et al., 2000). De acordo com Thomaz-Soccol et al. (2009) em estágios mais avançados, observa-se também paresia das patas posteriores, caquexia, inanição, evoluindo para a morte.

Segundo Nogueira et al. (2009) apesar da grande diversidade de manifestações clínicas, existem animais aparentemente saudáveis e aqueles que exibem sintomatologia característica de estágios finais da doença. Um fato importante é que a doença canina pode permanecer clinicamente inaparente por longos períodos.

De acordo com Tilley & Smith (2008) formas amastigotas intracelulares são identificadas em muitos tecidos como pele, linfonodos, fígado, baço e rim. São encontradas ocasionalmente ulcerações nas mucosas do estômago, intestino e cólon. A LV também

pode afetar o sistema nervoso central, produzindo alterações de equilíbrio (GÁLLEGO, 2004). As lesões hepáticas caracterizam-se por inflamações granulomatosas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, que se encontram albergando parasitas. Nos rins, a deposição de imunocomplexos nos glomérulos pode acarretar em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial com comprometimento da função renal. A nefropatia pode ser causada pelo infiltrado de linfócitos T CD4+ detectadas na região glomerular e intersticial dos rins de cães naturalmente infectados (SILVA, 2007).

Ainda segundo Silva (2007), na leishmaniose canina pode ocorrer acometimento de hemorragias devido à hiperglobulinemia (interfere na formação de fibrina), sequestro esplênico de plaquetas, hipoplasia medular, vasculite por imunocomplexos, e epixtase (provavelmente por lesões na cavidade nasal).

2.6 Diagnóstico

De uma maneira geral o diagnóstico da LVC vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública devido, principalmente, a três fatores: variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas; alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (GONTIJO & MELO, 2004).

A pele dos cães tem três aspectos importantes para a LV: é a região do corpo que mais manifesta os sinais clínicos, é o local onde acontece a primeira interação entre o parasita e o sistema imune do cão, além de ser o local onde se encontra grandes quantidades de formas amastigotas do parasita. Sendo assim, o diagnóstico da LV pode ser feito através de métodos clássicos juntamente com evidências clínicas e epidemiológicas (QUEIROZ et al., 2010; MICHALSKY et al., 2011).

2.6.1 Diagnóstico Clínico

De acordo com Gontijo & Melo (2004) o diagnóstico clínico muitas vezes é um problema para o veterinário devido ao amplo espectro de sinais clínicos, desde aparentemente saudáveis até estágios mais severos. Os cães infectados, com ou sem sinais clínicos, transmitem o parasito para os insetos vetores.

As lesões de pele, como alopecia e dermatite, são comuns na Leishmaniose Visceral Canina. No entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver a presença de parasitas, o que alerta para a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença. Neste sentido, o diagnóstico clínico da LV não é suficiente, direcionando o diagnóstico para os métodos laboratoriais (QUEIROZ et al., 2010; CARVALHO et al., 2009).

2.6.2 Diagnóstico Laboratorial

Diante de algumas divergências entre os métodos de diagnósticos disponíveis, tem havido busca constante por novos testes mais específicos, possibilitando maior segurança na implementação de ações de controle. Existem basicamente três categorias de provas utilizadas para o diagnóstico: os métodos parasitológicos, os métodos imunológicos e os métodos moleculares (ANDRADE, 2006; CARVALHO et al., 2009).

Os métodos diagnósticos por sorologia, por suas características próprias, são os de eleição e são largamente empregados pela sua fácil e rápida execução, bem como sua confiabilidade em certas condições, como as de campanhas de saúde pública, onde são examinados grandes contingentes populacionais. O teste parasitológico é o método conclusivo de diagnóstico da doença; é considerado o padrão ouro. Por meio dele, faz-se a detecção e a identificação do parasita a partir de biópsias ou aspirados de tecidos (OLIVEIRA, 2009). Segundo Queiroz et al. (2010), enquanto os testes sorológicos apresentam mais resultados falso positivos por causa das reações com outros patógenos, os métodos parasitológicos são mais precisos, mas também mais invasivos porque, usualmente, requerem punção do linfonodo periférico ou medula óssea (Figura 6).

2.6.2.1 Método Parasitológico

O diagnóstico parasitológico implica na visualização do patógeno, as leishmanias. A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos (GONTIJO & MELO, 2004; GÁLLEGO, 2004). Segundo Gontijo & Melo (2004), a especificidade deste método é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido, dependendo do grau do parasitismo, do tipo de material coletado, do seu

processamento e coloração, além do observador (LAURENTI, 2009). Outra desvantagem é que é um método invasivo, com probabilidade de risco para o animal e também impraticáveis em programas de saúde pública (QUEIROZ et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Gontijo & Melo (2004) afirmaram que as punções esplênicas e de medula óssea são consideradas procedimentos invasivos, exigindo ambiente apropriado para coleta, não sendo indicados para estudos epidemiológicos em larga escala, sendo, mas utilizado em pesquisas.

2.6.2.2 Método Sorológico

Os exames parasitológicos são seguros quanto à sua positividade, mas não são eficazes para realizar um levantamento epidemiológico que requer um procedimento fácil, rápido e seguro. Assim, em 1957, foi descrita a fixação de complemento para inquéritos canino. Desde então, buscou-se o aprimoramento ou novas técnicas para utilização em levantamentos epidemiológicos e que assegurasse um resultado confiável, para que medidas preventivas fossem tomadas contra a disseminação da doença. Desse modo foi adotado no Brasil a imunofluorescência indireta (OLIVEIRA, 2009).

A LV é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, facilitando o diagnóstico através de testes sorológicos, evitando os parasitológicos, que são mais invasivos.

Os conjuntos diagnósticos utilizados para a realização dos testes sorológicos possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e são produzidos pelo laboratório Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz/RJ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A RIFI é considerada a técnica padrão pela Organização Mundial de Saúde (OMS), além de ser o teste de escolha para inquéritos populacionais (FEITOSA et al., 2000; GONTIJO & MELO, 2004). De acordo com o Ministério da Saúde (2011), os métodos diagnósticos sorológicos recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose para órgãos de saúde pública no Brasil são o ELISA, como método de triagem, e a RIFI, como confirmatório, utilizados na rotina e nos inquéritos caninos em municípios onde já houve registro da doença.

Utilizada a partir da década de 60, a RIFI tem sido mais frequentemente utilizada na população canina (NUNES et al., 2007; ALVES & BEVILACQUA, 2004). Cabrera (1999) afirma que o controle da leishmaniose visceral envolve a detecção de cães infectados por testes de imunofluorescência e que animais soropositivos detectados pela técnica mostram uma boa relação com evidências parasitológicas da infecção.

De acordo com Alves & Bevilacqua (2004) a RIFI demonstra sensibilidade que varia de 90% a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro, além da praticidade de colheita de material, utilizada para pesquisar anticorpos no soro do paciente.

É executado como uma reação antígeno-anticorpo em duas etapas. O primeiro passo ocorre quando o antígeno na lâmina é recoberto com diluições de soro do paciente. Após incubação, realizam-se lavagens, para remover qualquer excesso de anticorpos. No segundo passo, o antígeno é recoberto e incubado com o conjugado marcado com fluoresceína. Após a segunda incubação e lavagem, as lâminas podem ser examinadas usando um microscópio de fluorescência (LOPES & MOOJEN, 2008). De acordo com Oliveira (2009), a RIFI utiliza como antígeno promastigotas de *L. donovani* fixadas em lâminas. Outra vantagem é a possibilidade de pesquisa tanto de IgG quanto de IgM, que é importante pela precoce positividade.

Sua especificidade é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com Leishmaniose Tegumentar Americana, doença de Chagas, malária. Isto dificulta a interpretação de dados epidemiológicos (ALVES & BEVILACQUA, 2004; GONTIJO & MELO, 2004). Silva et al. (2009) sugeriu que a utilização da RIFI poderia comprometer a efetividade do Programa de Controle da LVC por não estar detectando animais infectados, em virtude dos falsos negativos, e ao mesmo tempo, identificando cães não infectados (falsos positivos).

A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA. É o teste mais utilizado para imunodiagnóstico de LV, rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e menos específico que a RIFI, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos (ALVES & BEVILACQUA, 2004; GONTIJO & MELO, 2004). Estes anticorpos irão reagir com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura in vitro. O antígeno é adsorvido em microplacas e o soro diluído, adicionado posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vão se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando é adicionada uma antiimunoglobulina de cão

marcada com enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos, caso estejam presentes gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado reagente é aquele em que apresenta o valor da densidade ótica igual ou superior a três desvios padrão do ponto de corte (LOPES & MOOJEN, 2008).

Silva et al. (2009) afirmaram que estudos que avaliaram o ELISA empregando diferentes extratos antigênicos e com cães de área endêmica para LVC observaram a existência de reações cruzadas com outras doenças parasitárias.

De acordo com o Ministério da Saúde (2011), os resultados das avaliações realizadas pela FUNED/MG demonstram que todos os lotes de ELISA liberados para o uso na rede pública, em 2011, tiveram sensibilidade média acima de 95% e a especificidade de 100%. O único kit diagnóstico para calazar canino disponível no mercado e aprovado pelo MAPA no Brasil é o kit ELISA/S7, produzido pela Biogene Ind. Com. Ltda., que emprega uma única proteína de *Leishmania*, obtida por engenharia genética e expressa em *E. coli*. O ensaio é reconhecido pelo MAPA como tendo elevadas especificidade e sensibilidade e vem sendo extensamente adotado para o sorodiagnóstico do calazar canino no Brasil. Por conter apenas uma proteína da *Leishmania*, o ELISA/S7 dá como não-reagente o soro de cão vacinado com *Leishmune*, a única vacina para calazar canino no mercado, também aprovada pelo MAPA, e produzida pela Fort Dodge Saúde Animal. Esta propriedade do kit ELISA/S7 evita que cães vacinados sejam falsamente apontados como infectados, como ocorre com frequência quando o sorodiagnóstico é realizado com os kits empregando antígenos complexos, como é o caso dos kits de RIFI e ELISA da rede pública. O emprego deste kit pela rede pública, quando autorizado pelo MS, evitará que os agentes de saúde pública envolvidos nos programas de controle do calazar canino tenham que procurar eliminar cães vacinados, além dos infectados, o que tem criado sérios problemas de relacionamento entre os vários atores envolvidos no cenário do calazar no país.

Como visto, a RIFI é o teste padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Sendo assim, ELISAs utilizando antígenos quimicamente definidos e específicos do parasita têm sido propostos para o diagnóstico da LVC. O antígeno recombinante K39 (rK39), um epítipo imunodominante repetitivo em uma proteína relacionada a kinesina, e muito conservado entre as espécies de leishmanias viscerotrópicas, têm se mostrado sensível e específico para o diagnóstico da LVC. Outro antígeno considerado candidato para o diagnóstico da LV é o recombinante A2. Este é expresso em amastigotas como uma família de proteínas que apresenta um número de

repetições de dez aminoácidos. Estudos sugerem que o recombinante A2 é particularmente útil para o diagnóstico da LVC (OLIVEIRA, 2009).

2.6.2.3 Método Molecular

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas moleculares é uma alternativa interessante para o diagnóstico de LV. Para detectar a presença de kDNA do parasito, uma das técnicas mais utilizadas é a amplificação do material genômico do parasito por PCR.

2.6.2.3.1 Reação em Cadeia Polimerase

É uma técnica mais específica e sensível (GÁLLEGO, 2004; ALVES & BEVILACQUA, 2004). Segundo Nunes et al. (2007) a amplificação de DNA é realizada a partir de diferentes tecidos bem como de aspirados de linfonodos, medula óssea e leucócitos de sangue periférico. O uso de sangue apresenta a vantagem de ser um processo de coleta fácil e menos invasivo, porém sua sensibilidade varia com a preparação da amostra e também devido à baixa parasitemia dos animais infectados (GÁLLEGO, 2004; NUNES et al. 2007).

Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR não é usada no diagnóstico de rotina. Infelizmente, suas limitações para uso em inquéritos epidemiológicos se baseiam no custo, disponibilidade de reagentes, equipamentos e pouca adaptabilidade do método ao campo. Para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo (GONTIJO & MELO, 2004; ALVES & BEVILACQUA, 2004).

A PCR pode ser de grande valia no diagnóstico individual e para o acompanhamento de cães vacinados, medida recentemente adotada por alguns clínicos veterinários no Brasil e não recomendada pelo Ministério da Saúde como medida de controle da leishmaniose visceral (NUNES et al., 2007).

Cabe salientar que a técnica de PCR, a qual se tem aprimorado e difundido, é comprovadamente mais sensível e poderia ser a técnica de eleição para o diagnóstico da LVC. No entanto, esta técnica ainda é onerosa, não faz parte da rotina de muitos

laboratórios e também não está padronizada pelo Ministério da Saúde no Brasil (QUEIROZ et al., 2010)

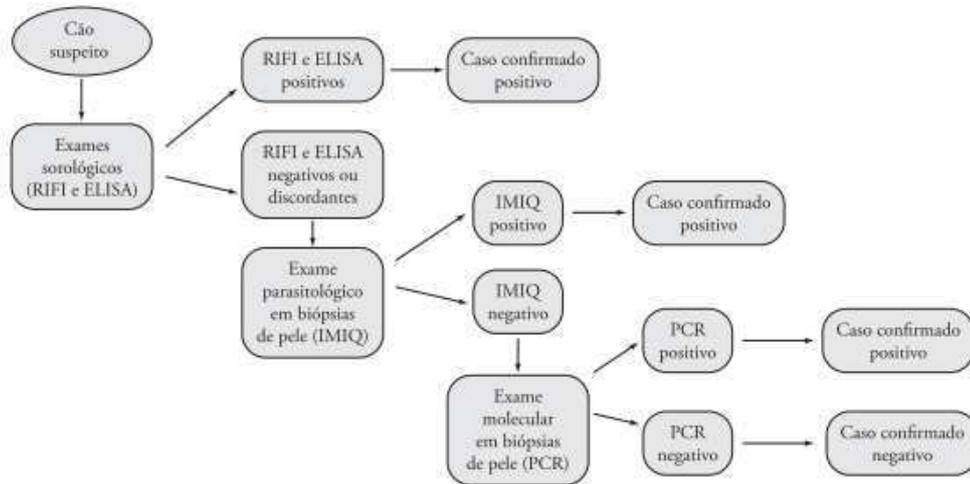


Figura 6- Diagrama para orientação do diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. Fonte: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (2010).

2.7 Tratamento

De acordo com o Ministério da Saúde (2006) o tratamento de cães não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina, por meio de drogas tradicionalmente empregadas tem tido baixa eficácia. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotômíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano. A portaria interministerial nº 1.426 de 11 de Julho de 2008 Art. 1º, proíbe, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Porém, segundo Oliveira et al. (2008), com o maior conhecimento da doença em caninos a comunidade científica médico veterinária está realizando experimentos de tratamentos dos animais. A OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece que a eutanásia dos cães infectados, na maioria dos países, se reserva cada vez mais para casos especiais, pois a maioria dos veterinários prefere administrar um tratamento antileishmaniótico, acompanhando atentamente as recaídas.

Por mais de sessenta anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes, tendo como tratamentos alternativos a anfotericina B, pentamidinas e os imunomoduladores. (GONTIJO & MELO, 2004). Entre eles, somente o antimoniato de meglumina foi registrado para o tratamento de leishmaniose canina. O alopurinol (um análogo com efeitos leishmaniostáticos, não registrado como droga veterinária) é frequentemente utilizado em combinação com antimoniais pentavalentes na fase inicial de tratamento, e em seguida, como terapia de manutenção para controlar surtos (MATEO et al., 2009).

Tilley & Smith (2008) afirmam que o medicamento de escolha no tratamento da LVC é o antimonato de meglumina e estibogliconato de sódio, disponível no Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

Atualmente, a maioria dos autores apontam falha terapêutica, recaídas e toxicidade relacionada com a utilização das estratégias de tratamento disponíveis. Além disso, as resistências a antimônio pentavalente (incluindo o mais utilizado em medicina veterinária Glucantime®) foram observadas durante os últimos anos em pacientes humanos e caninos que sofrem de leishmaniose. Com base nestas observações, existe uma necessidade para novos protocolos terapêuticos com base na utilização de novas moléculas que são fáceis de administrar e menos tóxicas.

Recentemente, um novo medicamento com base em miltefosina (Milteforan®, Virbac) foi desenvolvido, proporcionando assim uma nova opção terapêutica e estratégia alternativa de tratamento. Como um análogo da fosfatidilcolina (lecitina), que é um dos principais constituintes de membranas celulares, foi demonstrado que o miltefosina possui atividade antitumoral, bem como atividade antiprotozoária. Relacionado com este modo de ação, o miltefosina tem provado ser um valioso agente terapêutico para leishmaniose visceral humana. O miltefosina foi originalmente desenvolvido para o tratamento da leishmaniose visceral humana. Recentemente, foi registrado para o tratamento oral de leishmaniose canina em vários países europeus (MATEO et al., 2009; WOERLY et al., 2009).

Em um estudo realizado por Andrade et al. (2011) no Brasil, trataram cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* em áreas endêmicas utilizando diferentes protocolos e concluíram que o miltefosina promove melhora clínica em animais com baixa carga parasitária e baixos graus de estimulação humoral. No entanto, a diminuição dos sinais clínicos não foram acompanhados pela diminuição da carga

parasitária, sugerindo que o tratamento com miltefosina não é recomendado em áreas endêmicas, onde as crianças são as principais vítimas e os cães estão envolvidos na manutenção do ciclo do parasita.

Os animais submetidos ao tratamento devem ser controlados a cada três meses, através da avaliação clínica, sorologia para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, avaliação bioquímica sérica, hemograma completo, proteinograma e, quando possível, pesquisas de parasitos na pele (OLIVEIRA et al., 2008).

2.8 Controle

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da leishmaniose visceral, as estratégias de controle desta endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Ao longo dos anos a aplicação, muitas vezes, apenas parcial destas ações não proporcionou a redução da incidência da LV no país. O que sustenta a utilização do controle vetorial e de reservatórios como estratégias de intervenção sobre a LV é a conjectura de que a incidência de infecção em humanos é diretamente relacionada ao número de cães infectantes e a fatores entomológicos (JULIÃO et al., 2007; COSTA et al., 2007)

Segundo Julião et al. (2007) a baixa sensibilidade do teste de imunofluorescência indireto, agravada pela ampla utilização de papel-filtro na colheita de sangue nos inquéritos sorológicos caninos, demora tanto no fornecimento do resultado diagnóstico quanto na eutanásia dos cães soropositivos e ausência de técnica que avalie a infectividade dos cães examinados em inquéritos são aspectos deficientes no conjunto de ações de controles da LVC. Estes fatores contribuem para prolongar a permanência de cães infectados na área, sustentando a continuidade do ciclo de transmissão do parasito.

Apesar da eutanásia de cães soropositivos ser uma medida de controle recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a própria entidade reconhece que existem cães de grande valor afetivo e econômico, por isso não podem ser indiscriminadamente sacrificados. Foi observado que o momento da busca do cão para a eliminação é carregado de forte componente emocional. Este sentimento faz com que muitos proprietários de cães

não aceitem esta estratégia de controle. O cão não assume somente o papel no contexto familiar, mas principalmente no meio urbano, executando diversas funções como: guarda, salvamento, guia de paraplégicos, prática de esportes, repressão à criminalidade e ao tráfico de drogas (OLIVEIRA et al., 2008).

De acordo com o Ministério da Saúde (2006) o controle químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual é a medida de controle vetorial recomendada no âmbito da proteção coletiva. Esta medida é dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar e/ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população humana, conseqüentemente, diminuir o risco de transmissão da doença. Os produtos mais empregados atualmente no controle a esses vetores são a cipermetrina, na formulação pó molhável (PM) e a deltametrina, em suspensão concentrada (SC). A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo. Para a realização da eutanásia, deve-se ter como base a Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Devem se realizar atividades de educação em saúde, visando a participação ativa da comunidade e com isso obtenham informações sobre o atendimento precoce das pessoas com diagnóstico positivo da doença, bem como contribua, de forma participativa, para as medidas de controle da doença (manejo ambiental, controle vetorial, controle do reservatório entre outras).

Estudos enfocando a estratégia de eliminação canina têm oferecido resultados conflitantes, pelo menos quando utilizada separadamente do controle vetorial. Por outro lado, experiências têm demonstrado a efetividade do controle vetorial em diversas situações. Em um estudo realizado por Costa et al. (2007) em Porteirinha, norte de Minas Gerais, identificou uma redução na incidência de leishmaniose canina e humana após a retirada sistemática de cães soropositivos, no mesmo momento em que o controle vetorial também foi implementado.

2.9 Prevenção

De acordo com o Ministério da Saúde (2006) as medidas preventivas são voltadas para a população humana, para o vetor e para a população canina.

Em relação aos humanos as medidas de proteção individual devem ser estimuladas, tais como uso de mosquiteiros, telas em portas e janelas impregnados com repelente, uso

de repelente e não se expor nos horários de atividade do vetor em ambientes onde podem ser encontrados.

Com relação ao vetor, o controle nem sempre é satisfatório a partir de uma única aplicação residual de inseticida. Desta forma, outras medidas são indicadas como o manejo ambiental através da limpeza de quintais, terrenos e praças públicas, a fim de alterar as condições do meio.

A captura de cães errantes é essencial por ser fonte disseminadora de diversas doenças de importância médico-sanitária, como a LV. Em áreas com transmissão da LV é recomendado que seja realizado previamente o exame sorológico canino antes de proceder a doação de cães. Outro fator importante é a utilização de telas em canis de residência, pet shops, clínicas veterinárias, abrigos de animais, com o objetivo de evitar a entrada de flebotomíneos. Outra forma de prevenção é a utilização de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como medida de proteção individual para cães contra picadas flebotomíneos.

Duas vacinas para cães estão alcançando resultados de sucesso em ensaios clínicos de fase III: O ligante fucose-manose (FML)- saponina vacina (Leishmune[®]) constituída pelo antígeno de promastigotas de *L. donovani*, chamado FML, e as saponinas QS21 e desacilados de *Quillaja saponaria*. O FML foi antigênica para o ser humano e cães e Leishmune[®] foi imunogênica, imunoproliferação, e imunoterápicos em camundongos e hamsters e em ensaios de campo para cães. Em 2003, a vacina FML-saponina foi licenciada para a profilaxia contra LVC no Brasil sob o nome de Leishmune[®], e tem sido utilizada desde 2004 no Brasil e obteve sua licença definitiva em outubro de 2011. A vacina Leishmune[®] é profilática contra LVC, protege 98% dos cães vacinados, e reduz a carga parasitária. A resposta de anticorpos anti-FML induzida pela Leishmune[®] é principalmente a de IgG2. Leishmune[®] induziu um padrão imunológico caracterizado pelo aumento dos níveis de IFN- γ , NO e IgG2 anti *L. chagasi*, a ativação precoce e persistente de neutrófilos e monócitos, e linfócitos T CD8 + expressando IFN- γ .

Outra vacina de segunda geração, o LiESAp, composto pelo Proteína 54-kDa excretada de *L. infantum* mais MDP também alcançou Ensaios de Fase III. A resposta imune gerada em cães vacinados com LiESAp foi confirmado pela descoberta de um efeito significativo leishmanicida de macrófagos, devido a uma ativação dependente de IFN- γ . Na Europa, uma formulação relacionado com a vacina LiESAp foi licenciada para comercialização sob o nome de Cani Leish[®], no início de 2011 e está sendo lançado em

Portugal, Espanha, França, Grécia e Itália. É definido como uma segunda geração antígeno peptídico constituído por proteínas excretadas/secretadas sobrenadante de cultura de *L. infantum*.

Finalmente, uma vacina chamada Leish-Tec® também foi licenciada no Brasil. É composto por um antígeno recombinante A2 de amastigotas e adjuvante saponina. Apesar da falta de publicações científicas, a vacina foi licenciada no Brasil em 2008.

Uma vez que foi demonstrado que uma vacina canina promove diminuição da incidência de Leishmaniose Visceral Humana e Canina, o aumento da cobertura de vacina para cães, especialmente na ausência de uma vacina licenciada para a leishmaniose humana, certamente provoca uma interrupção de epidemias.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou a Instrução Normativa Interministerial 31/2007 (D.O.U. 10/07/2007) aprovando o Regulamento Técnico para Pesquisa, Desenvolvimento, Produção, Avaliação, Registro e Renovação de licenças, Comercialização e Uso de vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina. Dois laboratórios estão comercializando no Brasil, as vacinas contra a leishmaniose visceral canina, a Fort Dodge Saúde Animal (Leishmune®) e Hertape Calier Saúde Animal (Leish-Tec®), ambas registradas no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento - MAPA (MS, 2009) (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; HERMONT, 2008).

2.9.1 Vacinas para Leishmaniose Canina em Desenvolvimento

Segundo Palatnik-de-Sousa (2012), o lisado de *L. braziliensis* de uma vacina de primeira geração contra leishmaniose canina, que não conseguiu mostrar eficácia quando formulados com BCG, está agora sob investigação, mas com adjuvante saponina. A vacina aumentou isotipos IgG anti-Leishmania, em conjunto com níveis mais elevados de linfócitos, particularmente linfócitos T CD8 circulantes, como esperado para uma vacina contendo *Q. saponaria*.

Há um consenso geral indicando que a capacidade de responder vários antígenos talvez seja um requisito essencial de uma vacina eficaz. No entanto, do ponto de vista industrial, a obtenção de vacinas contra protozoários tem algumas limitações. Crescer protozoários e extrair os antigênicos nativos é laborioso, dispendioso e requer adicionais produtos. Os candidatos mais promissores parecem ser Lack, LeIF, TSA, LmSTI1, H1, Cpa + CEC, KMP11, e NH36.

Em comparação com as vacinas de proteína recombinante, as vacinas de DNA são muito mais estáveis e tem a vantagem de baixos custos de produção, não há necessidade para a distribuição da cadeia de frio, bem como a flexibilidade de combinar múltiplos genes numa construção simples. Um lote de interesse foi gerado para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose, nos últimos anos, com estudos em curso no labson modelos experimentais. Lack, Leif, TSA, LmSTI1, H1, CPA + CEC, KMP11, e NH36 são os candidatos mais promissores que podem encontrar um lugar nos anos de surgimento, uma vez que já foram testados em vários modelos animais.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Leishmaniose Visceral é uma doença de grande importância na clínica de pequenos animais, e também para a população, uma vez que esta é considerada uma zoonose. Em nosso país se apresenta como uma importante doença parasitária em cães, em função de seu aspecto clínico, do potencial de transmissão e zoonótico. É necessário que se tenha um maior controle e prevenção sobre a doença, visto que o seu aumento tem sido bastante significativo o que vem ocasionando óbitos tanto em animais quanto em humanos.

Apresenta variedade de manifestações clínicas o que pode mascarar o diagnóstico, por isso, é importante que a categoria médica veterinária esteja alerta ao diagnóstico da Leishmaniose, uma vez que a doença consiste em um problema de saúde animal e pública. O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à variedade de sintomas da doença. Não se deve considerar o tratamento de um cão, sem antes firmar com segurança o diagnóstico.

A partir de todas as constatações citadas anteriormente, conclui-se que a LVC pode ser considerada um grave problema de saúde pública, que está se expandindo no meio urbano, o que representa um grande desafio para os profissionais da saúde.

4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, A. B. P. F., et al. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, julho, 2010.

ALMEIDA, M. A. O., et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**. v. 127, p. 227–232, 2005.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro: v. 20, n. 1, p. 259-256, jan./fev., 2004.

ANDRADE, H. M., et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 181, p. 83–90, 2011.

ANDRADE, H. M., et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 103, p. 71–81, 2002.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 75, n. 1, p. 24-34, Jan./Jun., 2005.

BARATA, R. A., et al.. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, set./out., 2005.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, sep., 2004.

BENITES, A. P., et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 72-77, janeiro, 2011.

CABRERA, G. P. B., et al. The fucose-mannose ligand–ELISA in the diagnosis and prognosis of Canine visceral leishmaniasis in Brazil. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 2, p. 296–301, 1999.

CAMARGO, L. M.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CARVALHO, D., et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 120-124, fevereiro, 2009.

CESSE, E. A. P. **Expansão e Urbanização da Leishmaniose Visceral: estudo epidemiológico do processo de transmissão ativa em área urbana – Petrolina/PE, 1992-1997.** Recife: FIOCRUZ/MS, 1999. 142 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Saúde Pública pelo Departamento de Saúde Coletiva, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 1999.

COSTA, C. H. N., et al. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 40, n. 4, p. 415-419, jul./ago., 2007.

COUTINHO, M. T. Z., et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology,** v. 128, p.149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology,** v. 147, p. 320-325, 2007.

DANTAS-TORRES, F., et al. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 38, n. 5, p. 444-445, set./out., 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DINIZ, S. A., et al. Genital Lesions Associated with Visceral Leishmaniasis and Shedding of *Leishmania* sp. in the Semen of Naturally Infected Dogs. **Veterinary Pathology.** v. 42, p. 650–658, 2005.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. Trop.,** São Paulo. v. 53, n. 1, p. 3-11, January/February, 2011.

FEITOSA, M. M., et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Revista Clínica Veterinária.** Rio de Janeiro, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERREIRA, E. C., et al.. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting diferente clinical manifestations. **Veterinary Parasitology,** v. 146, p. 235-241, 2007.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. **Revista Sci. Tach. Off. Int. Epiz. Enpaña,** v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia.** São Paulo, v. 7, n. 3, p. 1-10, set., 2004.

HERMONT, V. J. Leish-Tec. Vacina Recombinante contra Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico**. 1 ed., 2008.

JULIÃO, F. S., et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesq. Vet. Bras.** v. 27, n. 8, p. 319-324, agosto, 2007.

LARANGEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. São Paulo: FMVZ, 2008. 79 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2008.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na LVA canina. **Bepa**. v.6, n. 67, p.13-23, 2009.

LOPES, B. A. B.; MOOJEN, R. S. **Leishmaniose: Revisão sobre os principais aspectos clínicos e epidemiológicos em cães e gatos**. Belém: UCB, 2008. Monografia de Conclusão de Curso de Clínica Médica de Pequenos Animais, Universidade Castelo Branco, Belém, 2008.

MATEO, M., et al. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitol Res.** v. 105, p.155–162, 2009.

MESTRE, G. L. C., et al. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal. v. 20, n. 3, p. 228-234, jul./set., 2011.

MESTRE, G. L. C.; FONTES, C. J. F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 1, p. 42-48, jan./fev., 2007.

MICHALSKY, E. M., et al. Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 1, p. 58-62, jan./fev., 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Interministerial Nº 31, de 9 de Julho de 2007. Regulamento Técnico para Pesquisa, Desenvolvimento, Produção, Avaliação, Registro e Renovação de licenças, comercialização e uso de vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose**.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Disponível em: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/outras_normas/porta1426.pdf. Acesso em: 11 de Maio de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. NOTA TÉCNICA Nº 48 /2011 – CGDT/DEVIT/SVS/MS. **Assunto: Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde.** Brasília, 2011.

MONTEIRO, E. M., et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 38, n. 2, p. 147-152, mar./abr., 2005.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors.** v. 5, p. 67, 2012.

NOGUEIRA, J. L., et al. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde Pública: uma zoonose reemergente. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária.** Ano VII – n.13, Garça/SP, 2009.

NUNES, C. M., et al. Avaliação da Reação em Cadeia pela Polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, A. C., et al. Controle e Tratamentos da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** Ano VI – n. 10, janeiro, 2008.

OLIVEIRA, F. L. L. **Avaliação dos métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.** Teresina: UFPI, 2009. 27 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

OLIVEIRA, G. M. G., et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude.** v.1 n.3, set., 2010.

OLIVEIRA, L. S., et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira.** v. 6, n. 1, p. 41-47, jan./mar. 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology.** v. 3, n. 69, April, 2012.

PAULA, C.C., et al. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 42, n. 1, p. 77-78, jan./fev., 2009.

POUBEL, S. B. **Variabilidade Genética de isolados de *Leishmania infantum* x *L. chagasi* procedentes de várias regiões do Brasil.** Curitiba: UFPR, 2010. 75 p. Dissertação de Mestrado – Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PRADO, P.F., et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561-566, set./out., 2011.

QUEIROZ, N. M. G. P., et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina pelas técnicas de Imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, jan./mar., 2010.

RATH, S., et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. São Paulo: v. 26, n. 4, jul./ago., 2003.

SANGIONI, L. A., et al. Busca ativa de casos de leishmaniose cutânea em humanos e cães em área periférica do município de Campo Mourão - PR, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.37, n.5, p.1492-1494, set./out., 2007.

SILVA, F. L., et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v.160, p. 55-59, 2009.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropic – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, R. M., et al. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Rev Saúde Pública**. v. 43, n. 6, p. 1044- 1053, 2009.

SILVA, S. M. **Avaliação de um protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurinol, no tratamento da leishmaniose visceral canina**. Belo Horizonte: UFMG, 2011. 205 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

THOMAZ-SOCCOL, V., et al. Casos autóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal. v. 18, n. 3, p. 46-51, jul./set., 2009.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 890.

Visceral. 1 ed., série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília-DF. 2006. 62 p.

WOERLY, V., et al. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitol Res**. v. 105, p.463-469, 2009.