

NADJA MARIA SILVA DE LIRA

**AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE
ANTICORPOS ANTI-IgG EM URINA DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS,
1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*
(CUNHA & CHAGAS, 1937)**

**RECIFE
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

NADJA MARIA SILVA DE LIRA

AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-IgG EM URINA DE CÃES (*Canis familiaris*) (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
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

L768a Lira, Nadja Maria Silva de
Avaliação física, química, microbiológica e pesquisa de Anticorpos anti-IgG em urina de cães (*Canis familiaris*) Linnaeus, 1785) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) / Nadja Maria Silva de Lira. -- 2009.
55 f.: il.

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

CDD 636. 708 969 6

1. *Leishmaniose visceral canina*
2. Calazar canino
3. *Trypanosomatidae*
4. Zoonose
5. Imunodiagnóstico
6. Clínica médica
7. Doenças parasitárias
8. Medicina Veterinária
9. Pernambuco (BR)
- I. Alves, Leucio Câmara
- II. Título

AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-IgG EM URINA DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)

NADJA MARIA SILVA DE LIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Orientador- Departamento de Medicina
Veterinária da UFRPE

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fabio Luiz da Cunha Brito
Unidade Acadêmica de Garanhuns da UFRPE

Profa. Dra Maria Aparecida da G. Faustino
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

RECIFE
2009

*Dedico este trabalho à minha família,
fonte inesgotável de apoio e inspiração
em todos os momentos da minha vida.*

*A Jucilande (in memorian), minha mãe,
agradeço por minha formação e pelo
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus pela força diária que rege os meus dias, pela Graça de ter permitido concluir este trabalho, pela inteligência a mim concedida e por tudo que ele representa em minha vida.

A Bartolomeu, meu pai querido, pela educação, apoio em todas as minhas escolhas e incentivo em minha formação profissional.

A Wendel, meu noivo, obrigada pelo amor, companheirismo, paciência, pela ajuda prática nas minhas apresentações e textos, opiniões e principalmente, pela força em todos os momentos desta conquista.

A Jacqueline, minha irmã, pelo apoio moral e ajuda nos afazeres domésticos.

Ao meu orientador, professor Dr Leucio Câmara Alves pela oportunidade de realização do curso de mestrado, pelos conhecimentos a mim transmitidos, pela paciência e pela confiança depositada, desde os tempos da graduação, acompanhando toda minha trajetória profissional.

A professora Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino, pela boa convivência e pelo apoio durante esse período.

Ao colega Rodolfo Peixoto estagiário do Laboratório de Bacterioses da UFRPE, pelo auxílio na realização das análises microbiológicas.

Aos professores Rinaldo e Leonildo por terem permitido a realização de alguns experimentos no Laboratório de Bacterioses da UFRPE.

A Rodrigo Alves de Lira, pós graduando do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, pela acolhida e auxílio na realização dos testes sorológicos.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da UFRPE, em especial a Danilo, Isabelle, Ivana, Ana Maria, Rafael, Eduardo, Gilsan, Marilene, Andréa, Rita, Auxiliadora, Fabiane, Alessandra, Edna, Samanta, Elizete, Edenilze, Débora, Antônio, Carlos, Márcia Paula, Marco, João, Whaubtyfran pelo convívio agradável e companheirismo.

Aos amigos de trabalho da Clínica Veterinária Amigo Fiel pelo apoio, compreensão e paciência em todos os momentos.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-IgG EM URINA DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)

Resumo

Na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) mudanças nos padrões da urina e a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. podem refletir uma lesão glomerular imunomediada. O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos físicos, químicos e microbiológicos da urina, e também, verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na urina de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando a técnica de cistocentese. Foram coletadas amostras de urina de 20 cães sorologicamente positivas para *Leishmania* sp. pelo teste ELISA. Das 20 amostras, 70% apresentaram alterações na cor, seguidas por alterações nos valores de pH (45%) e presença de proteínas e sangue (50%). Microorganismos foram isolados em 35% das amostras de urina, com prevalência de *Staphylococcus* spp (20%), *Shigella sonnei*, (15%), *Streptococcus* spp, (5%) e *Providencia stuartii* (5%). Por outro lado, o teste ELISA foi executado em 22 amostras de urina utilizando diluições seriadas (1:100, 1:50 e 1:25). Os resultados mostraram que 4,54% das amostras foram positivas em diluições de 1:50 e 1:25. Estes dados mostraram que a determinação de proteínas e sangue, como também, a cistite podem ser sinais sugestivos para avaliar a LVC, mas também indicou que a detecção de anticorpos na urina de cães com LVC pode ser uma boa ferramenta no diagnóstico, entretanto, maiores estudos devem ser realizados para estimar a sensibilidade e especificidade a fim de utilizar este tipo de teste.

Palavras-chave: Calazar Canino, Deposição de Imunocomplexos, Urinálise, Urocultura.

AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-IgG EM URINA DE CÃES (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)

Abstract

In Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) changes of urine patterns and the presence of anti-*Leishmania* sp. antibodies in it may reflect an immunomediated glomerular lesion. The goal of this study was to evaluate the physical, chemical and microbiological aspects of urine and also verify the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* by using cystocentesis. Urine specimens were collected from 20 dogs, which all of them were serologically positive for *Leishmania* sp by ELISA test. Out of 20 samples, 70% showed different patterns of colors, follow by pH values changes (45%) and protein and blood contents (50%). Microorganisms were isolated in 35% of urine samples, with prevalence of *Staphylococcus* spp. (20%), *Shigella sonnei* (15%), *Streptococcus* spp. (5%) and *Providencia stuartii* (5%). On the other hand ELISA test was run in 22 samples by using serial dilutions (1:100, 1:50 and 1:25). The results showed that 4.54 % of the samples were positive at dilutions of 1:50 and 1:25. These data showed that protein and blood contents determination and the cystitis could be suggestive signs to evaluate in CVL, but also indicated the detection of antibodies in urine of CVL may be a good tool, but the sensibility and specificity must to be estimate in order to use this kind of test.

Key-words: Canine Kala azar, Deposition of Immune Complex, Urinalysis, Uroculture

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resultado da urinálise nas amostras de urina de cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	38
---	----

CAPÍTULO II:

Tabela 1. Resultado do teste ELISA nas amostras de urina de cães infectados naturalmente por <i>L. (L.) chagasi</i> em diferentes diluições.....	49
--	----

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	014
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	015
2.1-Leishmaniose Visceral Canina.....	015
2.2.-Métodos de diagnóstico na LVC.....	017
2.3.-Urinálise na LVC.....	019
2.4.-Referências.....	020
3- OBJETIVOS.....	029
3.1- Geral.....	029
3.2- Específicos.....	029
CAPÍTULO 1	
4 – ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE URINA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania (Leishmania)</i> <i>chagasi</i>	030
Resumo.....	031
Abstract.....	032
4.1- Introdução.....	033
4.2- Material e Métodos.....	033
4.3- Resultados e Discussão.....	035
4.4- Conclusão	037
4.5- Referências.....	039

CAPÍTULO 2

5 – ANTICORPOS IgG ANTI- <i>Leishmania</i> sp. NA URINA DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>chagasi</i>	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
5.1- Introdução	46
5.2 Material e Métodos.....	47
5.3- Resultados e Discussão.....	47
5.4- Conclusão	49
5.5- Referências	40
6- CONCLUSÕES GERAIS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose Visceral Canina é uma doença sistêmica com grande potencial zoonótico e ampla distribuição no território nacional, causada por protozoários de gênero *Leishmania* (GONTIJO e MELO, 2004; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; AGUIAR et al., 2007).

No curso da doença, a intensidade das manifestações clínicas (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997) apresentadas estão associadas ao tipo de resposta, celular ou humoral, (CIARAMELLA e CORONA, 2003; IKEDA-GARCIA e MARCONDES, 2007) desenvolvida pelo hospedeiro. Sendo assim, essas as alterações imunológicas tem como consequência uma grande formação de imunocomplexos circulantes (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000) que irão se depositar nas paredes de vários órgãos causando um processo inflamatório (FEITOSA, 2001; SILVA, 2007).

O envolvimento renal, na LVC, é tido como uma sequela natural (CIARAMELLA et al., 1997), sendo estabelecida de lesão glomerular (LUVIZOTTO, 2006) e tubular (TAFURI et al., 1989) desenvolvidos pela deposição de imunocomplexos (POLI et al., 1991; FERRER, 1999), proporcionando um aumento na barreira de filtração glomerular, permitindo assim a passagem de substâncias de alto peso molecular (SARTORI et al., 1987; BAKOUSH et al., 2001; ZATELLI et al., 2003), incluindo imunoglobulinas séricas (SOLANO-GALEGO et al., 2003).

Por outro lado a lesão renal pode resultar em doença severa com complicações sistêmicas (FEITOSA, 2001), particularmente infecções secundárias como cistites bacterianas (LUVIZOTO, 2006).

Em função do aumento de novos casos de LVC (BORASCH e NUNES, 2007), aliado à escassez de dados sobre a utilização da urinálise e de métodos de diagnósticos não invasivos na LVC, objetivou-se, nesse trabalho, avaliar os aspectos físicos, químicos e microbiológicos e pesquisa de anticorpos anti-IgG em urina de cães infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), também conhecida como calazar canino é uma zoonose (FERRER, 1999; BRASIL, 2003; RIBEIRO, 2005a) com ampla distribuição geográfica (ALVES e FAUSTINO, 2005).

A doença tem como agente causal nas Américas o protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, o qual se encontra inserido no complexo *Leishmania donovani* (FEITOSA, 2000), sendo transmitido para os hospedeiros susceptíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

A LVC tem mostrado que sua importância está relacionada não só com o aumento da sua prevalência, mas também, pela sua ocorrência em áreas não endêmicas (PARANHOS-SILVA et al., 1996; MILES et al., 1999; ALVES e BEVILACQUA, 2004). Em função de seu espectro clínico e transmissibilidade, no Brasil, a doença vem representando um grave problema de saúde pública (CAMARGO et al., 2007; MACHADO et al., 2007; RIBEIRO, 2007).

Desta forma os cães domésticos representam os principais reservatórios da *L. chagasi* no ambiente domiciliar para leishmaniose visceral (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; POCAI et al., 1998; FEITOSA et al., 2000; FEITOSA 2001; RIBEIRO, 2005b), sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença (MILES et al., 1999), em função da frequência e abundância do parasitismo cutâneo, assim como da alta prevalência da doença na população canina (THOMÉ, 1999; FEITOSA, 2000; RIBEIRO e MICHALICK, 2001). Contudo, vale a pena ressaltar que a intensidade do parasitismo não está associada diretamente ao quadro clínico, (THOMÉ, 1999; SÃO PAULO, 2003).

A doença nos cães caracteriza-se pela infecção do sistema fagocítico mononuclear (NOLI, 1999), podendo se apresentar de forma crônica, sub-aguda e ainda sob forma aguda em 5% dos cães (CIARAMELLA e CORONA, 2003), entretanto, o aparecimento dos sinais clínicos pode variar de meses a vários anos (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; NOLI, 1999; FEITOSA, 2001), em função da imunocompetência apresentada pelo hospedeiro (FERRER et al., 1995; BONATES, 2003), o que acarreta uma disseminação do parasita no organismo, levando ao aparecimento de lesões inflamatórias generalizadas (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995), bem como, uma

grande produção de anticorpos circulantes, resultando na formação e deposição de imunocomplexos em vários órgãos (NOLI, 1999), notadamente os rins.

Por outro lado, a desordem imunológica causada pela doença pode favorecer a ocorrência de doenças oportunistas tais quais pneumonias bacterianas, dermatopatias (CAVALCANTI et al., 2004) e cistites (FEITOSA, 2001; CAVALCANTI et al., 2005; LUVIZOTTO, 2006).

Os sinais clínicos da LVC são pouco específicos como emagrecimento (FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1992; NOLI, 1999; SLAPPENDEL, 1988), diminuição ou perda do apetite, dermatopatias (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 1987; FERRER, 1999; BLAVIER et al., 2001; FEITOSA, 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003; FEITOSA, 2006), diarreia (FERRER, 1999; BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003), febre irregular, apatia (SLAPPENDEL, 1988), lesões oculares (FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003; FULGÊNCIO et al., 2004; BRITO et al., 2006; EUGÊNIO et al., 2006), epistaxe (FERRER, 1999), anemia (CIARAMELLA e CORONA, 2003), linfadenomegalia (FEITOSA, 2001), esplenomegalia, hepatomegalia (VALLADARES et al., 1997; NOLI, 1999, FEITOSA, 2001; GIUNCHETTI et al., 2004; LUVIZOTTO, 2006), emaciação e onicogribose (FERRER, 1999; BONATES, 2003; ALVES e FAUSTINO, 2005). Além destes sinais, outras formas clínicas atípicas, incluindo desordens cardiovasculares, respiratórias (LUVIZOTTO, 2006; GONÇALVES et al., 2003), neurológicas e músculo-esqueléticas (FEITOSA, 2000, FEITOSA, 2001; VINUELAS et al., 2001; BLAVIER et al., 2001; LIMA et al., 2003; RIBEIRO, 2005a; FEITOSA, 2006), tem sido relatadas no calazar canino.

O acometimento do sistema renal, intersticial e/ou glomerular e tubular (POLI et al., 1991) também têm sido observado na LVC, particularmente a glomerulonefrite proliferativa, membranoproliferativa difusa e nefrite intersticial (FERRER, 1992; TAFURI et al., 2001; NOVAES, 2005), as quais freqüentemente pode estar associadas ao óbito na LVC (SLAPPENDEL, 1988; FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003).

As lesões renais são decorrentes da deposição de imunocomplexos circulantes que se depositam na membrana basal glomerular (LUVIZOTTO, 2006), se diferenciando de acordo com a resposta imune apresentada pelo hospedeiro (SOARES et al., 2005).

Esses padrões de lesão glomerular na LV (NIETO et al., 1992; TAFURI et al., 2001; COSTA et al., 2003) podem comprometer o sistema urinário (FEITOSA et al., 2000; SALGADO-FILHO et al., 2003; NOVAES, 2005), bem como, proporcionar o aumento da permeabilidade na barreira de filtração glomerular (SARTORI et al., 1987; KOHANTEB et al., 1987).

Sendo assim, proteinúria (SOLANDO-GALEGO et al., 2003) e imunoglobulinas tem sido detectadas em urina de cães com calazar (SARTORI et al., 1987).

2.2 Métodos de diagnóstico na LVC

O diagnóstico da LVC deve ser feito de maneira criteriosa, em virtude da inespecificidade de sinais clínicos (FEITOSA, 2001; SUNDAR e RAI, 2002; GONTIJO e MELO, 2004), e à grande porcentagem de cães assintomáticos (FERRER, 1999).

Existem três categorias de testes utilizados no diagnóstico da LVC a seguir: os métodos parasitológicos, sorológicos, e os moleculares.

O método parasitológico é confirmado pela observação direta de formas amastigotas livres ou dentro do citoplasma de macrófagos obtidos através de aspiração de linfonodos, baço e medula óssea (CIARAMELLA e CORONA, 2003), biopsia hepática, isolamento em meio de cultura, isolamento em animais susceptíveis (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997), raspados de lesões cutâneas e pele íntegra para exame citológico (ALVES e FAUSTINO, 2005). Em alguns casos, a técnica de imunohistoquímica pode ser aplicada para aumentar a sensibilidade e especificidade para a detecção do antígeno em tecidos e biopsias de linfonodos (FERRER, 1999).

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 Triptofane (LIT), como a inoculação intraperitoneal em animais de laboratório (SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Apesar de ser um método simples e de certeza, o diagnóstico parasitológico é invasivo e traumático, requerendo técnico treinado para sua realização e a leitura microscópica (SUNDAR e RAI, 2002), além de possuir baixa sensibilidade na detecção do parasito. Por outro lado, os métodos imunológicos têm seu uso bastante facilitado

por serem menos invasivos, mais prático e por ter como base a detecção de imunoglobulinas específicas (CARVALHO NETA, 2006).

Entre os métodos sorológicos destaca-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento, teste de aglutinação direta (TAD) (BRASIL, 2003), Imunoeletroforese (FEITOSA et al., 2000), Immunoblot e Imunocromatografia (LIRA, 2005).

Apesar de ser um método diagnóstico reconhecido como padrão ouro (GRANDONI, 1999; BRASIL, 2003), e ser bastante utilizada no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC), a RIFI apresenta reações cruzadas com outras doenças e baixa sensibilidade (CARVALHO NETA, 2006), além disso, a dificuldade de aplicação em inquéritos epidemiológicos (MANCIANTI et al., 1995) tem sido limitantes ao emprego desta técnica.

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), além de possuir maior reprodutibilidade (MANCIANTI et al., 1995).

Apesar das divergências quanto à confiabilidade do RIFI e ELISA, essas duas técnicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários, o ELISA está recomendado para triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para confirmação de cães sororeagentes ao teste ELISA (BRASIL, 2003).

Entretanto, a presença de anticorpos não está restrita ao soro sanguíneo, sendo descrita no humor aquoso e líquido cerebrospinal (GARCIA-ALONSO et al., 1996), bem como na urina (ISLAM et al., 2002; SOLANO-GALEGO et al., 2003, HATAM et al., 2007).

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) permite a amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito possuindo desta forma a sensibilidade e especificidade próximas a 100% (FERRER, 1999; LUVIZOTTO, 2005). A extração do DNA pode ser realizada a partir de amostras de tecidos do paciente, incluindo medula óssea, sangue, aspirado de linfonodos e biópsia cutânea (MELO, 2004), e também no vetor (MANNA et al., 2004).

2.3 Urinálise na LVC

O sistema urinário participa da manutenção da homeostase corporal através da eliminação de resíduos metabólicos, de água e outras substâncias pela urina (GARCIA-NAVARRO, 2005). Contudo, o trato urinário dos animais de companhia é freqüentemente desafiado por microrganismos tanto da microbiota normal quanto da patogênica.

Na LVC, apesar do envolvimento renal em função da formação e deposição de imunocomplexos ser um achado freqüente (SOARES et al., 2005; COSTA et al., 2003), estudos sobre a repercussão desses aspectos na urinálise têm sido pouco relatados.

De um modo geral, a urinálise de cães infectados por *Leishmania* sp. apresenta alterações inespecíficas, apesar de proteinúria (NIETO et al., 1992; FEITOSA et al., 2000; TAFURI, et al., 2001; SOLANO-GALLEGO et al., 2003; COSTA et al., 2003) hematúria (GARCIA-NAVARRO, 2005) e/ou leucocitúria terem sido frequentemente descritas (SALGADO-FILHO et al., 2003; NOVAES, 2005). Por outro lado, cilindrúria foi observado na LVC (NOVAES, 2005).

A presença de cilindros leucocitários, cristais fosfato amorfo, células epiteliais e leucócitos também tem sido raramente reportada na literatura em cães com infecção natural por *Leishmania* sp. (GARCIA-NAVARRO, 2005; NOVAES, 2005).

Apesar da urina armazenada na bexiga ser normalmente estéril (LULICH e OSBORNE, 1997), a desordem imunológica causada pela doença pode acarretar no aparecimento de infecções oportunistas como a cistite (LUVIZOTTO, 2006; NOVAES, 2005).

2.4 Referências

AGUIAR, P.H.P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.8, n.4, p.283-294, 2007.

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

ALVES, W. A.; 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. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

BAKOUSH, O. et al. Urine excretion of protein HC in proteinuric glomerular diseases correlates to urine IgG but not to albuminuria. **Kidney International**, United States, v.60, p.1904-09, 2001.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of Canine Leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, France, n. 162, p. 108 – 120, 2001.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, London/New York, ano X, n. 61, p.4-5, 2003.

BORASCH, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.71, p.44-48, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; MAIA, F.C.L. et al. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, p.768-775, 2006.

CAMARGO, J.C. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.71, p.86-92, 2007.

CARVALHO NETA, A.V. et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.4, p.480-488, 2006.

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

CAVALCANTI, M. P. et al. Infecções micóticas e bacterianas em lesões cutâneas de cães parasitologicamente positivos para *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 160 – 162, 2004.

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

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**. London, v.22, p.539-543, 1997.

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

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

EUGÊNIO, F. R. et al. Lesões macro e microscópicas da terceira pálpebra causadas por *Leishmania* spp. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 49.

FEITOSA, M. M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 9 – 14.

FEITOSA, M.M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. **Revista Intervet Pet**, São Paulo, p.1-15, 2001.

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. Leishmaniasis. In: KIRK R.W.; BONAGUREJ.D. (eds). **Current Veterinary Therapy**, XI. Philadelphia: W.B. SAUNDERS, 1992, p. 266-270.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update In: OF THE CANINE INTERNACIONAL LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Killick- Kendrick, 28-31 January, 1999. p. 6-10.

FULGÊNCIO, G. O. et al. Uveíte em cinco cães, naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, atendidos em Belo Horizonte – MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento I, p. 235, 2004.

GARCÍA-ALONSO, M. et al. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**, v.18, p.539-546, 1996.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de Urinálise Veterinária**, 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005, 95p.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação anátomo-patológica da hepatomegalia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento I, p. 236, 2004.

GONÇALVES, R. et al. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.45, n.3, p.153-158, 2003.

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, 2004.

GRADONI, L., 1999. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), **Canine Leishmaniasis: An Update**. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden, pp. 32–39.

HATAM, G.R. et al. Direct Agglutination Test and Enzyme Linked Immunosorbent Assay with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Iranian Journal Parasitology**, Iran, v.2, n.3, p.24-28, 2007.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. et al. Aspectos clínicos da la leishmaniosis canina. **Revista Ibérica de Parasitologia**, Barcelona, Vol. Extraordinário, p. 61-66, 1987.

IKEDA-GARCIA, F.A. e MARCONDES M. Métodos de diagnóstico na leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.71, p.34-42, 2007.

ISLAM, M.Z. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay urine samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, United States, v.9, n.4, p.789-794, 2002.

KOHANTEB J. et al. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n.4, p. 578-580, July-August, 1987.

LIMA, V.M.F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, n. 36, p. 485-489, 2003.

LIRA, R.A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: avaliação do desempenho dos kits EIE – Leishmaniose–Visceral –Canina –Bio-Manguinhos e IFI Leishmaniose–Visceral –Canina –Bio-Manguinhos**. Dissertação de mestrado. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE p.70, 2005.

LULICH J.P.; OSBORNE C.A. Infecções bacterianas do trato urinário. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Moléstias do Cão e do Gato**. 4ª ed. São Paulo: Manole, 1997, v.2, cap.136, p.2453-2470.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p.15 – 22.

LUVIZOTTO, M. C. R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. In:___ **Manual Técnico Leishmune**, Fortdodge, seção 3, p. 28-29, 2005.

MACHADO, J.G. et al. Imunopatologia na leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.71, p.50-58, 2007.

MANCIANTI, F., FALCONE, M.L., GIANNELLI, C., POLI, A. 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**, New York, vol. 59, p. 13-21, 1995.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, New York, v.125, p.251-262, 2004.

MARTINEZ-MORENO, A. et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v.48, p. 209-220, 1995.

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.23, suplemento 1, p.41-45, 2004.

MILES, M.A. et al Canine leishmaniosis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniosis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. **Proceedings...**Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 46-53.

NIETO, C.G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, New York, v.45, p.33-47, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, Milán, Italia, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NOVAES, B. C. B. **Avaliação das alterações estruturais em rins de cães (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) e sua associação com a urinálise, e os níveis séricos de uréia e creatinina.** Dissertação – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

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

POCAI, E.A. et al. Leishmaniose visceral (calazar), cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.501-505, 1998.

POLI, A. et al. Renal Involvement in Canine Leishmaniasis A Light Microscopic, Immunohistochemical and Electron-Microscopic Study. **Nephron**, Switzerland, n.57, p.444-452, 1991.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral Canina. In:_____. Leishmune. **Manual Técnico**, Leishmaniose Visceral Canina. Fort Dodge, 2005b. seção II, p. 13 – 29.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral Canina. Nossos cães devem morrer? **Cães & gatos**, São Paulo, p. 66-70, set./out. 2005a.

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

RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Revista Nosso Clínico**, São Paulo, Ano 4, n. 24, 2001.

SALGADO-FILHO, N. et al. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n.2, p.217-221, 2003.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 2, n.11, p.24-28, 1997.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. **II Informe Técnico**: Leishmaniose Visceral Americana. São Paulo: SP, 2003. 48 p.

SARTORI, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental Kala-azar. **Parasite Immunology**, n.9, p.93-103, 1987.

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

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1988.

SOARES, M. J. V.et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Oct./Dec, v.11, n.4, p.579-593. 2005.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, United States, v. 10, n. 5, p. 849–855, 2003.

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

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 96, p. 203–212. 2001.

TAFURI, W.L. et al. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.3, p.139-145, 1989.

THOMÉ, M. G. Cuidado com as leishmanioses. **Cães & Gatos**, São Paulo, n. 85, p. 46-50, set./out. 1999.

VALLADARES, J.E. et al. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v.141, p. 574-575, 1997.

VIÑUELAS J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p. 23-27, 2001.

ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, United States, v.64, n.5, May 2003.

3- OBJETIVOS

3.1- GERAL

- Avaliar os aspectos físicos, químicos e microbiológicos e da presença de anticorpos anti-IgG em urina de cães infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

3.2- ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações físico químicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.
- Identificar bactérias presentes na urina de cães com LVC.
- Detectar a presença de anticorpos na urina de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* através do teste ELISA.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE URINA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE URINA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Resumo

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) também conhecida como Calazar é causada por *L. chagasi* e os sinais clínicos como doença renal são sugestivos de uma resposta imunomediada. O objetivo desse trabalho foi avaliar os exames físicos, químicos e microbiológicos da urina de cães com infecção natural de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Amostras de urina foram coletadas por cistocentese de 20 cães, os quais foram sorologicamente positivos para *Leishmania* sp. pelo teste ELISA. Alterações urinárias na coloração da urina foram visibilizadas em 70% das amostras, seguida pela modificação do pH (45%) e presença de proteína e sangue (50%). Os resultados da urocultura revelaram que 35% das amostras foram positivas, com prevalência de *Staphylococcus* spp. (20%), *Shigella sonnei* (15%), *Streptococcus* spp. (5%) e *Providencia stuartii* (5%). Esses achados demonstram que a pesquisa de proteína e sangue na urina de animais com LVC pode ser uma ferramenta importante para avaliar o envolvimento renal, e que em áreas endêmicas para LVC, cães com quadros de cistites, a sorologia para o calazar canino deve ser realizada.

Palavras-chave: Urinálise, Calazar Canino, Urocultura

PHYSICAL, CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF URINE FROM DOGS WITH NATURAL INFECTION OF *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Abstract

Canine visceral leishmaniasis (CVL) as know as Canine Kala-Azar is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the clinical signs such as renal failure are suggestive of an immunomediated response. The aim of this study was to evaluate the physical, chemical and microbiological aspects of urine from dogs with natural infection of *L (L) chagasi*. Urine specimens were collected by cystocentesis from 20 dogs, which all of them were serologically positive for *Leishmania* sp by ELISA test. Out of 20 samples, 70% showed different patterns of colors, follow by pH values changes (45%) and protein and blood contents (50%). Microorganisms were isolated in 35% of urine samples, with prevalence of *Staphylococcus* spp. (20%), *Shigella sonnei* (15%), *Streptococcus* spp. (5%) and *Providencia stuartii* (5%). These data showed that the protein and blood contents determination is an important tool to evaluate the renal involvement in CVL. On the other hand dogs with cystitis must be evaluate to CVL.

Key-words: Urinalysis , Canine Kala-Azar, Urine Culture

ASPECTOS FÍSICOS, QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE URINA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

4.1 Introdução

A leishmaniose visceral canina é uma doença imunomediada, causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (NOLI, 1999).

A evolução da doença é determinada pela competência imunológica do hospedeiro (GOTO e LINDOSO, 2004), a qual pode acarretar numa formação de grande quantidade de imunocomplexos circulantes que irão se depositar nas paredes dos vasos, olhos e articulações (SLAPPENDEL, 1988), podendo resultar em complicações sistêmicas, particularmente infecções secundárias, sepse e hipotensão (SLAPPENDEL e FERRER, 1998; COSTA et al., 2003).

O envolvimento renal, intersticial e/ou glomerular é um acometimento bem conhecido das infecções produzidas pela *L. donovani* em animais experimentais (COUNCILMAN, 1898; CARAVACA et al., 1991), assim como na LVC (FERRER, 1999; COSTA et al., 2003; SOARES et al., 2005).

Em função do aumento do número de casos de LVC, e manifestações compatíveis com doença renal, o objetivo desse trabalho foi avaliar os aspectos físico-químicos e microbiológicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

4.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras de urina de 20 animais sorologicamente positivos para *Leishmania (Leishmania) chagasi*, de ambos os sexos, de raças e idades variadas, provenientes do Município de Tamandaré, Microrregião da Mata Meridional do Estado de Pernambuco.

A urina foi coletada através do método de cistocentese de acordo com a metodologia proposta por Coles (1984), utilizando-se seringa¹ e agulha² descartáveis, após o que foi mantida sob refrigeração a temperatura de 4°C durante o período máximo

¹ Seringa descartáveis - 20 (ml), Becton Dickson

² Agulhas descartáveis - 40 x 12 mm, Becton Dickson

de quatro horas até o processamento. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para realização da urinálise. Foram determinados a bilirrubina total direta, urobilinogênio, corpos cetônicos, glicose, proteínas totais, nitrito, pH, densidade, hemácias e leucócitos utilizando fitas reagentes³ seguindo as instruções do fabricante. Para o exame do sedimento urinário, centrifugou-se 10 ml da urina por cinco minutos a 271g, em seguida, o sobrenadante era desprezado e o sedimento examinado em microscópio óptico. Utilizando como referencia os parametros de normalidade descritos por Garcia-Navarro (2005).

Para realização da urocultura, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bacterioses da UFRPE, sendo semeadas em ágar⁴ Sangue ovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey⁵, e mantidos à temperatura de 37°C por 24-48 horas. Após o período de incubação as bactérias isoladas foram submetidas aos métodos clássicos de identificação de acordo com sua morfologia através da coloração de Gram e posterior identificação em microscópio óptico com objetiva de 40x. Em seguida, para identificação das bactérias Gram negativas, estas foram semeadas em caldo ágar Infusão Cérebro Coração⁶ (BHI), mantidos à temperatura de 37°C por 24 horas, sendo realizado o teste bioquímico em ágar Tríplice-açúcar-ferro⁷ (TSI), ágar Citrato Simmons⁸, ágar SIM⁹, Lisina¹⁰, Vermelho de Metila¹¹ (VM) e Voges Proskauer¹² (VP).

4.3 Resultado e Discussão

Os resultados da urinálise e da urocultura nas amostras de urina de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* serão descritos na Tabela 1.

Na urinálise observou-se que 70% (14/20) das amostras apresentaram alteração, tendendo para o amarelo âmbar. Contudo, o odor *sui generis* predominou em 100% das amostras. Os resultados aqui encontrados foram semelhantes àqueles descritos por Novaes (2005) que observou alterações na cor da urina em 75% dos cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.

³ Fita reagente marca Labtest

⁴ Ágar base - Marca Biobrás

⁵ Ágar MacConkey - Marca Biobrás

⁶ Ágar Infusão Cérebro Coração - Marca Difco

⁷ Ágar Tríplice-Açúcar-Ferro - Marca Difco

⁸ Ágar Citrato Simmons - Marca MBiolog

⁹ Ágar SIM- Marca Eximlab

¹⁰ Lisina - Marca Inlab

¹¹ Vermelho de Metila - Marca Nuclear

¹² Voges Proskauer - Marca Agel

Em relação a turbidez, 25% (5/20) das amostras tinham aspecto turvo e 5% (1/20) secreção branco-leitosa.

A intensidade da cor da urina é diretamente proporcional à concentração de urocromo, estando relacionada a estados patológicos. Por outro lado, a turvação da urina e a secreção branco-leitosa estão associadas à presença cilindros, bactérias, cristais, leucócitos, entre outros (PACHECO, 1998).

Os resultados da avaliação da densidade mostraram uma variação entre 1.000 a 1.030. Apesar desse método não fornecer um valor preciso nem ser sensível às alterações sofridas pela densidade, seu aumento está associado a patologias que provocam uma diminuição da filtração glomerular ou incapacidade do rim em eliminar água, dentre elas, as nefrites agudas e glomerulonefrites. Por outro lado, a diminuição da densidade urinária pode ser decorrente de processos renais crônicos (GARCIA-NAVARRO, 2005).

O envolvimento renal intersticial e/ou glomerular é conhecido como uma seqüela de cães infectados naturalmente por *L. (L.) chagasi* (POLI et al., 1991; NOLI, 1999), sendo atribuído à deposição de imunocomplexos e intenso infiltrado inflamatório plasmocitário (TAFURI et al., 1989; FEITOSA et al., 2000; SOARES et al., 2005), podendo levar o animal à morte (CIARAMELLA et al., 1997; POCAI et al., 1998; FERRER, 1999).

O pH urinário estava ligeiramente ácido em 45% (9/20) das amostras urinárias. De acordo com Meyer et al. (1995) nos carnívoros e onívoros o pH da urina pode variar de ácido a alcalino, dependendo da quantidade de proteína animal oferecida na dieta. O aumento da alcalinidade foi observado em 5% (1/20) das amostras, podendo este ser resultante de distúrbios inflamatórios ou a presença de microorganismos na urina.

A bilirrubinúria e o urobilinogênúria estavam presentes em 15% (3/20) e 10% (2/20) das amostras testadas respectivamente. Essas alterações são indicadores de lesões hepáticas (MEYER et al., 1995), e surgem por ocasião de patologias que alteram a capacidade de excreção da bilirrubina conjugada pelo fígado (PACHECO, 1998), podendo ser detectada antes que sua concentração sérica tenha aumentado (DIBARTOLA, 1997).

O envolvimento hepático tem sido freqüentemente encontrado na literatura em cães acometidos por LVC (CIARAMELLA et al., 1997; CIARAMELLA e CORONA, 2003; ALVES e FAUSTINO, 2005).

A fita indicadora de cetona mostrou traços em 10% (2/20) dos animais, contudo esse resultado pode estar associado ao processo de inanição (GARCIA-NAVARRO, 2005) que alguns animais encontravam-se.

Proteinúria e/ou hematúria estavam presentes 50% (10/20) dos animais. Enquanto a leucocitúria foi observada em 10% (2/20) das amostras analisadas. Esses achados são descritos frequentemente na urina de pacientes humanos e cães infectados por *Leishmania* sp., decorrente do envolvimento da função renal (NIETO et al., 1992; FEITOSA, 2001; SALGADO-FILHO et al., 2003; NOVAES, 2005).

Segundo Zatelli et al. (2003) a avaliação qualitativa de proteínas urinárias serve como diagnóstico primário em condições de patologias glomerulares.

Cilindrúria foi observada em 60% (12/20) dos animais, particularmente cilindros granulares em 45% (9/20) e 15% (3/20) de cilindro hialino. A cristalúria foi identificada em 90% dos animais estudados, distribuídos em 50% (10/20) cristais de oxalato de cálcio, 20% (4/20) de urato amorfo, 15% (3/20) de fosfato triplo e 5% (1/20) de fosfato amorfo.

Novaes (2005) pesquisando a urina de cães com LVC encontrou resultados similares em relação à cilindrúria. Contudo, Oliveira et al. (1993) relatou a presença de raros cilindros granulares na urina de cães infectados experimentalmente por *L. chagasi*.

De acordo com Garcia-Navarro (2005) e Pacheco (1998) a cilindrúria está associada a processos inflamatórios de origem renal, entretanto o aparecimento de cristais no sedimento é um achado inespecífico, não sendo referenciado na LVC.

Em relação à urocultura, microorganismos foram isolados em 35% (7/20) das amostras de urina, sendo que em 20% (4/20) das amostras foram identificados a presença de *Staphylococcus* spp., 15% (3/20) *Shigella sonnei*, 5% (1/20) *Streptococcus* spp., 5% (1/20) *Providencia stuartii*, além de infecções mistas em 10% (2/20) das amostras.

Segundo Bush (1976) deficiências nos mecanismos imunológicos podem favorecer o desenvolvimento de infecções do trato urinário por via hematogena e/ou linfática e principalmente, por via urinária ascendente.

Meyer et al. (1995) afirmam que a urina normal coletada por cistocentese está isenta de bactérias, sendo a presença, indicação de processos infecciosos.

Segundo Oxenfod et al. (1984), *Escherichia coli* e *Proteus* spp. seguidos de *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp são os microorganismos mais comumente

encontrados em cães com infecção do trato urinário, havendo relatos do envolvimento de *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter* spp., *Providencia rettgeri* e *Salmonella entérica* na etiologia desta patologia (MITRA et al., 1994; KOGIKA et al., 1995; RIBEIRO et al., 2003). Entretanto, a prevalência das diferentes espécies de bactérias pode variar consideravelmente de estudo para estudo (ÇETIN et al., 2003).

Contudo, as espécies *Shigella sonnei* e *Providencia stuartii* não foram relatadas como agentes na infecção do trato urinário de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

4.4 Conclusões

Em áreas endêmicas para LVC, os animais que apresentam alterações na urinálise e presença de infecção bacteriana na urina, devem ser investigados quanto à infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

A pesquisa de proteína e sangue na urina pode ser uma ferramenta importante para avaliar o envolvimento renal na LVC.

Tabela 1 - Resultados da urinálise e da urocultura nas amostras de urina de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*

Animal	Odor	Cor	Turbidez		Urobil	Cetona	Glicose	Proteína	Sangue	Nitrito	pH	Densid	Leucócitos	Cilindro	Cristais	Cultura
			Bilir													Bactérias
1	<i>Sui generis</i>	Amar citr	-	+	++	+	-	+++	++	-	5	1.015	-	+	+	<i>Stafilococcus spp.</i> + <i>Providencia stuartii</i>
2	<i>Sui generis</i>	Amar cast claro	-	-	++	-	-	++	++	-	6	1.015	++	+	+	-
3	<i>Sui generis</i>	Amar citr	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1.010	-	-	+	-
4	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	-	++	-	6	1.020	-	+	-	<i>Stafilococcus spp.</i>
5	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	-	-	-	6	1.005	-	-	-	<i>Stafilococcus spp.</i>
6	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	+	-	-	-	++	++	-	5	1.030	-	+	-	-
7	<i>Sui generis</i>	Amar citr	-	+	-	-	-	++	++	-	9	1.000	++	+	+	<i>Streptococcus spp.</i>
8	<i>Sui generis</i>	Amar citr	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	1.005	-	+	-	-
9	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	+	-	-	-	-	5	1.030	-	+	-	-
10	<i>Sui generis</i>	Amar cast claro	++	+	-	-	-	++	++	-	6,5	1.015	-	+	-	-
11	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	++	-	-	-	-	++	-	-	6	1.030	-	+	+	-
12	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1.030	-	-	+	-
13	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1.025	-	-	+	-
14	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	+	-	-	-	-	++	-	5,5	1.030	-	-	+	<i>Shigella sonnei</i> + <i>Stafilococcus spp.</i>
15	<i>Sui generis</i>	Amar citr	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	1.020	-	-	-	-
16	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	+++	-	-	5	1.030	-	-	+	-
17	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1.030	-	-	+	<i>Shigella sonnei</i>
18	<i>Sui generis</i>	Amar citr	-	-	-	-	-	++	++	-	5	1.030	-	+	+	-
19	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	-	-	-	-	-	++	-	-	6,5	1.020	-	+	+	<i>Shigella sonnei</i>
20	<i>Sui generis</i>	Amar âmbar	++	+	-	-	-	+++	++	-	5	1.025	-	+	+	-

*Urobil – Urobilinogênio; Bilir – Bilirrubina; Densid – Densidade; Amar citr – Amarelo citrino; Amar cast claro – Amarelo castanho claro; Amar âmbar – Amarelo âmbar

4.5 Referências

ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose Visceral Canina. **Schering-Ploug**, Encarte Técnico, 2005, 14p.

BUSH, B.M. A review of the aetiology and consequences of urinary tract infections in the dog. **British Veterinary Journal**, v.132, n.6, p. 632-641, 1976.

CARAVACA, F. et al. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. **American Journal of Nephrology**, Switzerland, v.11 p.350-352, 1991.

ÇETIN, C. et al. Bacteriological Examination of Urine Samples from Dogs with Symptoms of Urinary Tract Infection. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Turkey, v.27, p.1225-1229, 2003.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on continuing Education for the Practicing Veterinary**, v. 25, n.5, 2003.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v.141, n.22, p. 539-543, 1997.

COLES, E.H. **Patología Clínica Veterinária**. 3 ed. São Paulo. Manole, 1984. 566p.

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

COUNCILMAN, W.T. Acute interstitial nephritis. **Journal of The Experimental Medicine**, United States, v.3, p.393-420, 1898

DIBARTOLA, S.P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da afecção renal. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4ª ed. São Paulo: Manole, 1997, v.2, cap.132, p.2355-2373.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. **Intervet Pet**, São Paulo, 2001. 14p.

FEITOSA, M.M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, Ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update In: OF THE CANINE INTERNACIONAL LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Killick- Kendrick, 28-31 January, 1999. p. 6-10.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K. **Manual de Urinálise Veterinária**, 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005, 95p.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n.4, p.615-623, 2004.

KOGIKA, M.M. et al. Etiologic study of urinary tract infection in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.32, p.31-36, 1995.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinário: Interpretação e Diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

MITRA, M. et al. Comparative efficacy of gentamicin, norfloxacin and nitrofurantoina against urinary tract infection in canine. **Indian Veterinary Journal**, New Delhi, v.71, p.1217-1220, 1994.

NIETO, C.G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, New York, v.33, n.45, p.33-47, 1992.

NOLI C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, Milan, Itália, v.9, p.16-24, 1999.

NOVAES, B.C.B. **Avaliação das alterações estruturais em rins de cães (*Canis familiaris*) (LINNAEUS, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937) e sua associação com a urinálise, e os níveis séricos de uréia e creatinina.** 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.88, p.243–248, 1993.

OXENFORD, C.J.; LOMAS, G.R.; LOVE, D.N. Bacteriúria in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.25, p.83, 1984.

PACHECO, R.G. **Exame de Urina em Medicina Veterinária.** Seropédica, RJ: EDUR, 1998, 129p.

POCAI, E.A. et al. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.501-505, 1998.

POLI, A. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, v.57, p.444-452, 1991.

RIBEIRO, M.G. et al. Infecção do trato urinário em cão por *Salmonella entérica* sorotipo *Enteritidis*. Relato de caso. **Clinica Veterinária**, São Paulo, n.43, p. 30-37, 2003.

SALGADO-FILHO, N.; FERREIRA, T.M.A.F.; COSTA, J.M.L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.2, n.36, p. 217-221, 2003.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniosis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, Netherlands, v.10, p.1–16, 1988.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infections Diseases of the Dog and Cat**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 1998. cap.73, p.450-458.

SOARES, M. J. V. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Oct./Dec, v.11, n.4, p.579-593. 2005.

TAFURI, W.L. et al. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.3, p.139-145, 1989.

ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, United states, v.64, n.5, May 2003.

CAPÍTULO 2

PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI- *Leishmania* sp. NA URINA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- *Leishmania* NA URINA DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Resumo

Na Leishmaniose Visceral Canina anticorpos podem passar através da barreira glomerular, sendo encontrado na urina destes cães anticorpos anti-*Leishmania*. O objetivo desta pesquisa foi detectar anticorpos anti-*Leishmania* sp. na urina de cães naturalmente infectados através do teste ELISA. Para tanto, foram avaliadas 22 amostras de urina de cães positivos sorologicamente para *L. (L.) chagasi* através do teste ELISA utilizando diluições de pareada da urina (1:100, 1:50 e 1:25). Os resultados mostraram que 4,54% das amostras foram positivas nas diluições 1:50 e 1:25. Estes dados indicam que a detecção de anticorpos na urina na LVC pode ser uma boa ferramenta no diagnóstico. Contudo, a sensibilidade e a especificidade do teste devem ser avaliadas, para só então fazer uso deste tipo de teste.

Palavras-chave: Proteína, Diagnóstico, Calazar Canino

**ANTIBODIES RESEARCH ANTI-*Leishmania* IN THE URINE OF DOGS WITH
NATURAL INFECTION *Leishmania (Leishmania) chagasi***

Abstract

In Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) antibodies can pass through the glomerular barrier and the urine from these dogs may contain anti-*Leishmania* antibodies. The goal of this study was to verify the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* by using ELISA Test. A total of 22 urine samples from dogs positive for *L. (L.) chagasi* antibodies by ELISA test exams were analyzed by using serial dilutions of paired urine (1:100, 1:50 and 1:25). The results showed that 4.54 % of the samples were positive at dilutions of 1:50 and 1:25. These data indicate that the detection of antibodies in urine of CVL may be a good tool, but the sensibility and specificity must to be evaluate in order to use this kind of test.

Key-words: Protein, Diagnostic, Canine Kala-Aza

ANTICORPOS ANTI- *Leishmania* NA URINA DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi*

5.1 Introdução

Na imunopatogenia da Leishmaniose Visceral canina (LVC) o depósito de imunocomplexos (FEITOSA et al., 2000; LUVIZOTTO, 2006; SILVA, 2007), além da elevada produção de imunoglobulinas circulantes tem sido atribuído como principal causa das lesões em vários órgãos (MARTINEZ-MORENO et al., 1995; BONATES, 2003).

Neste sentido, o envolvimento renal na LVC, notadamente glomerulonefrite, é um aspecto clínico importante, levando à insuficiência renal em cães (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999; SOARES et al., 2005).

Sendo assim, padrões de lesão glomerular na doença humana e canina (NIETO et al., 1992; TAFURI et al., 2001; COSTA et al., 2003) podem comprometer o sistema urinário (SALGADO-FILHO et al., 2003, FEITOSA et al., 2000), e também, aumentar a permeabilidade na barreira de filtração glomerular (SARTORI et al., 1987) favorecendo a passagem de antígenos através da urina (SARKARI et al., 2002; SUNDAR et al., 2005; ATTAR et al., 2001; RIJAL et al., 2004), proteínas (ZARAGOZA et al., 2003) e anticorpos (KOHANTEB et al., 1987).

A presença de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Leishmania donovani* na urina foi descrita primeiramente em humanos (KOHANTEB et al., 1987) e hamsters submetidos a infecção experimental (SARTORI et al., 1987), através da técnica imunoeletoforese (REZAI et al., 1977). Entretanto, a utilização do teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) para pesquisa de anticorpos na urina em cães tem sido pouco descrita na literatura (SOLANO-GALEGO et al., 2003).

Objetivou-se neste trabalho, realizar a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em cães naturalmente infectados, provenientes do Município de Tamandaré, Micro Região da Mata Meridional do Estado de Pernambuco.

5.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras de urina de 22 cães positivos sorologicamente para *Leishmania (Leishmania) chagasi*, de ambos os sexos, de raças e idades variadas, provenientes do Município de Tamandaré, Microrregião da Mata Meridional do Estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas através do método de cistocentese de acordo com a metodologia proposta por Coles (1984), utilizando-se seringa¹³ e agulha¹⁴ descartáveis. Após a coleta, as amostras foram mantidas a temperatura de -20°C até o processamento do material após o período de dois meses.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp na urina foi realizada através do teste ELISA que utiliza um peptídeo recombinante de *Leishmania chagasi*¹⁵, com modificações referentes a utilização de sorologia pareada, nas diluições de 1/100, 1/50 e 1/25. O teste foi realizado no laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação do Instituto Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ).

A leitura da densidade ótica foi realizada em 450 nanômetros (n). O valor do *Cut off* foi obtido a partir da média aritmética das densidades óticas dos controles não reagentes somada ao fator $R = 0,142$, fornecido pelo fabricante, ficando estabelecido como amostra positiva aquele em que apresentasse valor acima de 0,278 em qualquer das diluições.

5.3 Resultado e discussão

Apenas uma amostra (4,54%) apresentou-se acima do valor do *Cut off* (0,278) nas diluições 1:50 e 1:25 e negativa na diluição de 1:100 (Tabela 1).

A presença de imunocomplexos circulantes em pacientes com ou sem envolvimento renal na LV, sugere que a injúria glomerular causada pela doença pode ser resultado da deposição de antígenos nos glomérulos e subsequente formação local de imunocomplexos (DUARTE et al., 1983).

Sendo assim, anticorpos na urina podem ocorrer devido à inabilidade da filtração glomerular, causada pela deposição de imunocomplexos (SARTORI et al,

¹³ Seringa descartáveis - 20 (ml), Becton Dickson

¹⁴ Agulhas descartáveis - 40 x 12 mm, Becton Dickson

¹⁵ Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7, BIOGENE

1987; POLI et al., 1991; BAKOUSH et al., 2001), favorecendo a passagem de imunoglobulinas derivadas do sangue ou a produção local de anticorpos específicos na urina (SOLANO-GALEGO et al., 2003).

Os resultados aqui encontrados diferem de Solano-Galego et al. (2003), que encontraram positividade em 35 das 95 amostras, pela adaptação do teste ELISA para avaliar a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* na urina de cães, utilizando a proteína A de acordo como descrito por Riera et al. (1999).

Apesar da discordância com nossos resultados, pesquisas de anticorpos anti-*Leishmania* sp na urina de pacientes humanos utilizando variações dos antígenos de *L. infantum* e *L. donovani* no teste ELISA demonstraram elevada sensibilidade e especificidade, principalmente quando comparados a testes como Teste de Aglutinação Direta (DAT) e Immunoblot (ISLAM et al., 2002; HATAM et al., 2007).

O Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7® aqui utilizado, é baseado no reconhecimento de anticorpos específicos utilizando soro sanguíneo, por antígenos previamente fixados, tendo como base um peptídeo recombinante obtido do DNA do protozoário por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção.

Sendo assim, a elevada frequência de resultados negativos nas amostras testadas pode está relacionado ao tipo de material avaliado e metodologia utilizada. Como também, a fase de evolução da doença, fato este, demonstrado por Sartori et al. (1987) que detectou imunoglobulinas na urina de hamsters somente após o estabelecimento total da infecção, e conseqüente diminuição da concentração destas no soro.

De acordo com Zatelli et al. (2003) lesões glomerulares em cães com LVC determinam o aparecimento de proteinúria não seletiva permitindo a passagem de albumina e outros componentes protéicos como, a IgG.

Por outro lado, a utilização do *Cut off* fornecido pelo fabricante e o tipo de antígeno utilizado pode ter influenciado a detecção de anticorpos na urina, em função de que, de acordo com Solano-Galego et al. (2003) títulos e concentrações de anticorpos na urina se apresentam mais baixos que os encontrados no soro.

Estudos anteriores relatam a utilização de antígenos como a Proteína A (SOLANO-GALEGO et al., 2003), culturas de *L. donovani* (ISLAM et al., 2002) e *L. infantum* (HATAM et al., 2007) na pesquisa de anticorpos na urina, obtendo resultados positivos em relação aos diferentes *cut-off* utilizados. Contudo, nestes casos, o *cut-off* foi calculado a partir de urinas negativas.

Tabela 1- Resultado do teste ELISA nas amostras de urina de cães infectados naturalmente por *L. (L.) chagasi* em diferentes diluições.

Animais	1:100	1:50	1:25
1	0.091	0.109	0.111
2	0.074	0.088	0.097
3	0.083	0.061	0.067
4	0.071	0.085	0.065
5	0.083	0.071	0.061
6	0.083	0.090	0.091
7	0.239	0.286	0.326
8	0.068	0.076	0.073
9	0.065	0.080	0.070
10	0.092	0.105	0.114
11	0.072	0.061	0.081
12	0.098	0.093	0.100
13	0.070	0.079	0.087
14	0.063	0.071	0.070
15	0.073	0.065	0.075
16	0.055	0.074	0.080
17	0.069	0.084	0.093
18	0.071	0.054	0.066
19	0.075	0.063	0.075
20	0.121	0.153	0.192
21	0.064	0.118	0.065
22	0.074	0.085	0.085

Segundo Barrouin-Melo et al. (2004) a especificidade e sensibilidade do método variam de acordo com as mudanças no protocolo de execução e o antígeno utilizado.

5.4 Conclusão

A detecção de anticorpos na urina de cães é factível. Contudo, outros estudos devem ser realizados, para só então fazer uso deste tipo de teste.

5.5 Referências

ATTAR, Z.J. et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.15, p.11-16, 2001.

BAKOUSH, O. et al. Urine excretion of protein HC in proteinuric glomerular diseases correlates to urine IgG but not to albuminuria. **Kidney International**, v.60, p.1904-1909, 2001.

BARROUIN-MELO, S. M. et al. Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.2, p. 195-197, Mar. 2004.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Vet News**, New York, ano 10, n. 61, p. 4-5, jan./fev. 2003.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, Londres, n. 22, p. 539-543, nov. 1997.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984. 566p.

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

DUARTE, M.I.S. et al. Interstitial nephritis in human Kala-Azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n.77, p.531-537, 1983.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n. 28, p. 36 – 44, set./out. 2000.

HATAM, G.R. et al. Direct Agglutination Test and Enzyme Linked Immunosorbent Assay with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Iranian Journal Parasitology**, Iran, v.2, n.3, p.24-28, 2007.

ISLAM, M.Z. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay urine samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.4, p.789-794, july 2002.

KOHANTEB J. et al. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n.4,p. 578-580, July-August, 1987.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 15 – 22.

MARTINEZ-MORENO, A. et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, p. 209-220, 1995.

NIETO, C.G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, New York, v.45, p.33-47, 1992.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, Milán, Italia, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

POLI, A. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis - A light microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, n. 57, p. 444–452, 1991.

REZAI, H.R. et al. Immunofluorescence and counter immunoelectrophoresis in the diagnosis of kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p.149-151, 1977.

RIERA, C. et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, New York, v.84, p.33–47, 1999.

RIJAL, S. et al. Evaluation of urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. **Tropical Medicine and International Health**, v.9, n.6, p.724-729, 2004.

SALGADO-FILHO, N. et al. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n.2, p. 217-221, mar-abr, 2003.

SARKARI, B. et al. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. **ActaTropica**, v.82, n.3, p. 339-348, 2002.

SARTORI, A. et al. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. **Parasite Immunology**, Oxford, v.9, p.93-103, 1987.

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

SOARES, M.J.V. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.11, n.4, Botucatu, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 849–855, 2003.

SUNDAR, S. et al. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v.73, n.2, p. 269-271, 2005.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, New York, n. 96, p. 203–212. 2001.

ZARAGOZA, C. et al. SDS-PAGE and western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research**, v.34, p.137-151, 2003.

ZATELI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.5, May 2003.

6- CONCLUSÕES GERAIS

1 - Em áreas endêmicas para LVC, os animais que apresentam alterações na urinálise e presença de infecção bacteriana na urina, devem ser investigados quanto à infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

2 - A pesquisa de proteína e sangue na urina pode ser uma ferramenta importante para avaliar o envolvimento renal na LVC.

3- A detecção de anticorpos na urina de cães é factível. Contudo, outros estudos devem ser realizados, para só então fazer uso deste tipo de teste.