

**ALESSANDRA RIBEIRO DE ALBUQUERQUE**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E DE  
DIAGNÓSTICO EM CÃES (*Canis familiares*) (LINNAEUS,  
1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania*  
(*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**

**RECIFE  
2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ALESSANDRA RIBEIRO DE ALBUQUERQUE**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E DE  
DIAGNÓSTICO EM CÃES (*Canis familiares*) (LINNAEUS,  
1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania*  
(*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador  
Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE  
2006

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

A345a Albuquerque, Alessandra Ribeiro de  
Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico em  
cães (*canis familiares*) (Linnaeus, 1758) naturalmente  
infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha &  
Chagas, 1937)/ Alessandra Ribeiro de Albuquerque;  
orientador Prof. Dr. Leucio Câmara Alves. – Recife : o  
Autor, 2006.  
83 p. : il.

---

Orientador: Leucio Câmara Alves  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Departamento de Medicina Veterinária.  
Inclui bibliografia e anexo.

---

CDD 636.089 696

1. Parasitologia veterinária
2. Protozoose
3. Trypanosomatidae
4. Leishmaniose visceral canina
5. Calazar canino
6. Imunodiagnóstico
7. Clínica médica
8. Veterinária
  - I. Alves, Leucio Câmara
  - II. Título

Marleide Guedes  
Bibliotecária  
CRB 3511

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E DE  
DIAGNÓSTICO EM CÃES (*Canis familiares*) (LINNAEUS,  
1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania*  
(*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)**

ALESSANDRA RIBEIRO DE ALBUQUERQUE

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

---

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

EXAMINADORES:

---

Dra Yara Gomes de Miranda

---

Dra Gílcia Aparecida de Carvalho Silva

---

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

RECIFE  
2006

*Dedico a minha mãe pelo exemplo de pessoa e profissional, e sem a qual nada do que faço seria possível.*

*Dedico ao meu pai, pelo amor incondicional e força sempre.*

*À vocês, a minha gratidão.*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar cada passo em minha vida, encorajando e dando força nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. e amigo Leucio pelos ensinamentos, ajuda, paciência, enfim palavras não descreveriam a minha gratidão!

Aos Prof. Maria da Glória Aparecida Faustino, Frederico Celso Lyra Maia e Waldomiro Junior pelo apoio e amizade.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, em especial à Dra Yara Gomes de Miranda pelo carinho e receptividade.

Aos pesquisadores e técnicos que fazem a Biogene, sobretudo ao Dr. Emmanuel Sérgio e Milady pelo suporte no desenvolver deste projeto.

Aos amigos Ana Maria, Edmilson, Binho, Fabiane e Geovania pela franca solidariedade ao meu trabalho de pesquisa.

Aos amigos do laboratório de doenças parasitárias, pelos momentos de apoio e estímulo e ter compartilhado esse caminho de mãos dadas.

À Dona Guiomar, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório de Imunoparasitologia do Aggeu Magalhães Milena, Rodrigo, Filipe e Mineo pelo apoio incondicional.

Ao Gustavo, pela paciência e compreensão demonstrada a cada novo desafio.

Aos cães que fizeram parte deste estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso desta dissertação.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	01
1.1- Agente etiológico .....	01
1.2- Vetor.....	03
1.3- Ciclo biológico.....	03
1.4- Distribuição geográfica e prevalência .....	03
1.5- Sinais clínicos .....	07
1.6- Diagnóstico .....	09
1.7- Referências .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	21
2.1- Geral .....	21
2.2- Específicos .....	21
<b>CAPÍTULO 1</b>	22
<b>3 FREQUENCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES NA CIDADE DO RECIFE.</b>	
Resumo .....	23
3.1- Introdução .....	24
3.2- Material e Métodos .....	26
3.2.1- Local do estudo .....	26
3.2.2- Animais .....	26
3.2.3- Diagnóstico parasitológico e sorológico .....	26
3.3- Resultados e discussão .....	27
3.4- Conclusão .....	31
3.5- Referências .....	31
<b>CAPÍTULO 2</b>	38
<b>4 OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE AMARAJI, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.</b>	
Resumo .....	39
4.1- Introdução .....	40
4.2- Material e Métodos .....	41

4.2.1- Descrição do paciente .....	41
4.2.2- Diagnóstico parasitológico .....	42
4.2.3- Diagnóstico sorológico .....	42
4.3- Resultados e Discussão .....	43
4.4- Conclusão .....	44
4.5- Referências .....	44
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>46</b>
<b>5 ASPECTOS CLÍNICOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS</b>	
<b>POR <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> NA REGIÃO METROPOLITANA</b>	
<b>DO RECIFE.</b>	
Resumo .....	47
5.1- Introdução .....	48
5.2- Material e Métodos .....	49
5.2.1-Animais .....	49
5.2.2- Diagnóstico parasitológico .....	50
5.2.3- Diagnóstico sorológico .....	50
5.3- Resultados e Discussão .....	51
5.4- Conclusão .....	54
5.5- Referências .....	55
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>58</b>
<b>6 COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC KITS USED</b>	
<b>FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS</b>	
Abstract	59
6.1- Introduction .....	60
6.2- Material and Methods .....	61
6.2.1-Animals .....	61
6.2.2- Parasitological Diagnosis .....	62
6.2.3- Serologic Diagnosis .....	62
6.3- Results and Discussion .....	63
6.4- Conclusions .....	67
6.5- References .....	67

<b>7 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>70</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### CAPÍTULO 3

5- ASPECTOS CLÍNICOS DE CÃES COM DIAGNÓSTICO POSITIVO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE.

**Tabela 1.** Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos encontrados nos animais positivos para LVC na Região Metropolitana do Recife, 2006. .... 51

### CAPÍTULO 4

6- COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC KITS USED FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

**Table 1-** Data of EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos with the parasitological criteria, Recife, 2006 ..... 63

**Table 2-** . Data of ELISA S7® with the parasitological criteria. Recife, 2006. .... 64

**Table 3-** Data of EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos kit and canine calazar diagnostic ELISA S7® Biogene kit. Recife, 2006 ..... 66

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 4

Página

#### 6- COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC KITS USED FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

---

<b>Figure 1-</b> Optic densities (DO) distribution observed in the different ELISA systems used in the CVL diagnosis.	.....65
--	---------

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral Zoonótica (LVZ) se encontra distribuída por grande parte do território brasileiro, predominantemente no Nordeste, tendo como principal reservatório urbano o cão. A LVZ vem passando por mudanças em seu perfil de transmissão, onde a sua urbanização torna-se cada vez mais freqüente, principalmente devido a transformações no ambiente. O presente trabalho teve por finalidade diagnosticar casos de LVZ e avaliar as características clínicas em cães com infecção natural por *Leishmania (L.) chagasi* na cidade do Recife. Além disso, foram comparados sistemas ELISA, com antígenos distintos em cães para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) na Região Metropolitana do Recife. Foram utilizados 142 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco com suspeita clínica de LVC. O diagnóstico dos animais positivos foi realizado através do exame clínico, além de exames parasitológico e sorológico pelo método de ELISA. Dentre os resultados obtidos os sinais clínicos mais freqüente nos cães atendidos foram as úlceras cutâneas, presentes em 82,80% (29/36), seguido de onicogribose em 60,00% (18/36). Os dados revelaram ainda que 88,23% (15/17) dos animais provenientes da cidade do Recife possuíam anticorpos anti-*Leishmania*. Com relação a comparação dos sistemas de ELISA empregados no diagnóstico da LVC, o kit EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 65,79% e especificidade de 85,58% (IC 95%), e o kit para o diagnóstico do calazar canino ELISA S7® Biogene apresentou sensibilidade de 47,37% e especificidade de 89,42% (IC 95%). Os resultados indicam que não há sinal patognomônico na LVC e que esta zoonose encontra-se em processo de urbanização na cidade do Recife.

## SUMMARY

Zoonotic Visceral Leishmaniasis (ZVL) is a widespread disease in Brazil, particularly in the Northeast area having the dog as its main reservoir. ZVL has shown environmental changes in its transmission pattern through urbanization. The goal of this paper was to diagnose and evaluate clinical features in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Recife City. In addition, two Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) made with different antigens for the diagnosis of the canine ZVL in the metropolitan region of Recife have been compared. For this purpose 142 animals which were submitted to the Veterinary Hospital of the Universidade Federal Rural de Pernambuco presenting clinical signs suggestive of ZVL were used. The diagnosis of positive animals was performed through clinical examination, parasitological and serologic exams. The most frequent clinical signs were ulcers, present in 82.8% (29/36) animals followed by onicogriphosis in 60% (18/36). It was also observed that 88.23% (15/17) animals from Recife city were positive for anti-*Leishmania* antibodies. As for the comparison between the different ELISA systems used in the ZVL diagnosis, EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos kit presented sensibility of 65.79% and specificity of 85,58% (IC 95%), and ELISA S7® Biogene kit presented sensibility of 47.37% and specificity of 89.,42% (IC 95%). Results suggest the absence of a pathognomonic sign in CVL and an urbanization process of this zoonosis in Recife City.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar é uma doença parasitária de caráter zoonótico de distribuição cosmopolita, situada entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (WHO, 1996). Atualmente cinco países agregam 90% dos casos de LV, dentre eles o Brasil (DAVIDSON, 1999) onde das 27 unidades federativas, 19 já relataram casos da doença (BRASIL, 2004).

Essa enfermidade que, inicialmente, apresentava características rurais no Brasil, vem demonstrando mudanças importantes em seu padrão de transmissão, atingindo mais recentemente centros urbanos (ARIAS et al.,1996) e o cão se apresenta como principal reservatório da infecção humana (BRASIL, 2004).

Apesar das divergências quanto à espécie de *Leishmania* que infecta os canídeos no Brasil, a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem sido considerada sinonímia de *Leishmania (Leishmania) infantum* com base em perfis isoenzimáticos (MAURÍCIO, 2000).

No que se refere à transmissão entre hospedeiros susceptíveis, insetos vetores psicodídeos (DAVIDSON, 1999), do gênero *Lutzomyia* sp desempenham importante papel no ciclo biológico.

### 1.1 - Agente etiológico

As espécies do gênero *Leishmania* sp. são parasitas intracelulares de macrófagos e possuem duas formas. A primeira denominada amastigota, encontrada no hospedeiro vertebrado medindo entre 2 a 5 µm, podendo em sua célula ser diferenciado o citoplasma e o

cinetoplasto (SUNDAR e RAI, 2002), e a segunda denominada promastigota com 10 a 15  $\mu\text{m}$  que se encontra no inseto vetor (NOLI, 1999).

Segundo Levine et al., (1980) o agente etiológico do calazar possui a seguinte posição taxonômica:

Reino: Protista Haeckel, 1866

Sub-Reino: Protozoa Goldfuss, 1817

Filo: Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-Filo: Mastigophora Deising, 1866

Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963 *emend.* Vickerman, 1976.

Sub-Ordem: Trypanosomatina Kent, 1880.

Família: Trypanosomatidae Dofein, 1901, *emend* Grobben 1905.

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903.

Sub-Gênero: *Leishmania* Saf'yanova, 1982

Espécie: *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937, sinonímia *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURÍCIO, 2000).

Do ponto de vista molecular, o tamanho do genoma da *Leishmania* sp varia de  $10^7$  a  $10^8$  pares de bases e a organização cromossômica é polimórfica em tamanho (270 a 2600 kilobases) e em número (24 a 36). O genoma da *Leishmania (L.) chagasi* tem 36 cromossomos com grupos de ligação altamente conservados em diferentes linhagens (ALEXANDRINO, 2001).

## 1.2- Vetor

Os vetores são dípteros pertencentes à família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, (ROSÁRIO et al. 2005), gênero *Lutzomyia* no novo mundo, sendo a espécie *Lutzomyia longipalpis* incriminada como principal vetor do calazar no Brasil (LAINSON e RANGEL, 2005).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença de um vetor competente para a transmissão do parasita e de um hospedeiro / reservatório igualmente susceptível (GONTIJO e MELO, 2004).

## 1.3- Ciclo Biológico

Segundo ALVES e FAUSTINO (2005), o protozoário completa seu ciclo biológico em dois hospedeiros a saber: um vertebrado e outro invertebrado. A forma amastigota do parasito ocorre nos mamíferos onde a *Leishmania* spp encontra-se dentro dos macrófagos. Os flebótomos ingerem o parasito ao exercer o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. No inseto vetor, o protozoário transforma-se na forma promastigota que é inoculada na pele de um novo hospedeiro vertebrado no momento do hematofagismo.

## 1.4- Distribuição Geográfica e Prevalência

Com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob o risco de adquirir a infecção e uma estimativa de 500.000 novos casos anualmente, a LV apresenta distribuição cosmopolita

ocorrendo em 88 países e atualmente é endêmica em 65 destes. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 1996).

Nos últimos anos o perfil epidemiológico da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) no Brasil vem sofrendo profundas modificações. As alterações ambientais forçaram a adaptação do vetor ao ambiente urbano além da migração de uma grande parte da população rural para as grandes cidades (BRASIL, 2003).

Dentre as unidades federativas brasileiras que já relataram a presença da doença, o maior número de casos tem sido observado no Nordeste (ALVES e FAUSTINO, 2005), região que registra os maiores coeficientes de incidência desde a década de 90 (CAMARGO-NEVES, 2005).

Vale salientar que na região Nordeste, a ausência de uma política voltada à saúde pública, a ocorrência da fome, que se agrava nos períodos de estiagem, assim como a densidade de insetos vetores, e a presença do reservatório canino infectado (BADARÓ et al. 1996), geram entre outros problemas a subnutrição e a pobreza, condições estas fundamentais para instalação da LVA.

Sendo assim, os cães considerados principais reservatórios fora do ambiente silvestre são de grande importância na manutenção do ciclo da doença, em virtude destes animais apresentarem uma maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997) e sua transmissão para população canina e humana.

A região Nordeste é a maior detentora dos casos de LVA com 89% de notificações, seguida do Sudeste (6%), Norte (4%) e Centro Oeste (1%) (MONTEIRO et al. 1994). No Estado de Roraima, na região Norte, num inquérito realizado por Guerra et al. (2004), 10,4%

(392/3773) dos cães apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* sp através da ação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). No município de Araguaína, Estado de Tocantins, o perfil da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foi bem documentado por Gomes et al. (2005). Esses autores relataram a prevalência da infecção em cães domiciliados no período de 2001 a 2004, e observaram, índices de 1,6% em 2001, atingindo um nível máximo de 6,5% em 2002 e 2,4% em 2004. Nesta mesma região, Galvão et al. (2005) registraram uma taxa de infecção na zona urbana e rural que variou de 4,0% a 4,5% respectivamente.

No Nordeste, a maioria (66%) dos casos de LVA notificados ocorre nos Estados do Maranhão, Ceará, Bahia e Piauí (BRASIL, 2004). No Estado do Maranhão, incluído pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) como área prioritária para o controle da LVA, a infecção canina foi registrada nos municípios de São José de Ribamar (GUIMARÃES et al. 2005) e de Imperatriz, (BRAGA et al. 2005) onde a soroprevalência encontrada foi 23% e 46,6% respectivamente.

Estudos sobre a distribuição da LVC no Estado do Ceará revelaram a evolução da endemia, quando Alencar et al. (1956) observaram 8,2% dos cães infectados e Evans et al. (1992) detectaram 39% dos cães do município de Itapipoca, no mesmo Estado. Recentemente um estudo revelou que 2,26% dos cães do município de Fortaleza foram reagentes ao sorológico (FACO et al. 2005).

Apesar de relatos da frequência do calazar canino na Região Metropolitana da Cidade do Recife (RMR) (SILVA et al. 1999), até 2001, somente existiam estudos soropidemiológicos (LIMA JR et al. 2000) sem descrição de casos autóctones da doença em cães provenientes da Cidade do Recife.

Vários têm sido os relatos da LVC em áreas silenciosas para infecção humana. Desta forma, Paiva Cavalcanti et al. (2002) relataram pela primeira vez o calazar canino autóctone na

Cidade do Recife, assim como Albuquerque et al. (2005), que descreveram a LVC no município de Amaraji, microrregião Mata Meridional, do Estado de Pernambuco.

No município de São Vicente Ferrer, localizado na Mesorregião do Agreste, Microrregião do Médio Capibaribe do Estado, a prevalência da infecção canina variou de 4,8% a 33,3%, utilizando-se métodos sorológicos e moleculares respectivamente (CARVALHO et al. 2005). Neste mesmo Estado, França et al. (2003) obtiveram a frequência de 35,93% de positividade para LVC por meio da RIFI.

Segundo Lima et al. (2003) a distribuição da LVC na cidade de Maceió não esta restrita apenas as áreas litorâneas, como Riacho Doce e Ipioca, encontrando-se atualmente em processo de urbanização (COSTA et al. 2003).

A infecção canina também tem sido assinalada por Melo et al, (2004) na Cidade de Aracaju, Estado de Sergipe onde as taxas variaram entre 25% a 15,29% pelo ensaio imunoenzimático e RIFI respectivamente. Ainda na região Nordeste, em Jequié na Bahia, a frequência da infecção em cães por meio do ensaio imunoenzimático foi de 23,5% (PARANHOS-SILVA et al. 1996).

Em se tratando da região Centro Oeste, a prevalência do calazar canino variou de 7,8% em Poxoréo, MT (AZEVEDO et al. 2004), a 23,7% no município de Bonito (NUNES et al. 2001).

No Estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil, Iverson et al. (1983) encontraram uma prevalência na população canina de 2,5%. Coutinho et al. (1985) detectaram a prevalência de 4,3% da infecção canina no Estado do Rio de Janeiro, utilizando a RIFI e Cabrera et al. (2003) observaram que a soroprevalência da infecção canina em Barra de Guaratiba, área periurbana, situada no litoral da cidade do Rio de Janeiro após 12 meses de estudo, foi de 25,0%.

Baseado nos índices encontrados na literatura, a prevalência da LVC no Brasil variou de 2,5 % a 46,6% sendo que as taxas de infecção variaram na dependência das condições socioeconômicas, e perfil de transmissão em cada uma das regiões brasileiras.

### **1.5 – Sinais Clínicos**

A LVC é uma enfermidade sistêmica severa e em alguns casos fatal (ALEXANDRINO, 2001), sendo considerada como doença imunomediada devido às alterações na atividade das células T e B, o que provoca uma grande formação de imunocomplexos circulantes que se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos causando sinais clínicos como vasculite, uveíte, glomerulonefrite e artrite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NOLI, 1999). Contudo, segundo Marzochi et al. (1984) apenas uma parcela dos cães infectados desenvolvem doença clínica, na dependência da competência imunológica (MORENO et al., 1999) desses animais.

Em alguns cães uma resposta imune celular protetora controla a infecção, em outros uma doença lenta e progressiva se desenvolve (FERRER, 1999). Estes dois processos distintos dependem de fatores inerentes do parasito como a cepa, e aqueles referentes ao hospedeiro vertebrado como a constituição genética, estado nutricional e imunitário (EZQUERRA, 2001).

A imunidade à infecção dá-se através de duas populações de linfócitos distintos, T e B (LESER et al. 1985). A presença da resposta humoral está associada à doença clínica, enquanto que a resposta celular tem sido observada em animais assintomáticos (MORENO et al. 1999). Desta forma a resposta das células T pelo hospedeiro é decisiva para evolução da infecção (BIAZZONO, 2003). As células T auxiliar 1(Th1) iniciam a imunidade celular e as

células T auxiliar 2 (Th2) mediam a imunidade humoral cuja resposta imune efetiva a infecção é regulada pelos efeitos dos linfócitos Th1 (BIAZZONO, 2003).

O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final (FERRER., 1999). Sendo assim, os animais podem ser classificados em assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (BRASIL., 2004).

Classicamente os animais com LVC apresentam hepatoesplenomegalia, lesões de borda de orelha e focinho, acinesia e onicogribose (ALBUQUERQUE et al., 2005). Entre as alterações dermatológicas mais comuns, tem-se a alopecia local ou generalizada, lesões como dermatite esfoliativa e ulcerações crostosas em geral no focinho, orelhas e nas extremidades, descamação furfurácea (ALVES e FAUSTINO., 2005) hiperqueratose (BRASIL., 2004; BONATES., 2003), ceratite intersticial, despigmentação cutânea e pelame seco (SANTA ROSA e OLIVEIRA., 1997) entre outros sinais.

As oftalmopatias vem ocupando importante papel dentre os sinais clínicos da LVC onde o animal pode apresentar lesão uni ou bilateral (BRITO, 2004), ceratoconjuntivite (BRASIL, 2004), ceratoconjuntivite seca, ceratite ulcerativa e corioretinite (BRITO, 2004), blefarite, conjuntivite, ceratite, uveíte anterior e glaucoma secundário (FERRER, 1999).

Nas fases mais adiantadas da doença observa-se com grande frequência apatia, atrofia muscular particularmente da cabeça, coriza, linfadenopatia, onicogribose, edema de patas (BRASIL, 2004), edema do focinho<sup>1</sup>, problemas articulares como a poliartrite autoimune, polimiosite e lesões ósseas (DENEROLLE, 1996).

Outros sinais como linfadenomegalia, epistaxe, caquexia (FERRER et al. 1995), cardiopatias, disfunções respiratórias e digestivas, também tem sido assinaladas em animais

---

<sup>1</sup> Alves, L.C. Comunicação pessoal

com LVC, sendo a insuficiência renal, a principal causa de óbito (FERRER et al. 1995; RIBEIRO, 2005; BARROIUM-MELO et al, 2005).

## **1.6 – Diagnóstico**

O diagnóstico da LVC é complexo devido às suas características clínicas serem semelhante a várias outras doenças comuns, muitas inclusive que podem co-existir. Ainda, segundo Ferrer (2002), mais de 50% dos animais se mostram assintomáticos ao exame clínico.

As dificuldades na determinação da doença clínica direcionam o diagnóstico para os métodos laboratoriais, onde estão disponíveis métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. O método parasitológico baseia-se na demonstração do parasita a partir de material coletado proveniente de biópsia de medula óssea, raspados de pele, ou aspirados de baço e fígado (CARVALHO-NETA, 2004).

Ainda pode ser realizado o isolamento do agente em meio de cultura mediante diluição do material aspirado de medula óssea, baço e fígado em solução salina e inoculação no meio Novy, Mc Neal e Nicolle (NNN) e Liver Infusion Tryptofane (LIT), ou a inoculação intraperitoneal em animais de laboratório (SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Apesar da presença de uma única forma amastigota ser confirmatório para o diagnóstico da LVC, esse método além de ser pouco sensível, é invasivo e traumático, requerendo técnico treinado para a realização do isolamento, e leitura microscópica (SUNDAR e RAI, 2002).

A LVC é caracterizada por uma marcada estimulação policlonal de linfócitos B, o que resulta na grande produção de imunoglobulinas. Sendo assim, a detecção de anticorpos

circulantes através dos métodos sorológicos tem seu uso facilitado por serem menos invasivos e mais prático (GONTIJO e MELO, 2004).

Entre os métodos sorológicos destaca-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento (FC), teste de aglutinação direta (TAD) (BRASIL, 2003), Imunoeletroforese (FEITOSA et al. 2000), Immunoblot e Imunocromatografia (LIRA, 2005). Apesar de ser o método diagnóstico mais difundido, a RIFI apresenta reações cruzadas com outras doenças e possui baixa sensibilidade.

Apesar de apresentar baixa sensibilidade, a RIFI tem sido o teste recomendado para confirmação dos animais suspeitos (BRASIL, 2004), sendo considerada como padrão ouro tanto na LVA quanto na LVC (GRANDONI, 1999).

Por outro lado, o teste de ELISA é rápido e de fácil execução e leitura sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI (GONTIJO e MELO, 2004), ainda possui maior reprodutibilidade (MANCIANTI et al. 1995).

A especificidade do ensaio imunoenzimático depende do antígeno utilizado (SUNDAR e RAI, 2002) podendo este ser originado de culturas de promastigotas ou proteínas recombinantes (BADARÓ et al. 1996). Neste sentido, antígenos brutos de promastigotas ou seus extratos solúveis limitam a padronização dos testes e reprodutibilidade dos resultados (HOMMEL, 1978) enquanto que antígenos recombinantes específicos do parasita vêm mostrando elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LVC (SCALONE et al. 2002).

Um fator importante que deve ser levado em consideração na escolha do teste sorológico para LVC, é a evolução do quadro clínico dos cães infectados, o antígeno, além da subclasse da imunoglobulina a ser utilizado na realização do teste.

Segundo Mettler et al. (2005) o ensaio imunoenzimático tem sido capaz de detectar animais sororreagentes tanto naqueles com sinais clínicos aparentes como inaparentes, enquanto a RIFI detectou uma maior parcela de animais com clínica aparente do que aqueles onde não foram observados sinais característicos da doença

Apesar dos métodos moleculares serem mais modernos, e possuírem maior sensibilidade e especificidade, do que a RIFI e o ELISA (ROSYPAL et al, 2005), estes são normalmente complexos e laboriosos, não estando disponível para rotina clínica veterinária sendo apenas aplicados na pesquisa científica (IKONOMOPOLUS, 2003).

### **1.7- Referências**

ALBUQUERQUE, A.R. et al. Ocorrência da leishmaniose visceral canina no município de Amaraji, Estado de Pernambuco, Brasil. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito Santo. 2005

ALENCAR, J.E., CANTÍDIO, W.M., CAVALCANTE, D.N. Calazar em Fortaleza. XIII Congresso Brasileiro de Higiene, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1956.

ALEXANDRINO, A.C. **Diagnóstico e Controle da Leishmaniose Visceral - considerações sobre Pernambuco**.2001.Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

ALVES, L.C. ; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose visceral canina **Manual da Schering-Plough**, 2005, 14p.

ARIAS, J.R., MONTEIRO, P.S., ZICKER, F. The reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging infectious diseases**. v.2, n.2, p.145-146, 1996.

AZEVEDO, M.A.A. et al. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral canina em Poxoreo-MT **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

BADARO, R., BENSON, D., EULALIO, M.C. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.173, p.758-761, 1996.

BIAZZONO, L. Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia à *Leishmania* e das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 em cães de região endêmica para leishmaniose visceral. 2003. **Tese (Doutorado em Clínica Veterinária)**, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar) **Vet news**, London/New York, ano X, n. 61, jan /fev 2003.

BRAGA, G.M.S. et al. Frequência de anticorpos *anti-Leishmania* em cães do município de Imperatriz região Sudoeste do Maranhão, Brasil. **V Jornada de Pesquisa, Ensino e Extensão, UFRPE** 05-07 dezembro 2005, Recife –PE.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2004.

BRITO, F.L.C. **Alterações oculares e análise de humor aquoso em cães (*Canis familiares* Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e**

**Chagas, 1937**). 2004. 53f.Dissertação (Mestrado em ciência veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Leishmaniose Visceral Americana: doença emergente no estado de São Paulo.2005. Disponível em <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml> >. Acesso em 17 out 2005.

CABRERA, M.A.A. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, S. Paulo v.45, n.2, p.79-83, 2003.

CARVALHO, M.R. et al. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil.**XXI Reunião de Pesquisa aplicada em doenças de Chagas e Leishmanioses**.Uberaba-MG 21-23 outubro, 2005.

CARVALHO-NETA, A.V.C. Estabelecimento de uma nova metodologia aplicada ao diagnóstico da LVC baseada na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* por citometria de fluxo. 2004.**Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

COSTA, K.G.N., LIMA, F.S., SILVA-JÚNIOR, E.G. Identificação de casos de leishmaniose visceral canina através da técnica de imunofluorescência indireta. I jornada científica Universidade Federal de Alagoas. . **Annais...** Maceio-AL, 2003.

COUTINHO, S. G. et al. A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro where the human disease occurs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.80, p.17-22, 1985.

DAVIDSON, R.N. Canine leishmaniasis: an update. In : International canine Leishmaniasis Forum, 1999, Barcelona. **Proceedings of the International canine leishmaniasis forum.** Barcelona : Hoechst Roussel Vet. . p. 72-77, 1999.

DENEROLLE, P.H. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, Paris, v.31, p. 137-145, 1996.

EVANS, G.T. et al.. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. **Journal of Infectious Diseases.** v.166, p.1124-32. 1992

EZQUERRA, J. A. **Las Leishmaniasis: de la biología al control.** 2 ed. Madrid: laboratório Sutervet S/A, p.236, 2001.

FACÓ, P. E. G. et al.. A. Situação da leishmaniose visceral humana e canina no município de Fortaleza-CE em 2004. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária.** 27-30 novembro. Guarapari Espírito Santo. 2005

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

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **The Veterinary Record**, London, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

FERRER, L. Clinical Aspects of Canine Leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, Spain, P. 6-10, 1999.

FERRER, L. The pathology of canine Leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the second International canine Leishmaniasis Forum** Sevilla, Spain. p. 07-14, 2002.

FRANÇA, L.J.O., et al Freqüência da Leishmaniose visceral canina no município de Bezerros, Estado de Pernambuco, Brasil. **V Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária VI seminário Nordestino de caprino-ovinocultura**. Campus da UFRPE. Recife, 2003.

GALVÃO, S. B., GOMES, K. C., NUNES, R. M. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina (LVC) nas áreas urbana e rural no município de Araguaína, segundo estudo realizado em cães sintomáticos e assintomáticos durante a campanha de vacinação anti-rábica canina em 2003. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito santo. 2005.

GARCÍA-ALONSO, et al Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, n.18, p.617-623, 1996.

GOMES, K. C., et al Situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina no município de Araguaína no período de 2000 a 2004. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito santo. 2005

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

GRANDONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. Canine Leishmaniasis: an update. **Proceedings of the International canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain. P.32-39, 1999.

GUERRA, J.A. O., et al. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.4, p.305-311 July/Aug. 2004.

GUIMARÃES, K S. et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 305-309, 2005.

HOMMEL, M., et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.72, n. 3, p.213-218, 1978.

IVERSON L.B., CAMARGO M.E., VILLANOVA A. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo-Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo v.25, p. 310-317, 1983.

IKONOMOPOLUS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.113, p. 99-113, 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil- a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.100 p. 811-827, 2005.

LEVINE, N.D. et al. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 37-58, 1980.

LESER, W. et al **Elementos de epidemiologia Geral**. Livraria Atheneu, 1985, p. 106-108.

LIMA, F.S. et al. Estudo da Distribuição da Leishmaniose Visceral Canina nos Distritos Sanitários de Maceió. I jornada científica Universidade Federal de Alagoas. **Annais...** Maceio-AL, 2003.

LIMA JUNIOR, A. D. et al. A survey of canine leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: 45th Annual Meeting - **Proceedings of the American Association of Veterinary**

**Parasitologists**, 2000, Salt Lake City, Salt Lake City American Association of Veterinary Parasitologists, p. 32, 2000.

LIRA, R.A., **Diagnóstico da Leishmania Visceral Canina: avaliação do desempenho dos kits EIE–Leishmaniose–Visceral–Canina–Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose–Visceral–Canina–Bio-Manguinhos**. 2005 70f.Dissertação (Mestrado em Saúde Pública).Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE.

MANCIANTI, F. et al Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine Leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 13-21, 1995.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmaniose visceral canina no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”**, Rio de Janeiro, n.2, p. 12-21, 1984.

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

MELO, C.B. et al. Prevalência de anticorpos anti-Leishmania em cães em Aracaju, Sergipe. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and

gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.11, p.5515-9, 2005.

MONTEIRO, P., LACERDA, M.M., ARIAS, J.R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.27, p. 67-72, 1994.

MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunopathology**, Amsterdam, v.7, n.3/4, p. 181-195, Nov. 1999.

NOLI, C. Leishmaniosis Canina **Waltham International focus**, London, v.9, n 2, 1999.

NUNES, V.L.B., GALATI, E.A.B., NUNES, D.B. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.34, n.3, Uberaba May/June 2001.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Ocorrência de leishmaniose visceral canina na cidade do Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002 Rio de Janeiro. **Anais...Rio de Janeiro: SBP, 2002, I CD-ROM.**

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.55, n.1, p.39 – 44, 1996.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral canina. *Leishmune*, Manual Técnico. 2005. 52p.

ROSÁRIO, E.Y. et al. Evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as diagnostic marker for Canine Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.100, n.2, 197-203, april 2005.

ROSYPAL A.C. et al. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania (infantum) infantum*.

**Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5515-9, 2005.

SANTA-ROSA, I.C.A. ; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 11, p. 24-28, 1997.

SCALONE,A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K 39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation os a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 275-285, 2002.

SILVA, K.C., FAUSTINO, M.A.G., ALVES, L.C. Relação entre lesões cutâneas e diagnóstico laboratoriais para *Leishmania chagasi* na Região Metropolitana do Recife em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA 4, 1999, Recife. **Anais...Recife:SPEME**, 1999.p. 271-272.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V.9, n. 5, p.951-958, 2002.

WHO. Control of leishmaniasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Geneva. Technical report series 793. 1996.



## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - GERAL**

Estudar os aspectos clínicos, epidemiológicos e de diagnóstico em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

### **2.2 - ESPECÍFICOS**

- Diagnosticar casos de LVC na cidade do Recife.
- Relatar a ocorrência da LVC em Amaraji.
- Avaliar as características clínicas de cães com diagnóstico positivo para LVC na região metropolitana do Recife.
- Comparar dois sistemas ELISA no diagnóstico do calazar canino.

**CAPÍTULO 1**

**FREQUÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES NA  
CIDADE DO RECIFE.**

**FREQUENCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES NA  
CIDADE DO RECIFE.**

**RESUMO**

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma importante zoonose que pode apresentar grande contingente de animais assintomáticos. Até o presente, apenas uma ocorrência autóctone desta parasitose tem sido relatada na zona sul da Cidade do Recife. O objetivo deste trabalho foi diagnosticar casos de LVC neste município, empregando-se exames parasitológico e sorológico pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Dentre os 17 cães utilizados, 88.23% eram positivos, indicando um processo de expansão e urbanização desta enfermidade nesta cidade.

**ABSTRACT**

Canine Visceral Leishmaniasis is an important zoonosis which may present a large number of asymptomatic animals. Currently, one autoctone report of this parasitose was registered in the south area of Recife. The aim of this work was to diagnose CVL cases in this municipality using parasitological and serologic exams trough the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A positive result was observed in 88.23% (15/17) dogs indicating an expansion and urbanization process in Recife City.

## FREQUENCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES NA CIDADE DO RECIFE

### 1- Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de distribuição cosmopolita com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob o risco de adquirir a infecção. No Brasil a doença encontra-se relatada em 19 unidades federativas, sendo que o maior número de casos foi observado no Nordeste do país (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

Duas décadas após o registro da primeira epidemia urbana em Teresina PI, o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades da região Nordeste (São Luís, Natal, Aracaju, Fortaleza, Salvador), Norte (Boa Vista, Palmas, Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros) e Centro Oeste (Cuiabá e Campo Grande) (BRASIL, 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais importante que a infecção humana, pois a precede, além de ser mais prevalente e apresentar grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitos na derme (BONATES, 2003). Sendo assim, em áreas endêmicas para Leishmaniose Visceral Americana (LVA), os cães domésticos representam o principal reservatório para a infecção por *Leishmania* sp (PARANHOS-SILVA et al, 1996).

Em Pernambuco, os dados mostraram que o perfil epidemiológico do calazar humano também tem mudado durante os últimos anos, onde era uma doença praticamente exclusiva das áreas rurais e atualmente vem se difundindo e tornando-se cada vez mais comum em áreas urbanas (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2005).

Apesar de relatos da frequência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) na região metropolitana do Recife (SILVA et al., 1999), até 2001, somente existiam estudos soroepidemiológicos na cidade do Recife (LIMA Jr. et al. 2000).

Em 2002, foi relatada a ocorrência autóctone da LVC na zona sul da Cidade do Recife (PAIVA CAVALCANTI et al., 2002), o que mostra a expansão da doença para área urbana. Entretanto, a caracterização do agente foi demonstrada mais tarde através de anticorpos monoclonais (BRITO et al., 2005).

O diagnóstico de confirmatório na LVC é confuso sendo o método mais seguro o parasitológico através da detecção do parasita. Entretanto, este método esbarra na falta de praticidade e baixa sensibilidade. Por outro lado, os métodos moleculares de diagnóstico apesar de possuir alta sensibilidade e especificidade, são normalmente utilizados apenas em instituições de pesquisa. A sensibilidade do exame parasitológico torna os métodos sorológicos essenciais no diagnóstico da LVC. Apesar do teste de imunofluorescência indireta (RIFI) ser o método recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2003) para confirmar animais suspeitos, o teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) vem sendo utilizado na rotina veterinária pela sua automação e praticidade (ROSÁRIO et al. 2005).

Em virtude do crescente número de casos nesta região, o objetivo deste trabalho foi diagnosticar casos de LVC na cidade do Recife, utilizando-se o método parasitológico e sorológico.

## **2 - Material e Métodos**

### **2.1 - Local do estudo**

A cidade do Recife localiza-se a 8°04'48'' Sul da Latitude Meridional e a 34°55'11'' Oeste de Greenwich (VESPEL et al, 1997), possui clima tropical quente-úmido, com temperatura anual na faixa de 25,4° C e amplitude de oscilação em torno de 2,8° C (ATLAS AMBIENTAL DA CIDADE DO RECIFE, 2000).

### **2.2 – Animais**

Foram utilizados 142 cães de ambos os sexos, de raças e idades variadas, domiciliados na cidade do Recife, atendidos no ambulatório de Leishmaniose do Hospital Veterinário (LHV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) no período de fevereiro a novembro do ano de 2005.

Inicialmente foi realizada anamnese, com obtenção de dados referentes ao seu estado geral, raça, sexo, idade, porte e evolução do processo bem como dados referentes ao proprietário e ao animal. Realizou-se ainda exame físico de rotina através da inspeção da pele e anexos e palpação de linfonodos regionais.

### **2.3 - Diagnóstico Parasitológico e Sorológico**

O exame parasitológico foi realizado através de biópsia de medula óssea, onde após antissepsia foi realizada punção na crista do osso esterno utilizando-se seringas<sup>1</sup> e agulhas

descartáveis<sup>2</sup>. Deste material obtido, foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro os quais foram corados pelo método Panótico e observadas à microscopia ótica.

Para o exame sorológico foi realizada coleta de sangue através da venopunção da veia cefálica, com o auxílio de uma agulha 25 x 7 mm<sup>3</sup> acoplada a uma seringa de 5 mL<sup>4</sup> O soro obtido foi acondicionado em tubos plásticos previamente identificados e armazenado a temperatura de -20°C.

O teste de ELISA foi realizado através do kit EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos, lote 053E10027 utilizando o antígeno solúvel de formas promastigotas de *Leishmania major-like*, segundo as instruções do fabricante, no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação do Instituto Oswaldo Cruz (Cpqam/FIOCRUZ).

## **2 - Resultados e Discussão**

Dos 142 animais atendidos no ambulatório, 11,97% (17/142) eram provenientes da cidade do Recife e foram então incluídos neste estudo, sendo o restante proveniente da Região Metropolitana do Recife ou outras cidades do interior do Estado. As análises parasitológicas mostraram a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos esfregaços do material obtido através da biópsia de medula óssea em 23,52% (04/17) destes animais. Esse método assegura a identificação direta do parasito livre ou no interior de macrófagos (LOSOS, 1986; FERRER, 1999) e, se realizado de maneira apropriada e ( VIDE PG 27 SALVO SEPARADO ).

minuciosa, torna-se altamente específico (HAMIDAH et al. 1995). A principal desvantagem do método parasitológico é a baixa sensibilidade para amostras colhidas de medula óssea, além de ser invasivo (SUNDAR e RAI, 2002).

Os resultados parasitológicos aqui obtidos foram superiores aqueles registrados por Paiva Cavalcanti (2004) que observou a frequência de 2,8% (n = 50) de positividade nos cães da RMR. Por outro lado, foram inferiores aqueles observados por Gurgel e Pena (1995) que utilizando 28 cães da Região Metropolitana do Recife (RMR) observaram 28,57% de positividade e Anderlini (2003) que relatou a frequência de 80% de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* provenientes da RMR. A falta de concordância entre os diversos autores pode ser devido principalmente ao estágio da infecção, o número de amostras e a própria sensibilidade deste tipo de exame, como assegura Ferrer (1999).

Neste estudo, foi detectada a presença de anticorpos circulantes em 88,23% (15/17) dos animais, sendo estes considerados positivos a infecção. Estes dados são mais elevados do que outros referidos para a região nordeste cuja prevalência tem variado entre 2,26% e 46,6% (ALENCAR et al. 1956; EVANS et al. 1992; PARANHOS-SILVA, 1996; MELO et al. 2004; GUIMARÃES et al. 2005; BRAGA, et al. 2005; CARVALHO et al. 2005; FACO et al. 2005). A prevalência de LVC em outras regiões do Brasil, também tem sido descrita com níveis mais baixos do que as encontradas neste trabalho. Na região Centro Oeste foram registrados 7,8% (NUNES et al. 2001) e 23,7% (AZEVEDO et al, 2004), enquanto na região Sudeste, Iverson et al. (1983) descreveram uma prevalência de 2,5%, Coutinho et al. (1985) 4,3% e Cabrera et al. (2005) 25%. Uma possível explicação para a maior frequência aqui encontrada deve-se ao fato de que, apesar dos animais serem residentes da Cidade do Recife, foram provenientes de amostra estratificada e não de

amostra populacional. Deve-se ainda considerar que, Segundo Mettler et al (2005) o ensaio imunoenzimático apresenta a capacidade de detectar animais sororreagentes, independentemente da fase de evolução da doença.

Quando comparado o diagnóstico parasitológico e sorológico, o índice kappa encontrado no presente trabalho foi de 0,505, a sensibilidade de 65,78% e especificidade de 85,57%, com intervalo de confiança de 95%. A discrepância entre os resultados parasitológico e sorológico, representada pelo baixo índice kappa, pode decorrer da alta sensibilidade apresentada pelo teste imunológico. Desse modo, o método parasitológico não é adequado para diagnóstico individual (FERRER, 1999), sendo os testes imunológicos mais utilizados, pois a LVC é caracterizada por uma grande estimulação policlonal de linfócitos B e como conseqüência, grande produção de anticorpos (MELO, 2004).

Os 15 animais positivos apresentados neste estudo residiam em diferentes áreas da cidade do Recife, sendo três provenientes da Região Político Administrativa (RPA) noroeste, nove provenientes da RPA oeste e três provenientes da RPA Sul (Figura 1).

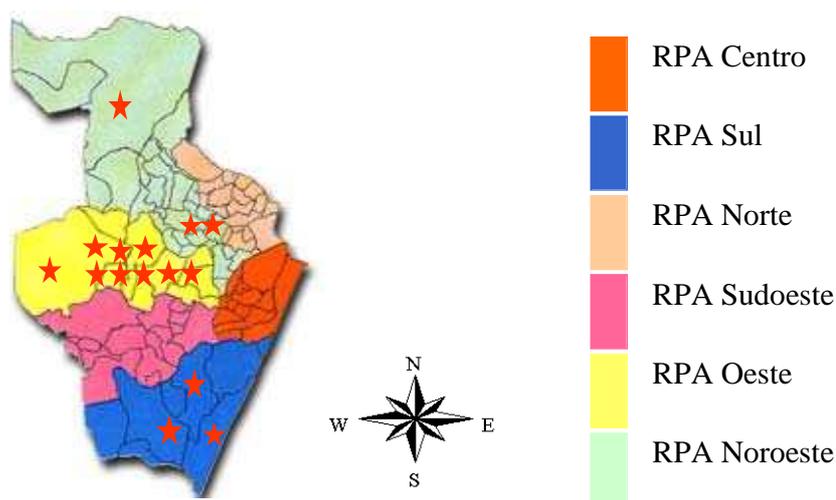


Figura 1. Localização das áreas com diagnóstico da Leishmaniose visceral canina na Cidade do Recife. Recife, 2004. Fonte

A RPA Noroeste acolhe 20 % da população do município do Recife, tendo uma população de 1.422.905 habitantes com sua geografia caracterizada pela presença de morros. A RPA Oeste é a menos pobre das RPAs é composta por 18% da população. A RPA Sul é a mais populosa com 25% da população.

A expansão da LVC em Recife fica evidente quando se avalia o número de casos observados em 2002 e compara-se aos casos de 2005. Após a primeira descrição de caso autóctone de calazar canino na cidade do Recife, em um intervalo de aproximadamente três anos houve um significativo aumento (PAIVA CAVALCANTI et al., 2002). É provável que tanto esta elevação do número de casos de LVC e sua expansão se deram em virtude da modificação do padrão de transmissão, antes restrita a zonas rurais (GONTIJO e MELO, 2004).

As taxas de urbanização da doença têm aumentado sem que ocorra a diminuição das taxas nas zonas rurais. Pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo, pouco se sabe da epidemiologia do calazar nos focos urbanos. As relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano, parecem ser mais complexas que no rural (MELO, 2004).

Vale salientar ainda que o inseto transmissor é encontrado com mais frequência em lugares com abundância de rochas. Ele invade facilmente o peri-domicílio, o interior de residências humanas e abrigos de animais domésticos, adaptando-se a variadas temperaturas (BRASIL, 2003).

Em Pernambuco, apesar de mais de 30 espécies, terem sido encontradas, apenas a *Lutzomyia longipalpis* é apontada na transmissão do calazar (ANDRADE et al, 1999). Contudo, apesar da descrição de um exemplar de *L. longipalpis* macho (OLIVEIRA, 1978), até o momento não foi registrada a presença do vetor da LVC na cidade do Recife.

#### 4 - Conclusão

Os dados obtidos permitem sugerir que a LVC também se encontra em processo de expansão e urbanização na cidade do Recife, seguindo a tendência nacional.

#### 5 - Referências

ALENCAR, J.E., CANTÍDIO, W.M., CAVALCANTE, D.N. Calazar em Fortaleza. XIII Congresso Brasileiro de Higiene, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1956.

ALVES, A.W. ; BEVILAQUA, 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.259-265, jan/fev 2004.

ANDERLINI, G.A., **Perfil Hematológico e mielograma de cães (*Canis familiares*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania* sp. provenientes da Região Metropolitana do Recife**. 2003. 24f Dissertação ( Mestrado em ciência veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

**Atlas Ambiental da Cidade do Recife**. Prefeitura da Cidade do Recife, 2000, 151 p

AZEVEDO, M.A.A., DIAS, A.K.K., PAULA, H.B. et al Epidemiologia da Leishmaniose Visceral canina em Poxoreo- MT **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar) **Vet news**, London/New York, ano X, n. 61, jan /fev 2003.

BRAGA, G.M.S. et al. Freqüência de anticorpos *anti-leishmania* em cães do município de Imperatriz região Sudoeste do Maranhão, Brasil. V JORNADA DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, UFRPE 05-07 dezembro 2005, **Anais...** Recife.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE.**Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2004.

BRITO, M.E.F. et al.Caracterização de *Leishmania (L.) chagasi* em isolados de cães com leishmaniose visceral na região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil.**XIX Reunião de pesquisa em Doença de Chagas e Leishmanioses**. Uberaba-MG 2005.

CABRERA, M.A.A. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, S. Paulo v.45, n.2, p.79-83, 2003.

CARVALHO, M.R. et al. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. **XXI Reunião de Pesquisa aplicada em Doenças de Chagas e Leishmanioses**.Uberaba-MG 21-23 outubro, 2005.

COUTINHO, S. G. et al A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro where the human disease occurs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.80, p.17-22, 1985.

DANTAS-TORRES F. ; BRANDÃO-FILHO S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 38, p. 411-412, 2005.

EVANS,G.T. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**. v.166, p.1124-32. 1992

FACÓ, P. E. G. et al.. A. Situação da leishmaniose visceral humana e canina no município de Fortaleza-CE em 2004. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito Santo. 2005

FERRER, L. Clinical Aspects of Canine Leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, P. 6-10,1999.

GONTIJO, C.M.F. ; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

GUIMARÃES, K S., et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 305-309, 2005.

GURGEL, A. ; PENA, E. J. M. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina através de IFI e exames parasitológicos em cães da região metropolitana do Recife. V CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE Recife-PE, **Anais...** p. 144, 1995.

HAMIDAH, N.H., CHEONG, S.K., ABU HASSAN, J.A., A case of Kala-azar diagnosed by bone marrow aspiration. **Malaysia Journal Pathology**, Kuala Lumpur, v.17, n.1, p.39-41, 1995.

IVERSON L.B., CAMARGO M.E., VILLANOVA A. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo-Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo v.25, p. 310-317, 1983.

LIMA JUNIOR, A. D.et al A survey of canine leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: 45th Annual Meeting - **Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitologists**, 2000, Salt Lake City, Salt Lake City American Association of Veterinary Parasitologists, p. 32, 2000.

LOSOS, G.J. Infectious tropical diseases of domestic animals. **International Development Research Centre**, Ottawa, 938p, 1986.

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e perspectivas. XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & I SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE RICKETIOSES, Ouro Preto, MG. **Anais...** p. 41-45, 2004.

METTLER, M. et al Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.11, p.5515-9, 2005.

NUNES, V.L.B., GALATI, E.A.B., NUNES, D.B., Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n.3, Uberaba May/June 2001.

OLIVEIRA, M.H.C. et al. Flebotomíneos gênero Lutzomia França, 1924 da região metropolitana do Recife (Díptera-Psychodidae). **Anais da Universidade Federal de Pernambuco** 2/3: 45-82, 1977/1978.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Ocorrência de leishmaniose visceral canina na cidade do Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: SBP, I CD-ROM 2002.

PAIVA CAVALCANTI, M. Infecções Micóticas em lesões cutâneas de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. In: VI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE Recife, PE **Anais...** Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 255, 2002

PAIVA CAVALCANTI, M., **Intercorrência entre agentes micóticos, bacterianos e parasitários em lesões cutâneas de cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral canina**. Dissertação de Mestrado, Recife-PE, 2004.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.55, n.1, p.39 – 44, 1996.

ROSÁRIO, E.Y. et al. Evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as diagnostic marker for Canine Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.100, n.2, 197-203, april 2005.

SILVA, K.C; FAUSTINO, M.A.G; ALVES, L.C. Relação entre lesões cutâneas e diagnósticos laboratoriais para *Leishmania chagasi* na Região Metropolitana do Recife em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Recife. **Anais...** Recife: SPEMEV, p.271-272, 1999.

SUNDAR, S. ; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.9, n. 5, p.951-958, 2002.

VESPEL, F. BENEDETTO C., PACIONE R Water Vapor Retrieval by GNSS Radio Occultation Technique with no External Information.

[http://www.cosmic.ucar.edu/aug2002workshop/abstracts/vespe\\_abs.doc](http://www.cosmic.ucar.edu/aug2002workshop/abstracts/vespe_abs.doc). 1997

## **CAPÍTULO 2**

### **OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE AMARAJI, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

**OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE  
AMARAJI, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.**

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi relatar o caso de um cão fêmea, da raça Pointer, com diagnóstico parasitológico positivo para Leishmaniose visceral, proveniente do município de Amaraji, Litoral Sul do Estado de Pernambuco. Baseado nos achados clínicos e no diagnóstico parasitológico sugere-se avaliar a situação epidemiológica do município.

**ABSTRACT**

The aim of this work was to report a case of a female pointer, with positive diagnosis for zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL), from the Amaraji County, in the south cost of Pernambuco state. According to the clinical findings and parasitological diagnosis, epidemiological situation of American Visceral Leishmaniasis in this county must be evaluated.

## OCORRÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE AMARAJI, ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL.

### 1 - Introdução

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou calazar é uma antropozoonose de distribuição cosmopolita com ocorrência em 88 países dos quais 72 fazem parte do grupo em estado de desenvolvimento. Aproximadamente 500 mil pessoas padecem da doença com 90% dos casos concentrados em Bangladesh, Sudão, Índia, Nepal e Brasil.

Atualmente aproximadamente 1600 municípios brasileiros apresentam transmissão autóctone (WHO, 2002; BRASIL, 2003).

A infecção é causada por protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*, que nas Américas é ocasionada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2003). Entretanto, com base nos perfis isoenzimáticos as diferenças entre as duas espécies são tão pequenas que não permitem identificá-las como espécies distintas (MAURÍCIO et al., 2000).

As características epidemiológicas da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no Brasil têm mostrado diferentes perfis associados ou não a problemas sócio-econômicos e sanitários, o que diferencia sensivelmente a região nordeste das outras regiões como sudeste e centro-oeste. Ainda, alterações no perfil de transmissão tem sido observadas na epidemiologia do calazar canino, inicialmente predominadas por características de

ambientes rurais e periurbanas e mais recentemente em alguns centros urbanos aonde os cães vem atuando como principal reservatório desta zoonose (PARANHOS-SILVA, et al. 1996).

Não obstante o perfil epidemiológico da doença, os sinais clínicos da LVC iniciam-se geralmente de forma inespecífica por alterações dermatológicas e fônos (CIARAMELLA et al. 1997; FEITOSA et al. 2000), seguido por linfadenomegalia, epistaxe, caquexia (FERRER et al. 1995) além de distúrbios renais, hepáticos, gastrintestinais e locomotores (FEITOSA et al. 2000).

Ainda tem que se considerar que os aspectos clínicos observados estão diretamente relacionados com a resposta imune, particularmente da interação de linfócitos T e suas subpopulações (Cluster of Differentiation Antigen 4- CD 4) e evidenciando que animais com decréscimo de linfócitos T auxiliar 2 (Th2) apresentam maior susceptibilidade a infecção e conseqüentemente quadro clínico aparente (MORENO et al. 1999; PINELLI et al. 1994).

Assim como em outras áreas brasileiras, o calazar canino encontra-se em expansão no Estado de Pernambuco (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2005), todavia a ausência de estudos epidemiológicos principalmente na área litorânea dificultam um plano de controle mais efetivo do calazar.

O presente trabalho teve como objetivo relatar um caso autóctone de LVC no município de Amaraji, microrregião da Mata Meridional do Estado de Pernambuco.

## **2- Material e Métodos**

### **2.1- Descrição do paciente**

Um animal fêmea da raça pointer, adulta, proveniente do Município de Amaraji, localizado no litoral sul do Estado de Pernambuco (Latitude 8° 24' 0" Sul e longitude 35°27' 0" Oeste), foi atendido, no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco com sinais clínicos sugestivos de LVC.

Procederam-se inicialmente a anamnese com obtenção de dados referentes ao local de procedência e possíveis condutas terapêuticas. Ato contínuo realizou-se o exame físico observando-se a presença ou não de alterações clínicas sugestivas de LVC. O exame oftálmico foi procedido seguindo a semiotécnica oftálmica rotineira.

## **2.2- Diagnóstico Parasitológico**

A pesquisa parasitológica foi realizada através da biópsia de medula óssea por punção esternal, além de raspados de pele integra e lesionada com auxílio de lâminas de bisturi<sup>1</sup>. Foram feitos esfregaços do material obtido em lâminas de vidro para microscopia que após secagem foram fixados em álcool metílico e corados pelo método de coloração rápida panótico<sup>2</sup> e examinados em microscópio óptico.

## **2.3- Diagnóstico Sorológico**

Foi colhido aproximadamente cinco mL de sangue por venopunção da veia cefálica. Após coagulação o soro foi acondicionado em tubos plásticos<sup>3</sup> identificados e armazenados em temperatura de -20°C para posterior uso. O teste de ELISA foi realizado segundo as instruções do Kit EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos no Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco.

### 3 - Resultados e Discussão

Ao exame clínico, áreas de alopecia, úlceras cutânea, além de onicogribose, linfadenomegalia, emagrecimento, além de hiperemia conjuntival com secreção ocular bilateral mucopurulenta, uveíte anterior com presença de *flare*, borda pupilar irregular, e ceratite bilateral com vascularização foram observadas.

O resultado do exame parasitológico mostrou-se positivo para presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. O teste ELISA não evidenciou presença de anticorpos circulantes.

Os sinais clínicos observados no animal em questão são compatíveis com aqueles apresentados nos cães com calazar (NOLI, 1999; BRITO, 2004), particularmente as alterações dermatológicas e onicogribose (CIARAMELLA et al. 1997; FEITOSA et al. 2000) assim como linfadenomegalia (FERRER et al. 1995).

No que concerne às alterações oftálmicas aqui observadas, estão de acordo com aqueles achados relatados por Brito (2004) quando observou que 76% dos cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* apresentaram lesões oculares ao exame oftálmico.

Segundo Losos (1986) o diagnóstico da LVC realiza-se pela demonstração de formas amastigotas, sendo esta forma considerada segura e definitiva não obstante a sensibilidade técnica. A presença de um único parasita é confirmatório para esta doença (SUNDAR e RAI, 2002).

Apesar da alta sensibilidade e especificidade que o ELISA apresenta, reações falso negativas tem sido demonstradas (FERRER et al. 2005). É provável que fatores relacionados

a exaustão da resposta imune, notadamente aqueles relacionados com linfócitos T e CD4 sejam responsáveis pela supressão da resposta imune.

#### **4 - Conclusão**

Como os casos humanos são precedidos pelo calazar canino faz-se necessário inquéritos epidemiológicos na população canina e humana para adoção de medidas de controle no município de Amaraji.

#### **5 - Referências**

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRITO, F.L.C. **Alterações oculares e análise de humor aquoso em cães (*canis familiares*) (Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) chagas* (Cunha e Chagas, 1937)**. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.22, 1997.

DANTAS-TORRES F. ; BRANDÃO-FILHO S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, p. 411-412, 2005.

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

FERRER, L., et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v. 136, n. 20, p. 514-516, 1995.

LOSOS, G.J. Infectious tropical diseases of domestic animals. **International Development Research Centre**, Ottawa, 1986. 938p.

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

MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunopathology**, Amsterdam, v.7, n.3/4, p. 181-195, Nov. 1999.

NOLI, C. Leishmaniosis Canina **Waltham International focus**, London, v.9, n 2, 1999.

PARANHOS-SILVA, M., et al. A cross sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.55, n.1, p.39 – 44, 1996.

PINELLI E, et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectious Immunology** v.6, p.229-235, 1994.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V.9, n. 5, p.951-958, 2002.

WHO. Control of leishmaniasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Geneva. 2002.

### **CAPÍTULO 3**

**ASPECTOS CLÍNICOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi* NA REGIÃO METROPOLITANA DO  
RECIFE**

**ASPECTOS CLÍNICOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi* NA REGIÃO METROPOLITANA DO  
RECIFE**

**RESUMO**

Neste trabalho foram descritos os achados clínicos observados em 36 cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. da Região Metropolitana do Recife. Os animais foram submetidos a exames parasitológico e sorológico pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Os sinais clínicos mais frequentes foram as úlceras cutâneas, seguido de onicogribose, perda de peso, linfadenomegalia e oftalmopatias. Sugere-se que em áreas endêmicas para Leishmaniose visceral canina (LVC), os animais que apresentam esses sinais clínicos devam ser investigados quanto à infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

**ABSTRACT**

The clinical findings observed in 36 naturally infected by *Leishmania* sp. from the Metropolitan region of Recife are described. The animals were submitted to parasitological and serological exams through the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The most frequent clinical findings were onychogriphosis, weight loss, lymphadenomegaly and

ophthalmopathies. It is suggested that in Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) endemic areas, animals presenting these symptoms must be investigated for *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection.

**ASPECTOS CLÍNICOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR  
*Leishmania (Leishmania) chagasi* NA REGIÃO METROPOLITANA DO  
RECIFE**

**1 – Introdução**

A *Leishmania (L.) chagasi* é o agente da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) também conhecida como calazar (WHO, 1990), cuja espécie canina é considerada o principal reservatório urbano deste parasito (ASHFORD et al. 1998). No Brasil, a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) varia de 2,5% a 46,6% em áreas endêmicas (ALBUQUERQUE et al. 2006). Entretanto, estudos prévios levam à conclusão de que a prevalência e incidência tenham sido até hoje subestimadas (CABRAL et al. 1998).

Cães infectados por *L. chagasi* podem apresentar manifestações clínicas diversas sendo que a resposta imune do hospedeiro determina o tipo de síndrome resultante da infecção. Desta forma é possível classificar os cães como assintomáticos, oligosintomáticos ou sintomáticos (SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Classicamente a LVC apresenta sinais inespecíficos como lesões cutâneas, principalmente descamação, eczema, alopecia, úlceras de pele, pêlos sem brilho, nódulos subcutâneos, emagrecimento, apatia, febre irregular, coriza, ceratoconjuntivite, onicogribose, linfadenopatia, edema, diarreia, hemorragia intestinal, esplenomegalia e hepatomegalia,

entre outros (CIARAMELLA et al. 1997; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; NOLI, 1999; FEITOSA et al. 2000; BONATES, 2003; BRASIL, 2004; PAIVA CAVALCANTI et al. 2005).

Esta ampla variedade de sinais clínicos torna o diagnóstico clínico difícil, sendo necessário o auxílio de outros métodos diagnósticos, quer seja parasitológicos, sorológicos ou moleculares para a sua segura realização do diagnóstico (FERRER, 1999).

O objetivo deste trabalho foi relatar as características clínicas de cães com diagnóstico positivo LVC na Região Metropolitana do Recife (RMR).

## **2 - Material e Métodos**

### **2.1- Animais**

Foram utilizados neste estudo, 142 cães de raças e idades variadas, de ambos os sexos e domiciliados na Região Metropolitana do Recife. Estes cães foram submetidos a uma avaliação clínica por médicos veterinários de clínicas particulares ou do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao apresentarem suspeita de calazar eram encaminhados ao ambulatório de Leishmaniose do referido hospital para realização do exame.

Inicialmente foi realizada anamnese de cada animal, com obtenção de dados referentes ao seu estado geral, raça, sexo, idade, porte e evolução do processo bem como dados referentes a sua procedência. Realizou-se ainda exame físico de rotina através da inspeção da pele e anexos e palpação dos linfonodos regionais.

### **2.2- Diagnóstico parasitológico**

O exame parasitológico foi realizado através de biópsia de medula óssea, onde após anti-sepsia foi realizada punção na crista do osso esterno utilizando-se seringas<sup>1</sup> de 20 ml e agulhas<sup>2</sup> 40 X 12mm descartáveis. Deste material obtido foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro os quais foram corados pelo método Panótico<sup>3</sup>.

### 2.3- Diagnóstico sorológico

Para o exame sorológico foi realizada coleta de sangue através da venopunção da veia cefálica, com o auxílio de uma agulha<sup>4</sup> 25 x 7 mm acoplada a uma seringa<sup>5</sup> de 5 ml. O soro obtido foi acondicionado em tubos plásticos<sup>6</sup> previamente identificados e congelados a temperatura de -20°C. A pesquisa de Anticorpos anti-*Leishmania* foi realizado através dos testes de ELISA pelo kit EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos, lote 053E10027 que utiliza antígeno solúvel de formas promastigotas de *Leishmania major-like*. O teste foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação do Instituto Oswaldo Cruz (Cpqam/FIOCRUZ).

### 3 - Resultados e Discussão

Dos 142 animais atendidos no ambulatório de leishmaniose da UFRPE, 25,35% (36/142) apresentaram um ou mais sinais clínicos sugestivos de LVC e foram então incluídos neste estudo. O restante dos cães apresentavam-se assintomáticos no momento do exame clínico. Os sinais clínicos apresentados por cada animal encontram-se na Tabela 1. Neste estudo foram diagnosticados 50,0% (18/36) de animais positivos ao teste parasitológico e 77,7% (28/36) positivos no teste sorológico.

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa dos sinais clínicos encontrados nos animais positivos para Leishmaniose Visceral Canina na Região Metropolitana do Recife, 2006

Sinal clínico	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Úlcera Cutânea	29	80,6
Onicogribose	21	58,3
Descamação Cutânea	02	5,6
Nódulo	01	2,8
Perda de Peso	18	50,0
Oftalmopatia	16	44,4
Linfoadenopatia	14	38,9

Epistaxe	06	16,7
Artropatia	05	13,9
Edema	01	2,8

Os sinais clínicos mais freqüentes foram as úlceras cutâneas, seguido de onicogribose, perda de peso, linfadenomegalia e oftalmopatias, o que corrobora com Albuquerque (2005) e Alves e Faustino (2005), que asseguram ser as dermatopatias e onicogribose sinais observados em animais com LVC, assim como Morais et al. (2003) que descreveram a perda de peso, lesões de pele e oftalmopatia em cães da RMR como principais sinais clínicos, embora esses autores não tenham registrado a freqüência, o que dificulta uma comparação com os dados do presente estudo.

Da mesma forma os dados referentes à presença de úlceras na pele aqui observados, são próximos daqueles resultados descritos por Almeida et al. (2005), que relataram a freqüência de 80% desta dermatopatia em cães no Estado de Pernambuco. Contudo, a freqüência desta lesão cutânea observada no presente estudo foram inferiores aquelas observadas por Ciaramella et al. (1997), Marzochi et al. (1985) e Natami et al. (2000) que relataram lesões dermatológicas em 40%, 3% e 8% respectivamente dos animais com infecção natural por *Leishmania* sp. Apesar da úlcera cutânea não ser um sinal clínico patognomônico da LVC, a razão para o aparecimento das úlceras pode ser devido à resposta do hospedeiro vertebrado à infecção, além da ação direta do parasito e a vasculite necrosante causada por deposição de imunocomplexos (NOLI, 1999). Sendo assim, a multiplicação das formas amastigotas produz um processo inflamatório com atração de novas células para o sitio da infecção gerando um infiltrado inflamatório composto por linfócitos e macrófagos o que leva à formação e aparecimento de um nódulo. O processo se expande pela multiplicação do parasita em novas células, agravando o processo inflamatório, levando à ulceração superficial da pele. Segue-se necrose da epiderme e da membrana basal que culmina com uma lesão úlcero crostosa (RIBEIRO, 2005).

Analisando os dados aqui encontrados referentes à onicogribose, observa-se que o crescimento das unhas esteve presente 58,3% (21/36) dos animais deste estudo. Segundo Marzochi et al. (1985), a onicogribose dá-se

devido ao estímulo pelo parasita à matriz ungueal, mas também deve ser considerado que a hipertrofia se deva ao menor uso das unhas por causa da apatia apresentada pelo animal, sendo este sinal não considerado patognomônico.

Os achados de onicogrifose nos animais com infecção natural por *Leishmania* sp, variam muito (MARZOCHI et al. 1985; CIARAMELLA, et al. 1997; FEITOSA et al. 2000; NATAMI et al. 2000; ALMEIDA et al. 2005; PAIVA CAVALCANTI et al. 2005), notadamente de acordo com a fase de evolução da doença, sendo impreciso sua comparação com outros achados na literatura.

As oftalmopatias aqui relatadas (44,4%) são superiores aos achados encontrados na literatura, a citar 33,3%, 29%, 19%, 15%, 16%, e relatados por Paiva Cavalcanti et al. (2005), Feitosa et al. (2000), Barrouin-Melo et al. (2006), Natami et al. (2000) e Ciaramella, et al. (1997) respectivamente. Os diferentes achados na literatura podem provir da não uniformidade do exame oftálmico.

Com relação à perda de peso, 50,0% (18/36) dos cães do presente estudo apresentaram esse sinal. Estes dados são superiores a vários descritos na literatura como Marzochi et al. (1985) que observaram perda de peso em 6%, dos animais acometidos por LVC, Ciaramella et al. (1997) e Natami et al. (2000) que observaram 17% e 32 % de cães com calazar que apresentavam emagrecimento, além de Feitosa et al. (2000) e Barrouin-Melo et al.(2006) que registraram redução no peso em 47% dos animais com LVC. Contudo, dados relativos ao emagrecimento deste estudo foram inferiores aqueles descritos por Paiva Cavalcanti et al (2005) que identificaram a perda de peso em 63,9% em cães na RMR. Da mesma forma que comentado anteriormente para outros sinais clínicos, a razão para estas diferenças pode ser devido a fase de evolução doença.

No que se refere a epistaxe, 16,7% (6/36) dos animais apresentaram este tipo de sangramento, sendo a sua presença reportada por Feitosa et al (2000), em apenas 3% de animais em seu estudo. Apesar da literatura reportar trombocitopenia em cães com doença clínica severa (CIARAMELLA et al., 1997) e conseqüente episódios de epistaxe, deve-se considerar que a associação da presença de hematozoários pode ser responsável por este tipo de quadro observado.

Neste trabalho, a linfadenopatia associada a LVC foi observada em 38,9% (14/36) dos animais. O achado de infartamento ganglionar nos animais com infecção natural por *Leishmania* sp variam muito (MARZOCHI et al., 1985; CIARAMELLA et al., 1997; NATAMI et al., 2000; PAIVA CAVALCANTI et al., 2005; FEITOSA et al., 2000), na dependência da reação individual ao agente etiológico, devido há uma proliferação da zona B e uma depleção das células T. Nesta ocasião os gânglios linfáticos aparecem muito reativos com presença de células plasmáticas, eosinófilos e macrófagos e alguns com presença de forma amastigotas (NOLI, 1999).

#### **4- Conclusão**

Em áreas endêmicas para LVC, os animais que apresentam dermatopatias, onicogribose e linfadenopatia devem ser investigados quanto a infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*.

#### **5- Referências**

- ALBUQUERQUE, A.R. et al. Ocorrência da leishmaniose visceral canina no município de Amaraji, Estado de Pernambuco, Brasil. **I Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito santo. 2005
- 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.

ASHFORD, D.A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Medicine and Hygiene**. v.59, p. 53-57, 1998.

ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G, Leishmaniose visceral canina **Manual da Schering-Plough**, 2005, 14p.

BARROUIN-MELO, S.M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, v.171, n.2, p. 331-339, 2006.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar) **Vet News**, London/New York, ano X, n. 61, jan/fev 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2004.

CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology** v. 76, p. 173-180, 1998.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v.22, nov 1997.

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

FERRER, L. Clinical Aspects of Canine Leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain, p. 6-10,1999.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 349-357, jul/set 1985.

MORAIS, S.R.C. et al. Sinais clínicos X diagnóstico parasitológico na *Leishmania visceral* canina na cidade do Recife. XII Congresso de Iniciação Científica. Recife-PE. **Anais...**p.287-288, 2003.

NATAMI, A. et al. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the khemisset province, Morocco. **Veterinary Research** v. 31, p. 355-363, 2000.

NOLI, C. Leishmaniosis Canina **Waltham International focus**, London, v.9, n 2, 1999.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, n. 58, p. 36-42, 2005.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral canina. Leishmune, Manual Técnico. 2005. 52p.

SANTA-ROSA, I.C.A. e OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, n. 11, p. 24-28, 1997.

WHO, Control of leishmaniasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Geneva. Technical report series 793.1990.

## **CAPÍTULO 4**

### **COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC KITS USED FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS**

**COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC KITS USED FOR CANINE  
VISCERAL LEISHMANIASIS**

**ABSTRACT**

The definitive diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is obtained through the demonstration of the parasite in bone marrow, spleen, liver and lymph nodes smears, but this diagnostic method is invasive, limited and frequently inconclusive. These disadvantages render serologic methods to be essential to CVL diagnosis. The aim of this work was to compare two ELISA systems with different antigens for CVL diagnoses. The evaluation in series presented an increase on sensibility and the assessment of the association in parallel showed an increase in specificity, allowing safer results due to the reduction on false negative and false positive cases.

## COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC KITS USED FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

### 1 - Introduction

Increasing geographic expansion and urbanization of American Visceral Leishmaniasis (AVL) in Brazil require efficient control measures, mainly concerning the dog as its major reservoir which maintains focus in endemic areas. Therefore the correct identification of infected dogs becomes an important AVL control measure (MELO, 2004).

Clinical diagnosis in the dog is complex because this zoonosis may present clinical signs which are common to other diseases in endemic areas (GONTIJO and MELO, 2004). Such difficulties demand a confirmatory diagnosis through parasitological, immunological and molecular methods (CARVALHO-NETA, 2004).

In spite of being a simple and certain, the parasitological method is invasive, and has a low sensibility in detecting the parasite. In contrast, the immunological methods have its use facilitated for being less invasive, more practical and for detecting specific immunoglobulins (CARVALHO-NETA, 2004). Hence, there are a great range of serologic tests such as Indirect Immunofluorescence (IFAT), Western Blot (WB), Direct agglutination test (DAT) and immunosorbent immuno assay (ELISA) (SUNDAR and RAI, 2002).

Indirect Immunofluorescence test has been widely used in the CVL diagnosis because of its easy preparation and antigen acquirement, and low price. However, cross reactions (CARVALHO-NETA, 2004), its tedious execution and difficulty in using for epidemiologic surveys (MANCIANTI et al. 1995), have been limiting to the use of this technique.

The ELISA test described by Engvall et al. (1971) was introduced by Hommel (1976) in the diagnosis of calazar using as antigen sources intact, lysed parasites or recombinant antigens, increasing its sensibility (CARVALHO-NETA, 2004).

Some authors have demonstrated the possibility of using these recombinant antigens or antigens excreted by promastigotes forms cultured in a protein free chemical medium, for CVL diagnosis (SOUZA et al., 2004).

According to Scalone et al. (2002), the use of these antigens improves sensibility and specificity of the technique and also facilitates its acquisition. Nevertheless, cross reactions with diseases caused by other tripanossomatides may still occur (ALVES e BEVILAQUA, 2004) as described by Lira (2005), who observed cross reaction with demodicosis and erlichiosis.

In this work two ELISA systems performed with distinct antigens were compared for its use in CVL diagnosis.

## **2 - Material and Methods**

### **2.1- Animals**

Dogs (n=142) of varied breeds and ages, of both genders, residing in the Metropolitan region of Recife were included. Initially in this study, the dogs underwent clinical evaluation by veterinarians from private clinics or from the Veterinary Hospital of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) and were sent to the Leishmaniasis clinic of the Departamento de Medicina Veterinária of the UFRPE.

Following the animals arrival, anamneses was conducted and data from general condition, breed, gender, age, and the process evolution as well as data concerning its residence and possible journeys were taken. In addition, routine physical examination through skin inspection and regional lymph nodes palpation was carried out.

## **2.2- Parasitological diagnosis**

The parasitological examination was performed through bone marrow biopsy. Following antiseptis iliac crest bone puncture using disposable syringes<sup>1</sup> and needle<sup>2</sup> was conducted. Using the material obtained, smears stained by the panoptic<sup>3</sup> method were confectioned and observed under optic microscopy.

## **2.3- Serological diagnosis**

The serological exam was performed through blood samples collected at the cephalic vein using disposable syringes<sup>4</sup> and needles<sup>5</sup>. Following blood clotting, sera was removed and placed in previously identified plastic tubes<sup>6</sup> frozen at a -20<sup>0</sup>C for posterior use.

Two ELISA systems were used in the present work : EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos<sup>6</sup>, batch 053E10027 which uses soluble promastigotes forms of *Leishmania major-like* and by the Kit of canine calazar ELISA S7®<sup>7</sup>, batch 02/05 which uses recombinant peptide of *Leishmania chagasi*. Tests were conducted according to the manufactures instructions , at the Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de

Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Cpqam/FIOCRUZ and the Laboratório da Biogene Indústria e comércio Ltda.

For the comparison between the achieved results in both ELISAs, kappa concordance index was used (SOUZA et al, 2004).

### 3- Results and Discussion

The parasitological test results revealed amastigotes presence in 26% (38/142) of the examined animals. EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos kit with the parasitological diagnosis is summarized in Table 1.

Table 1. Data of EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos with the parasitological criteria, Recife, 2006

<i>TEST</i>	<i>BONE MARROW BIOPSY</i>			
		positive	negative	TOTAL
SEROLÓGIC	positive	25	15	40
	negative	13	89	102
	TOTAL	38	104	142

The results obtained in EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos test with the parasitological criteria revealed sensibility of 65.79% and specificity of 85.58% (CI 95%). The positive and negative predictive values were 62.50% and 87.25% respectively. At the concordance analysis the kappa index value was 0.505 meaning a reasonable concordance.

According to Gontijo and Melo (2004), in spite of the different techniques for the diagnosis of CVL, none presents 100% specificity and sensibility where a definite diagnosis depends on the parasite demonstration through the parasitological methods.

Using the same EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos kit Lira (2005) found a higher sensibility (72%) and specificity (87%) compared to results obtained in this work. The results obtained through the canine calazar ELISA S7® kit with the parasitological diagnosis are demonstrated on Table 2.

Table 2. Data of ELISA S7® with the parasitological criteria. Recife, 2006

<i>TEST</i>		<i>BONE MARROW BIOPSY</i>		
		positive	negative	TOTAL
SEROLOGIC	positive	18	11	29
	negative	20	93	113
TOTAL		38	104	142

The analyses performed using the canine calazar diagnostic ELISA S7® kit showed sensibility of 47.37% and specificity of 89.42% (CI 95%). The positive and negative predictive values were 62.07% and 82.3% respectively. At the concordance analysis the kappa index value was 0,398 meaning a regular concordance. The distribution of the optic densities obtained in both tests is demonstrated at Figure 1.

The results obtained through the EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos kit and compared with canine calazar diagnostic ELISA S7® kit are shown in table 3.

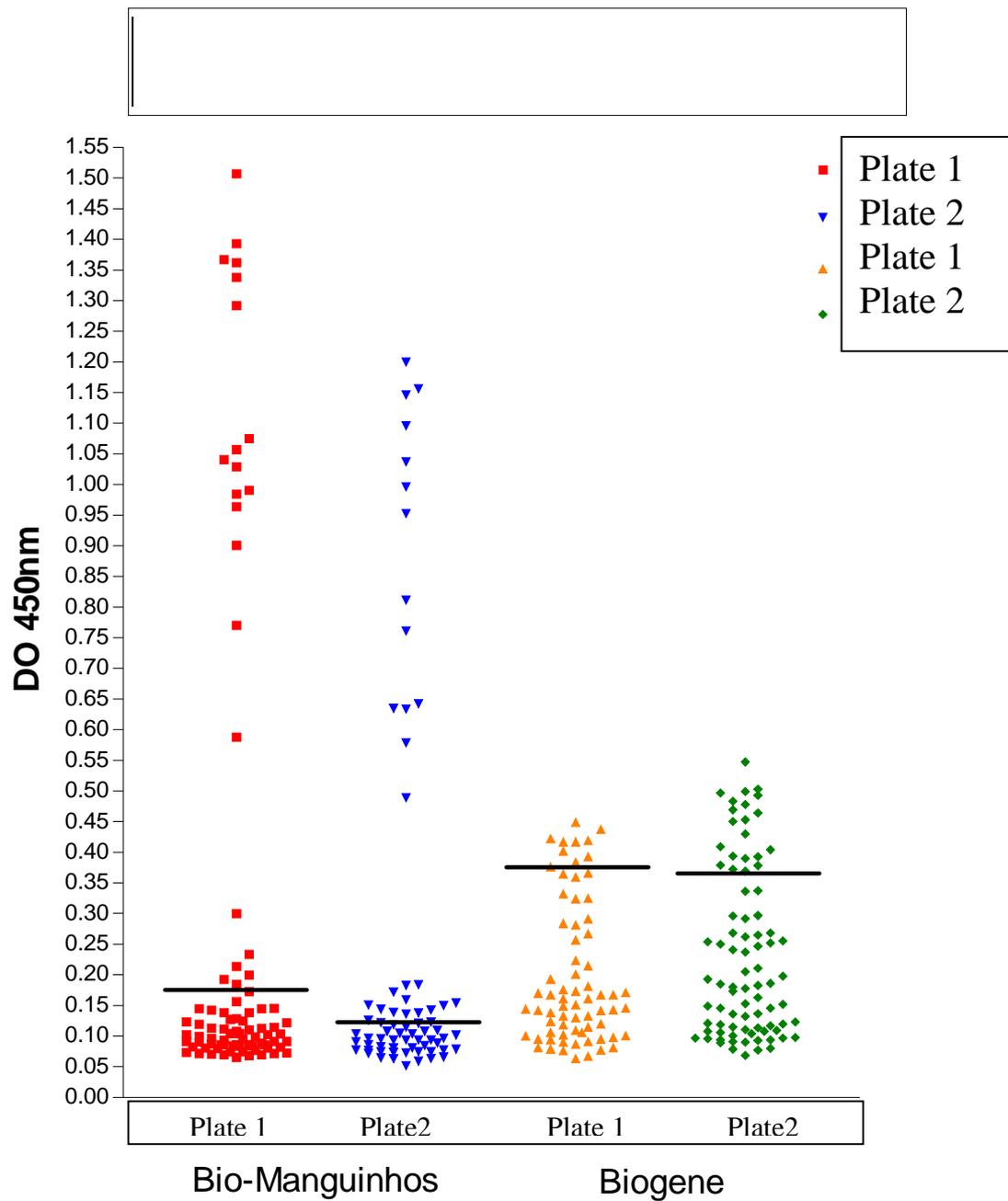


Figure 1- Optic densities (DO) distribution observed in the different ELISA systems used in the CVL diagnosis.

Table 3. Data of EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina–Bio-Manguinhos kit and canine calazar diagnostic ELISA S7® Biogene kit. Recife, 2006

<i>TEST</i>	<i>EIE-LVC</i>			
		Positive	negative	TOTAL
ELISA S7®	positive	23	06	29
	negative	17	96	113
	TOTAL	40	102	142

A better sensibility was observed when EIE-LVC kit was evaluated alone. The specificity on the other hand was lower when compared to ELISA S7®. When comparing the results obtained by the two ELISA systems using the total canine sera (n = 142) a regular concordance was observed (kappa=0,563).

These results are inferior to that found by Souza et al. (2004) who observed Kappa= 0, 62 when comparing two ELISAs with different *Leishmania chagasi* proteic preparations, and also lower than those findings of Scalone et al. (2002) who observed 0,89 for the same index when carried out a concordance between an ELISA and a Immunofluorescence test.

Aiming to reduce the number of false-negative and false –positive results, both tests were analyzed associated in series and then in parallel. At the parallel association of both tests, sensibility of 81.99%, specificity of 76.53%, with positive predictive value of 56.07% and negative predictive value of 92.08 % was observed. A positive result in a parallel association is achieved, when only one of the tests is reactive, whilst in a series association

both tests must be reactive (PFEIFFER, 2002). As for the series association of both tests, a sensibility of 31.16%, specificity of 98.47%, with positive predictive value of 88.19% and negative predictive value of 79.65% was observed.

In this study, the use of these associations resulted in an increase of the sensibility when using a parallel analysis and 98.47% when using a series analyses, even though the use of both tests in association must be considered due to its advantages and disadvantages, particularly cost wise.

#### **4- Conclusions**

The evaluation of ELISA kits in association for the CVL diagnosis increase of the sensibility when evaluated in parallel and increase of the specificity when evaluated in series. The consequences are safer results due to reduction of false positive and false negative results.

#### **5- Referencics**

ALVES, A.W; BEVILAQUA, 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.259-265, jan/fev 2004.

CARVALHO-NETA, A.V.C, Estabelecimento de uma nova metodologia aplicada ao diagnóstico da LVC baseada na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* por

citometria de fluxo. 2004.**Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

ENGVALL, E. ; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p. 871-874, 1971.

GONTIJO, C.M.F; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

HOMMEL, M., et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.72, n. 3, p.213-218, 1978.

LIRA, R.A., **Diagnóstico da Leishmania Visceral Canina: avaliação do desempenho dos kits EIE–Leishmaniose–Visceral–Canina–Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose–Visceral–Canina–Bio-Manguinhos.** 2005 70f.Dissertação (Mestrado em Saúde Pública).Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE.

MANCIANTI, F., et al. Comparison between an enzyme linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, p. 13-21, 1995.

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil : Desafios e perspectivas. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino Americano de Ricketioses, Ouro Preto, MG. **Annais...** p. 41-45, 2004.

PFEIFFER, D.U. **Veterinary Epidemiology - An Introduction**. Epidemiology Division Department of Veterinary Clinical Sciences. The Royal Veterinary College, University of London. 62p. 2002.

SCALONE, A., et al. Evaluation of the *leishmania* recombinant K 39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation os a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology** v. 104, p. 275-285, 2002.

SOUZA, B.M.P.S., et al. Comparação entre diferentes preparados proteicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Revista Brasileira saúde e Produção Animal** v. 5, n. 1, p 31-40, 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V.9, n. 5, p.951-958, 2002.

## 7-CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Seguindo a tendência nacional, a LVC também se encontra em processo de urbanização na cidade do Recife;
- 2- Como os casos humanos são precedidos pelo calazar canino faz-se necessário inquéritos epidemiológicos na população canina e humana para adoção de medidas de controle no município de Amaraji;
- 3- Em áreas endêmicas para LVC, os animais que apresentam dermatopatias, onicogribose e linfadenopatia devem ser investigados quanto a infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*;
- 4- A avaliação dos Kits ELISA em associação para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina aumentam a sensibilidade quando avaliados em paralelo e aumentam a especificidade quando avaliados em série apresentando como conseqüências resultados mais seguros devido a redução no número de falso positivos e falso negativos.

## 8- REFERENCIAS

ALBUQUERQUE, A.R. et al. Ocorrência da leishmaniose visceral canina no município de Amaraji, Estado de Pernambuco, Brasil. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito Santo. 2005

ALEXANDRINO, A.C. **Diagnóstico e Controle da Leishmaniose Visceral - considerações sobre Pernambuco**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

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, A.W. ; BEVILAQUA, 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.259-265, jan/fev 2004.

ALVES, L.C. ; FAUSTINO, M.A.G. Leishmaniose visceral canina **Manual da Schering-Plough**, 2005, 14p.

ANDERLINI, G.A., **Perfil Hematológico e mielograma de cães (*Canis familiares*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania* sp. provenientes da Região**

**Metropolitana do Recife.** 2003. 24f Dissertação ( Mestrado em ciência veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ASHFORD, D.A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Medicine and Hygiene.** v.59, p. 53-57, 1998

**Atlas Ambiental da Cidade do Recife.** Prefeitura da Cidade do Recife, 2000, 151 p.

AZEVEDO, M.A.A., DIAS, A.K.K., PAULA, H.B.et al Epidemiologia da Leishmaniose Visceral canina em Poxoreo- MT **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses,** Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

BADARO, R., BENSON, D., EULALIO, M.C. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease,** Chicago, v.173, p.758-761, 1996.

BARROUIN-MELO, S.M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal,** v.171, n.2, p. 331-339, 2006.

BIAZZONO, L. Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia à *Leishmania* e das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 em cães de região endêmica para leishmaniose visceral. 2003. **Tese (Doutorado em Clínica Veterinária),** Universidade de São Paulo, São Paulo.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar) **Vet news**, London/New York, ano X, n. 61, jan /fev 2003.

BRAGA, G.M.S. et al. Frequência de anticorpos *anti-Leishmania* em cães do município de Imperatriz região Sudoeste do Maranhão, Brasil. **V Jornada de Pesquisa, Ensino e Extensão, UFRPE** 05-07 dezembro 2005, Recife –PE.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE.**Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2004.

BRITO, F.L.C. **Alterações oculares e análise de humor aquoso em cães (*Canis familiares Linnaeus, 1758*) infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937)**. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em ciência veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BRITO, M.E.F. et al. Caracterização de *Leishmania (L.) chagasi* em isolados de cães com leishmaniose visceral na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **XIX Reunião de pesquisa em Doença de Chagas e Leishmanioses**. Uberaba-MG 2005.

CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology** v. 76, p. 173-180, 1998.

CABRERA, M.A.A. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors **Revista do Instituto de Medicina Tropical, S. Paulo** v.45, n.2, p.79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Leishmaniose Visceral Americana: doença emergente no estado de São Paulo.2005. Disponível em <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml> >. Acesso em 17 out 2005.

CARVALHO, M.R. et al. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil.**XXI Reunião de Pesquisa aplicada em doenças de Chagas e Leishmanioses**.Uberaba-MG 21-23 outubro, 2005.

CARVALHO-NETA, A.V.C. Estabelecimento de uma nova metodologia aplicada ao diagnóstico da LVC baseada na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* por citometria de fluxo. 2004.**Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.22, nov/ 1997.

COSTA, K.G.N., LIMA, F.S., SILVA-JÚNIOR, E.G. Identificação de casos de leishmaniose visceral canina através da técnica de imunofluorescência indireta. I jornada científica Universidade Federal de Alagoas. . **Annais...** Maceio-AL, 2003.

COUTINHO, S. G. et al. A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro where the human disease occurs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v.80, p.17-22, 1985.

DANTAS-TORRES F. ; BRANDÃO-FILHO S. P. Distribuição espacial da leishmaniose visceral Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 38, p. 411-412, 2005.

DAVIDSON, R.N. Canine leishmaniasis: an update.In : International canine Leishmaniasis Forum, 1999, Barcelona. **Proceedings of the International canine leishmaniasis forum.** Barcelona : Hoechst Roussel Vet. . p. 72-77, 1999.

DENEROLLE, P.H. Leishmaniose canina: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, Paris, v.31, p. 137-145, 1996.

EVANS,G.T. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northwest of Brazil. **Journal of Infectious Diseases.** v.166, p.1124-32. 1992

EZQUERRA, J. A. **Las Leishmaniasis: de la biologia al control.** 2 ed.Madri:laboratório Sutervet S/A, p.236, 2001.

FACÓ, P. E. G. et al.. A\_Situação da leishmaniose visceral humana e canina no município de Fortaleza-CE em 2004. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito Santo. 2005

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

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v. 136, n. 20,p. 514-516, 1995.

FERRER, L. Clinical Aspects of Canine Leishmaniasis. **Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona, Spain, P. 6-10, 1999.

FERRER, L. The pathology of canine Leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the second International canine Leishmaniasis Forum** Sevilla, Spain.p. 07-14, 2002.

FRANÇA, L.J.O., et al Freqüência da Leishmaniose visceral canina no município de Bezerros, Estado de Pernambuco, Brasil. V Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária VI seminário Nordestino de caprino-ovinocultura. Campus da UFRPE. Recife, 2003.

GALVÃO, S. B., GOMES, K. C., NUNES, R. M.,\_Situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina (LVC) nas áreas urbana e rural no município de Araguaína, segundo estudo realizado em cães sintomáticos e assintomáticos durante a campanha de vacinação anti-rábica

canina em 2003. **I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito santo. 2005.

GARCÍA-ALONSO, et al. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, n.18, p.617-623, 1996.

GOMES, K. C., et al Situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina no município de Araguaína no período de 2000 a 2004.**I Congresso Nacional De Saúde Pública Veterinária**. 27-30 novembro. Guarapari Espírito santo. 2005

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

GRANDONI, L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. Canine Leishmaniasis: an update. **Proceedings of the International canine Leishmaniasis Forum**. Barcelona, Spain. P.32-39, 1999.

GUERRA, J.A. O., et al. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.4, p.305-311 July/Aug. 2004.

GUIMARÃES, K S. et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 305-309, 2005.

GURGEL, A. ; PENA, E. J. M. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina através de IFI e exames parasitológicos em cães da região metropolitana do Recife. V CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE Recife-PE, **Anais...** p. 144, 1995.

HAMIDAH, N.H., CHEONG, S.K., ABU HASSAN, J.A., A case of Kala-azar diagnosed by bone marrow aspiration. **Malaysia Journal Pathology**, Kuala Lumpur, v.17, n.1, p.39-41, 1995.

HOMMEL, M., et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.72, n. 3, p.213-218, 1978.

IVERSON L.B., CAMARGO M.E., VILLANOVA A. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina-urbana do município de São Paulo-Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo v.25, p. 310-317, 1983.

IKONOMOPOLUS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.113, p. 99-113, 2003.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil- a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.100 p. 811-827, 2005.

LEVINE, N.D. et al. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 37-58, 1980.

LESER, W. et al **Elementos de epidemiologia Geral**. Livraria Atheneu, 1985, p. 106-108.

LIMA, F.S. et al. Estudo da Distribuição da Leishmaniose Visceral Canina nos Distritos Sanitários de Maceió. I jornada científica Universidade Federal de Alagoas. **Annais...** Maceio-AL, 2003.

LIMA JUNIOR, A. D. et al. A survey of canine leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: 45th Annual Meeting - **Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitologists**, 2000, Salt Lake City, Salt Lake City American Association of Veterinary Parasitologists, p. 32, 2000.

LOSOS, G.J. Infectious tropical diseases of domestic animals. **International Development Research Centre**, Ottawa, 938p, 1986.

MANCIANTI, F. et al Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine Leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 13-21, 1995.

MARZOCHI, M.C.A. Leishmaniose visceral canina no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Instituto Municipal de Medicina Veterinária “Jorge Vaitsman”**, Rio de Janeiro, n.2, p. 12-21, 1984.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 349-357, jul/set 1985.

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

MELO, C.B. et al. Prevalência de anticorpos anti-Leishmania em cães em Aracaju, Sergipe. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

METTLER, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. v.43, n.11, p.5515-9, 2005.

MONTEIRO, P., LACERDA, M.M., ARIAS, J.R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.27, p. 67-72, 1994.

MORAIS, S.R.C. et al. Sinais clínicos X diagnóstico parasitológico na *Leishmania* visceral canina na cidade do Recife. XII Congresso de Iniciação Científica. Recife-PE. **Anais...**p.287-288, 2003.

MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunopathology**, Amsterdam, v.7, n.3/4, p. 181-195, Nov. 1999.

NATAMI, A. et al. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the khemisset province, Morocco. **Veterinary Research** v. 31, p. 355-363, 2000

NOLI, C. Leishmaniosis Canina **Waltham International focus**, London, v.9, n 2, 1999.

NUNES, V.L.B., GALATI, E.A.B., NUNES, D.B. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.34, n.3, Uberaba May/June 2001.

OLIVEIRA, M.H.C. et al. Flebotomíneos gênero *Lutzomia* França, 1924 da região metropolitana do Recife (Díptera-Psychodidae). **Anais da Universidade Federal de Pernambuco** 2/3: 45-82, 1977/1978.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Ocorrência de leishmaniose visceral canina na cidade do Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002 Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: **SBP**, 2002, I CD-ROM.

PAIVA CAVALCANTI, M. **Intercorrência entre agentes micóticos, bacterianos e parasitários em lesões cutâneas de cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral canina**. Dissertação de Mestrado, Recife-PE, 2004.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, n. 58, p. 36-42, 2005.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.55, n.1, p.39 – 44, 1996.

PFEIFFER, D.U. **Veterinary Epidemiology - An Introduction**. Epidemiology Division Department of Veterinary Clinical Sciences. The Royal Veterinary College, University of London. 62p. 2002.

PINELLI E, et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infectious Immunology** v.6, p.229-235, 1994.

RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral canina. Leishmune, Manual Técnico. 2005. 52p.

ROSÁRIO, E.Y. et al. Evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as diagnostic marker for Canine Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v.100, n.2, 197-203, april 2005.

ROSYPAL A.C. et al. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania (infantum) infantum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5515-9, 2005.

SANTA-ROSA, I.C.A. ; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 11, p. 24-28, 1997.

SCALONE,A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K 39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation os a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasithology**, Amsterdam, v. 104, p. 275-285, 2002.

SILVA, K.C., FAUSTINO, M.A.G., ALVES, L.C. Relação entre lesões cutâneas e diagnóstico laboratoriais para *Leishmania chagasi* na Região Metropolitana do Recife em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA 4, 1999, Recife. **Anais...Recife:SPEME**, 1999.p. 271-272.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V.9, n. 5, p.951-958, 2002.

VESPEL, F. BENEDETTO C., PACIONE R Water Vapor Retrieval by GNSS Radio Occultation Technique with no External Information.

[http://www.cosmic.ucar.edu/aug2002workshop/abstracts/vespe\\_abs.doc](http://www.cosmic.ucar.edu/aug2002workshop/abstracts/vespe_abs.doc). 1997

WHO. Control of leishmaniasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Geneva. Technical report series 793. 1996.

