

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CAMPUS DE ARAÇATUBA

Curso de Medicina Veterinária

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
PELAS TÉCNICAS DE IMUNOISTOQUÍMICA E PCR EM
TECIDOS CUTÂNEOS EM ASSOCIAÇÃO COM A RIFI E
ELISA-TESTE**

Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz

Bióloga

**ARAÇATUBA – SP
2008**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CAMPUS DE ARAÇATUBA

Curso de Medicina Veterinária

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA
PELAS TÉCNICAS DE IMUNOISTOQUÍMICA E PCR EM
TECIDOS CUTÂNEOS EM ASSOCIAÇÃO COM A RIFI E
ELISA-TESTE**

Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Starke Buzetti

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Caris Maroni Nunes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

**ARAÇATUBA – SP
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

Q3d Queiroz , Nina Marí Gual Pimenta de
 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de
 imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a
Rifi e Elisa-teste / Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz. –
Araçatuba: [s.n.], 2009.
 125 f. : il. + CD ROM

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária,
 Araçatuba, 2009.

 Orientador: Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti
 Co-orientador: Profa. Dra. Caris Maroni Nunes

 1. Leishmania. 2. Cães. 3. Serologia.

CDD 616.9364

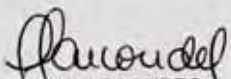
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

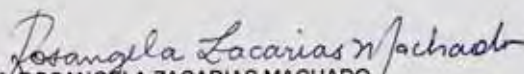
TÍTULO: Diagnóstico da leishmaniose visceral
baseado pelas técnicas de imunistoquímica
e PCR em tecidos cutâneos em associação
com a RIFI e ELISA-teste.

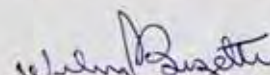
AUTOR: NINA MARÍ GUAL PIMENTA DE QUEIROZ

ORIENTADOR: Drª. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

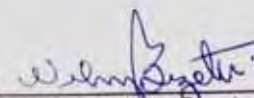
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Drª. MARY MARCONDES


Drª. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO


Drª. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

DATA DA REALIZAÇÃO: 18 de dezembro de 2008.


Presidente da Comissão Examinadora
Drª. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NINA MARÍ GUAL PIMENTA DE QUEIROZ – nascida em Ribeirão Preto (SP), a 16 de março de 1984. Ingressou em 2002 no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), colando grau em dezembro de 2006. Em março de 2007, iniciou como aluna regular da Pós-graduação em Ciência Animal, do Curso de Medicina Veterinária da FOA - UNESP, Campus de Araçatuba.

*“O Amor e a Sabedoria são as
duas asas com que a alma se elevará
para a perfeição infinita.”*

Emmanuel

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a uma flor que tem enfrentado com coragem as asperezas do ambiente, pois é tempo de desabrochar e florir para a vida. Esta linda flor, ao escolher renascer entre nós, tem alegrado e servido de exemplo para cuidarmos do jardim de nossos corações e buscarmos viver com fé, alegria, gratidão e muito esforço para evoluirmos e crescermos seguindo as diretrizes do mestre Jesus, pois é assim que ela tem enfrentado os desafios do caminho e a cada vitória exala perfume ainda mais doce.

Esta flor tem nome e se chama **Maíra**.

AGRADECIMENTOS

Em busca de aprimorar meus conhecimentos e conquistar o título de mestre, muitos outros mestres, com ou sem título, ensinaram-me as diversas facetas da vida, a eles sou grata:

Acima de tudo agradeço a Deus e aos ensinamentos do grande mestre Jesus que iluminam minha caminhada, abençoando, orientando e dando segurança a cada um de meus passos.

Aos meus queridos pais e avós, mestres da vida, que me aceitaram com carinho e me educaram para o mundo, sem deixar que se desfizessem os laços que nos unem e me amparam constantemente.

Os maiores aprendizados com certeza estão entre os mais próximos, por isto agradeço a toda minha família, em especial às minhas irmãs, que nunca faltaram com estímulos para que eu seguisse confiante.

Entre tantos mestres que tive durante minha formação acadêmica, agradeço em especial à prof. Dr^a Wilma A. Starke Buzetti, por aceitar sempre os desafios, incluindo o de orientar-me, de permitir lançar-se em novas áreas de pesquisa, investir neste projeto e mostrar-me os caminhos deste universo que pretendo percorrer. Agradeço por sempre trabalharmos de forma agradável, numa relação de compreensão, carinho e amizade, proporcionando a mim outros aprendizados além da ciência.

Agradeço às pessoas que desde o início da idealização deste projeto até a sua conclusão, auxiliaram-me com muito esforço e amizade: Kika, Camila, Rita, Mychele, Silvana, Karen, Flávia e em especial à Juliana que enfrentou comigo os desafios desta etapa do mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, em especial aos técnicos do Laboratório de Parasitologia.

Em nome do Carlinhos, agradeço a toda equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Ilha Solteira que não mediu esforços em apoiar e colaborar com o projeto.

Ainda nesta união de forças em prol da ciência, gostaria de agradecer imensamente à equipe do Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Campus de Jaboticabal, em especial à prof. Dr^a Rosângela Zacarias Machado e à Tricia, pela realização dos exames sorológicos e incansável orientação e colaboração.

Da mesma forma, agradeço em especial à prof. Dr^a Caris Maroni Nunes pela co-orientação e toda a equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista (FOA-UNESP), onde foram realizados os exames moleculares.

Sinceros agradecimentos à instituição, aos funcionários e ao diretor da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba.

Ao incentivo e ao financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através dos quais foi possível desenvolver e concluir esta pesquisa com qualidade.

Enfim, a cada um dos amigos dos dois planos, que se sentirem parte integrante desta curta, mas valorosa caminhada, agradeço pelo amparo e pelas oportunidades constantes de evolução.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	12
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODO	31
3.1 Local	31
3.2 Animais	31
3.2.1 Formação dos Grupos de Cães	32
3.3 Exames Sorológicos	33
3.3.1 ELISA indireto	33
3.3.1.1 Descrição da técnica	33
3.3.1.2 Tratamento dos dados	34
3.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	35
3.3.2.1 Descrição da técnica	35
3.4 Exames Parasitológicos	36
3.4.1 Histoquímica (HE)	36
3.4.2 Imunoistoquímica (IMIQ)	37
3.5 Exame Molecular	38
3.5.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	38

3.5.1.1 Extração do DNA	38
3.5.1.2 Concentração e pureza do DNA	39
3.5.1.3 Amplificação do DNA	39
3.5.1.4 Análise do DNA	40
3.6 Análise Estatística	40
4 RESULTADO	41
4.1 Sinais Clínicos e Alterações Anatomopatológicas	41
4.2 Exames Parasitológicos	43
4.2.1 Exame Histoquímico (HE) e Avaliação Histopatológica	43
4.2.2 Exame Imunoistoquímico (IMIQ)	48
4.3 Exames sorológicos (ELISA e RIFI)	50
4.4 Exame Molecular por PCR	51
4.5 Análise comparativa entre os métodos de diagnóstico	55
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	87
Apêndice A	88
Apêndice B	90

DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA PELAS TÉCNICAS DE IMUNOISTOQUÍMICA E PCR EM TECIDOS CUTÂNEOS EM ASSOCIAÇÃO COM A RIFI E ELISA-TESTE

RESUMO - A leishmaniose visceral canina (LVC) é causada pelo protozoário *Leishmania (L.) chagasi* e a presença deste parasita na pele dos cães reforça a importância destes animais no ciclo de vida da *L. (L.) chagasi* e na infecção humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teste imunoistoquímico (IMIQ) e a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tecidos cutâneos caninos para o diagnóstico da LVC e compará-los com os exames histoquímico (HE) e sorológicos (ELISA e RIFI). Dos 34 cães naturalmente infectados, classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, foram colhidas amostras de pele sadia ou com lesão para a realização da IMIQ, HE e PCR. Não somente peles lesionadas (56,5%), mas também peles sadias (31,8%) encontravam-se positivas pela IMIQ, confirmadas posteriormente pela PCR em 97,8% das amostras. No grupo assintomático, 87,5% estavam negativos pelos testes sorológicos, mas positivos em 50% dos casos pela IMIQ e 100% pela PCR. Entre os oligossintomáticos, 100%, 85,7% e 28,6% encontravam-se positivos, respectivamente pela PCR, sorologia e IMIQ. 91,7% dos polissintomáticos eram soro positivos e tinham parasitas intactos na pele. A PCR apresentou maior positividade, detectando amastigotas na pele de 100% dos cães independente do quadro clínico, do resultado dos exames sorológicos e do teste HE. A eficiência de cada teste variou de acordo com a evolução da doença, demonstrando a necessidade da associação de técnicas, usando IMIQ para confirmação da sorologia e a PCR apenas nos casos ainda suspeitos após a IMIQ, podendo assim aumentar os níveis de positividade e contribuir para o controle desta zoonose.

Palavras-Chave: Leishmania, cães, serologia.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND PCR IN SKIN TISSUES IN ASSOCIATION WITH RIFI AND ELISA-TEST FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS

SUMMARY - Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by a protozoa of the specie *Leishmania (L.) chagasi* and the presence of parasite in the skin reinforces the importance of dogs in the *L. (L.) chagasi* life cycle and for human infection. The purpose of the present study was to evaluate the immunohistochemistry (IMHC) and PCR (Polymerase Chain Reaction) tests for CVL diagnosis and compared the results with serological tests such as the indirect fluorescence antibody test (IFAT), ELISA and a parasitological test (microscopic direct examination of the parasite stained with haematoxylin and eosin - HE). For this study, samples of healthy or lesion skin tissues were obtained from 34 CVL naturally infected dogs classified in three groups: asymptomatic, oligosymptomatic and polysymptomatic. Not only lesion (56.5%) but also healthy skins (31.8%) were positives by IMHC and confirmed by PCR in 97.8% of skin samples. In asymptomatic group, 87.5% dogs were negatives by serological tests, but positives by IMHC in 50% and by PCR in 100%. In oligosymptomatic group, 100%, 85.7% and 28.6% of dogs were positives, respectively by PCR, serological and IMHC tests. In addition, 91.7% of polysymptomatic dogs were serum positives and had intact parasites in the skin. PCR showed higher positivity, detecting amastigotes in skins of 100% dogs regardless their clinical status or the serological or IMHC or HE test results. The efficiency of each test varied in agreement with the evolution of the disease. IMHC may be used to confirm the results of the serology and PCR only in suspicious cases after IMHC. The association of techniques proposed in this study may increase the positivity and contributed to the control of this zoonoses.

Keywords: Leishmania, dogs, serology.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As Leishmanioses são doenças de caráter crônico e com ampla distribuição mundial, causadas por protozoários digenéticos, pertencentes ao filo *Sarcomastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ROSS, 1906). Existem duas formas principais deste parasita, sendo uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, que parasita principalmente células do sistema fagocitário nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2006).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros de acordo com o comportamento evolutivo do parasita no tubo digestório do vetor: *Leishmania*, com distribuição restrita à porção anterior e média (ROSS, 1903) e *Viannia*, com desenvolvimento desde o intestino posterior até a porção anterior do tubo digestório (LAINSON; SHAW, 1987). Dentro do gênero *Leishmania* existem cerca de 30 espécies, das quais aproximadamente 21 têm capacidade de produzir a enfermidade na espécie humana (ASHFORD, 2000; HERWALDT, 1999). De acordo com a espécie do parasita e das interações entre esses e seus hospedeiros, as patologias são divididas em leishmaniose tegumentar, que envolve manifestações cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, e a leishmaniose visceral com alterações sistêmicas comuns a todos os hospedeiros vertebrados e também cutâneas muito freqüentes nos cães (ASHFORD, 2000; MICHALSKY et al., 2002; RIBEIRO, 1997).

A leishmaniose visceral (LV) é causada por três espécies que tem características clínicas e epidemiológicas distintas, além de ocorrerem em

diferentes regiões geográficas, sendo a *Leishmania (Leishmania) donovani* encontrada na Índia, Bangladesh e Nepal; a *L. (L.) infantum* de manifestação na região do mar Mediterrâneo, Europa, África e China e a *L. (L.) chagasi* nas Américas do Norte, Central e do Sul (WHO, 2002). A morfologia da *L. (L.) chagasi* e da *L. (L.) infantum* é muito semelhante, por isso, alguns autores compararam suas estruturas em estudos bioquímicos e moleculares e sugeriram que ambas podem ser consideradas como uma única espécie, permitindo assim denominar de *L. (L.) infantum* o agente etiológico desta zoonose também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999).

A LV caracteriza-se por um conjunto de manifestações complexas e multifacetadas, causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania*, transmitidas por insetos vetores que afetam tanto humanos como animais domésticos e silvestres e estão distribuídas por todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártida. As leishmanioses são um grave problema de saúde pública, com prevalência mundial estimada em 12 milhões de casos e incidência anual de 1,5 - 2 milhões de casos, sendo 1 - 1,5 milhões de leishmaniose cutânea e 500.000 da forma visceral, distribuídos em áreas cada vez maiores e muitas delas que não eram anteriormente endêmicas (WHO, 2002).

Esta doença já foi considerada uma doença rural, tipicamente silvestre. Todavia, as modificações ambientais causadas pelo homem e a constante migração das populações da zona rural para as zonas urbanas tem promovido a urbanização da doença (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MENDES et al., 2002). Outros fatores associados com o aparecimento da doença são a coleta de lixo, o sistema de esgotos irregulares ou ausentes e o acúmulo de matéria orgânica devido à presença de animais no peridomicílio (BARBOZA et al., 2006; MOREIRA JUNIOR et al., 2003; MORENO et al., 2005). A característica genética determina as diferentes respostas imunológicas nos cães, sendo que alguns animais ou raças podem ser mais resistentes do que outros, determinando a susceptibilidade à doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

Os casos humanos de LV estão freqüentemente associados à pressão antrópica sobre o meio ambiente, os principais atingidos são as crianças menores de 10 anos (DANTAS-TORRES et al., 2006) e pessoas imunodeprimidas, especialmente aquelas infectadas pelo HIV (ALVAR, 1999; WHO, 2007). A elevada freqüência desta associação está relacionada tanto à reativação da infecção quanto a uma forma alternativa (antroponótica) de infecção primária, decorrente da inoculação intravenosa de *Leishmania* sp, por meio de compartilhamento de agulhas e seringas na transmissão inter-humana. Cerca de 90% desta ocorrência atinge pessoas do sexo masculino que são usuários de drogas intravenosas (SÃO PAULO, 2003). A letalidade da LV vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% no ano de 1994 para 6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85% (BRASIL, 2006).

A doença ocorre em 65 países, sendo que 90% dos casos são provenientes das regiões rurais pobres ou suburbanas de cinco países (Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil). Em toda a América já foram registrados mais de 5.000 casos de LV (PAHO, 2007). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, distribuídos desde o México até o norte da Argentina, sendo 90% dos casos de ocorrência no Brasil (BRASIL, 2003; DESJEUX, 2004; GUERIN et al., 2002; LAINSON; RANGEL, 2005).

O primeiro caso, no Brasil, foi registrado em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu a doença em material de necropsia de paciente oriundo do município de Corumbá no Mato Grosso do Sul (SÃO PAULO, 2003). Em 1934, Henrique Penna observou formas amastigotas de *Leishmania* sp em amostras de fígado de pacientes durante a necropsia. Somente em 1953 registrou-se o primeiro surto da doença no município de Sobral-CE e mais tarde, na década de 80, observou-se uma mudança na distribuição geográfica e a primeira epidemia urbana da leishmaniose visceral em Teresina - PI (COSTA et al., 2005; GONTIJO; MELO, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005). Atualmente, a leishmaniose visceral ocorre de forma endêmica em 20 dos 27 Estados do Brasil, além do Distrito Federal, sendo que em todos eles tem sido

relatada a associação entre a existência de cães infectados e a presença do vetor (LAINSON; RANGEL, 2005; MILES et al., 1999). Nas últimas duas décadas, a LV tem ocorrido com grande frequência em áreas urbanas de cidades, como: São Luis - MA, Natal - RN, Aracaju - SE, Cuiabá - MT, Campo Grande - MS, Belo Horizonte - MG e Rio de Janeiro - RJ (DESJEUX, 2004; GONTIJO; MELO, 2004).

A leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, até 1998, era conhecida pela detecção de casos importados, oriundos de outras regiões endêmicas do país. A partir deste ano registrou-se pela primeira vez um caso autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) em Araçatuba, região noroeste do Estado, com posterior registro do primeiro caso humano em 1999 (GALIMBERTTI et al., 1999). Desde a sua primeira detecção em 1999 até outubro de 2007 a LVC foi registrada em 57 municípios, abrangendo todas as regiões em que o vetor *Lutzomyia longipalpis* foi detectado (regiões administrativas de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente), exceto a Região Metropolitana de São Paulo, em que o mecanismo de transmissão ainda não foi elucidado. A prevalência canina média obtida no Estado de São Paulo em 2006, a partir de inquéritos censitários realizados em 30 municípios, dos 43 com transmissão canina, foi de 7,3%, variando de 0,0% a 20,0%. No entanto, o percentual de eutanásia canina foi inferior a 30% dos cães diagnosticados com a infecção pelo parasita (CAMARGO-NEVES, 2008).

A transmissão da doença na população humana, no período de 1999 até outubro de 2007, foi observada em 48 municípios do Estado de São Paulo. Destes, em 23 notificaram-se casos humanos em 2007 e em sete verificou-se o registro do primeiro caso humano, mostrando claramente que a LV está em fase de expansão no Estado (CAMARGO-NEVES, 2008).

Acredita-se que o aparecimento dos primeiros casos na região Oeste do Estado de São Paulo se deu em continuidade ao avanço da doença no Estado do Mato Grosso do Sul. A expansão e a disseminação da doença aconteceram entre 1998 e 2004, período correspondente à construção do gasoduto Brasil-Bolívia que mobilizou grande número de trabalhadores e seguiu o traçado da

ferrovia e da rodovia BR-262, a qual liga Corumbá ao Espírito Santo (Figura 1). Antes deste período a doença estava praticamente restrita à cidade de Corumbá, no pantanal sul-matogrossense, fronteira com a Bolívia. Ao final da década de 90 já havia se expandido no sentido Oeste - Leste, atingido a capital, Campo Grande, e chegando a Três Lagoas, na divisa com o Estado de São Paulo (ANTONIALLY et al., 2006). No Estado de São Paulo a expansão continuou na mesma direção, e mais recentemente vem acontecendo também no sentido Norte - Sul, na região Leste do Estado de São Paulo, a partir do Estado de Minas Gerais (Figura 2) (CAMARGO-NEVES, 2008).

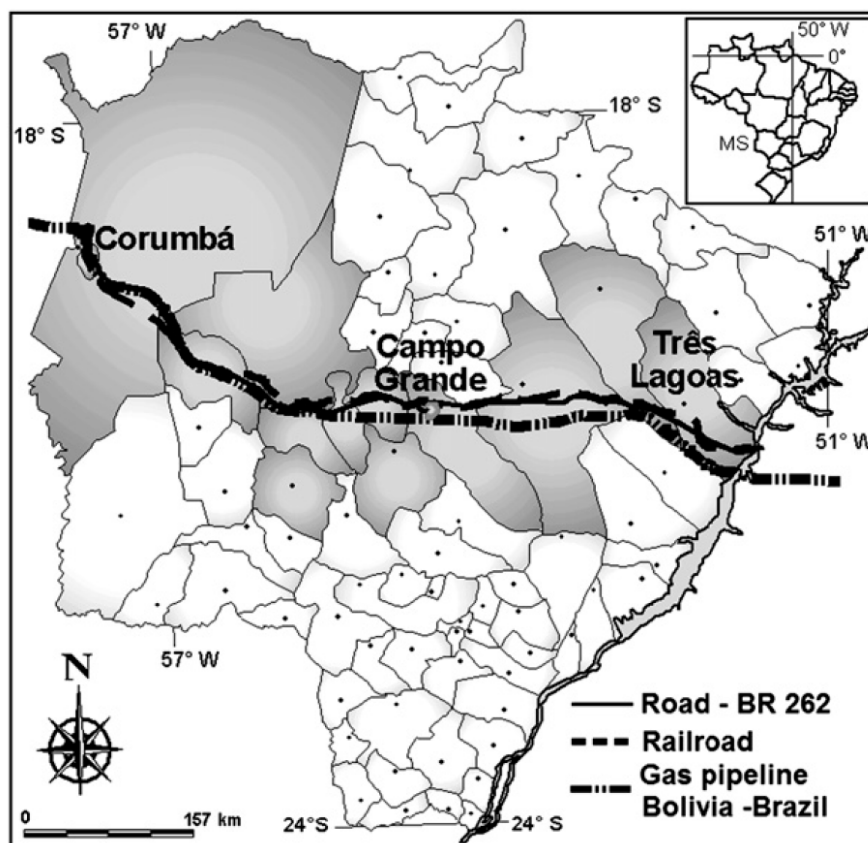


FIGURA 1 - Mapa mostrando a evolução da LV no Mato Grosso do Sul entre os anos de 1913 a 2004 e a coincidência com três distúrbios antropogênicos do desenvolvimento no estado.

Fonte: Antonially et al., 2006

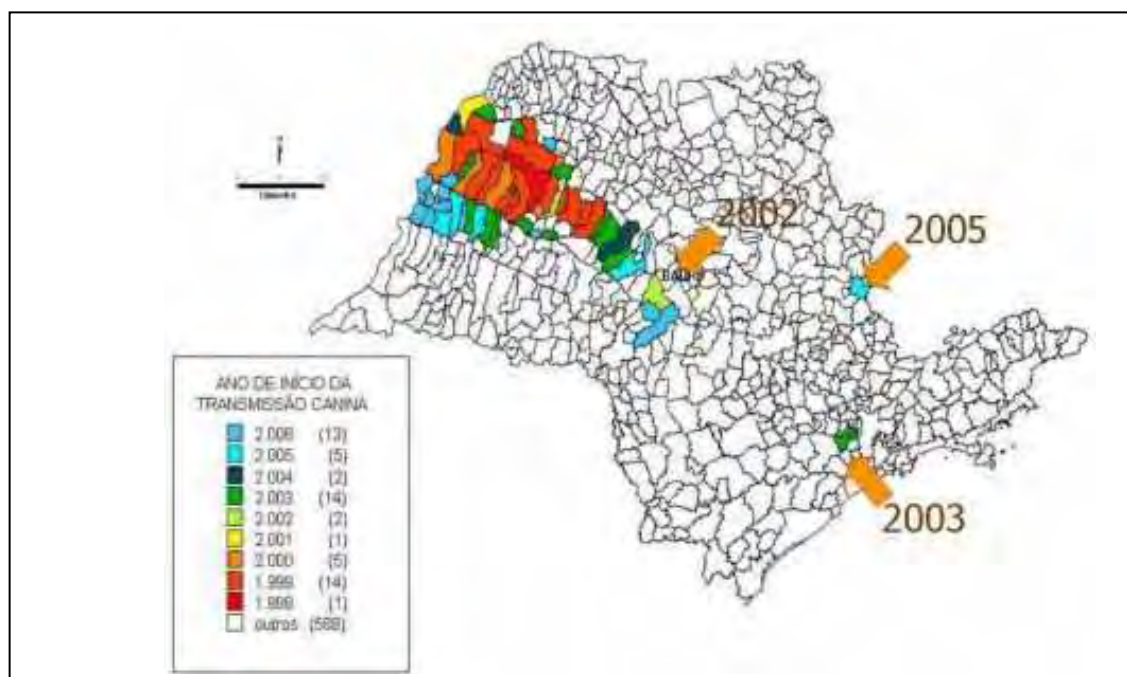


FIGURA 2 - Distribuição de municípios com transmissão da leishmaniose visceral canina, por início de ano de transmissão. estado de São Paulo, 2006.

Fonte: GEL/CCD/SUCEN

Estudos recentes na cidade de Ilha Solteira, área endêmica para LVC, mostram que dos 3798 cães examinados entre julho de 2006 a janeiro de 2007, 355 (9,35%) eram sorologicamente positivos pela RIFI e outros 120 (3,16%) pelo exame parasitológico direto em amostras coletadas através de punção de linfonodo e coradas por hematoxilina e eosina. Em outra avaliação no mês de junho de 2008, 33 cães com sinais clínicos para a LVC foram positivos por exame parasitológico e cinco positivos pelo teste sorológico. Os registros freqüentes de casos de LVC no município indicaram a necessidade de uma melhor adequação dos métodos de controle e diagnóstico da doença (ASSIS et al., 2008).

A forma promastigota é a responsável pela infecção nos hospedeiros vertebrados e se reproduz, sob a forma de amastigotas, por divisão binária simples no interior de vacúolos das células de Kupffer do fígado, nos macrófagos do baço, da medula óssea e dos linfonodos, que são órgãos extremamente ricos em células fagocitárias, bem como nos rins, intestinos,

pulmões e pele (REY, 2001). As amastigotas caracterizam-se pela forma circular e aflagelada, com núcleo grande e arredondado, citoplasma contendo uma estrutura mitocondrial em forma de bastonete e composta por filamentos de ácido desoxirribonucléico (kDNA), denominada cinetoplasto (MICHALIK, 2005). As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo inserido na porção anterior, livre e longo, um núcleo arredondado e um cinetoplasto em forma de bastão (MICHALIK, 2005).

Os vetores responsáveis pela transmissão da LV são insetos da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo a *Lutzomia longipalpis* a principal espécie nas Américas (REY, 2001). Há também registros no Brasil de *L. cruzi* no estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998) e *L. intermedia* no litoral do Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 1994). Estes flebotomíneos são vulgarmente conhecidos como mosquito palha, birigui ou tatuquiras e vivem em habitats variados de áreas silvestres, rurais, suburbanas e urbanas (REY, 2001). As formas imaturas desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa (BRASIL, 1996). Estes insetos são de porte pequeno (1,0 a 4,0 mm), com corpo e asas pilosas e coloração castanho claro ou palha, voam em pequenos saltos e pousam com as asas entreabertas, características que facilitam sua identificação (CASTRO, 1996).

O ciclo biológico da espécie *Lutzomia longipalpis* ocorre em aproximadamente 28 a 36 dias. As fêmeas realizam a ovoposição em locais sombreados, úmidos e ricos em matéria orgânica. Os adultos de ambos os sexos necessitam de carboidrato como fonte de energia, mas somente as fêmeas são hematófagas, pois precisam ingerir sangue para a manutenção dos ovos (SOARES; TURCO, 2003). As fêmeas realizam o repasto sanguíneo no período noturno, iniciando-o cerca de uma hora após o crepúsculo (CASTRO, 1996).

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros vertebrados é através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectados (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Um dos componentes da saliva

de *Lutzomyia longipalpis* é um importante vasodilatador, o maxadilano, que exerce o papel de anticoagulante ao impedir a agregação plaquetária, além de ter ação quimiotática e imunorreguladora em monócitos e macrófagos, respectivamente, inibindo a estimulação dos últimos e reduzindo a capacidade destas células de produzir óxido nítrico ao fagocitar as *Leishmanias* (MICHALIK, 2005).

No momento do repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas inoculam as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, as quais são fagocitadas por macrófagos na derme. A adesão e internalização das promastigotas pelos macrófagos depende de vários receptores, como moléculas da superfície do parasita (lipofosfoglicanos e gp63) ou opsoninas derivadas do hospedeiro (complemento, fibronectina ou imunoglobulinas) e múltiplos receptores nos macrófagos (BLACKWELL et al., 1985; KANE; MOSSER, 2000; MOSSER; ROSENTHAL, 1993). No interior das células fagocitárias, nos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e iniciam intensa reprodução por divisão binária, causando o rompimento das células quando estas já estão repletas de parasitas (REY, 1991). As amastigotas livres são fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

Os insetos infectam-se ao alimentarem-se do sangue de algum hospedeiro vertebrado contendo formas amastigotas. No tubo digestório dos insetos as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas. Alguns mecanismos complexos e fatores de excreção sintetizados pelo protozoário facilitam a sua interação com o hospedeiro e determinam o sucesso da infecção (SCHLEIN, 1992). As formas promastigotas possuem uma camada de moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície e expressam também outros glicoconjugados, como a metaloprotease - gp63, ambos capazes de proteger o parasita da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotomíneo (ALEXANDER et al., 1999). Interações

envolvendo LPG com lectinas e moléculas tipo lectinas presentes no intestino do inseto, impedem que as formas promastigotas procíclicas sejam eliminadas juntamente com o bolo alimentar. Ao se transformarem nas formas metacíclicas infectantes, ocorrem modificações no tamanho e expressão de LPG (CHANG, 1979), que passa a ter reduzida a sua afinidade de ligação às lectinas, levando ao desligamento do epitélio intestinal e migração para a probóscide do inseto. Neste local, o parasita está pronto para uma posterior transmissão ao hospedeiro vertebrado no momento de um novo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002), fechando-se o ciclo (CHANG, 1979; SCHLEIN, 1992; KILLICK-KENDRICK, 2002) que pode se completar em torno de 72 horas (RIBEIRO, 1997).

No homem já foram registradas outras formas de transmissão da doença, tanto por via congênita quanto por transfusão de sangue infectado (PEARSON et al.; 1996). Mas, em cães a transmissão vertical não foi confirmada (ANDRADE et al., 2002). Além disso, na ausência de flebotomíneos no ciclo de transmissão, suspeitou-se da participação do carrapato (*Rhipicephalus sanguineus*) como vetor na transmissão da leishmaniose visceral canina. Experimentos utilizando estes ectoparasitas, infectados por *Leishmania* sp e coletados de cães com LVC, comprovaram a infectividade dos parasitas presentes nestes carrapatos quando administrados via oral em hamsters que adquiriram a doença, comprovando serem eles possíveis vetores alternativos no ciclo de transmissão da LVC (COUTINHO et al., 2005).

O cão tem um papel importante dentro da epidemiologia da doença e é considerado como o principal reservatório para a transmissão ao homem em área urbana (ALENCAR, 1959; ALVAR et al., 2004; ASHFORD et al., 1998; CHAGAS et al., 1938; DEANE, 1956; DEANE; DEANE, 1962), pois neles o agente infeccioso sobrevive e mantém-se no ambiente (ASHFORD et al., 1998), além desta espécie ser abundante e viver tempo suficiente que permita ciclos de transmissão da doença (SALIBA; OUMEISH; 1999). Em ambientes rurais e silvestres outros animais como as raposas e os marsupiais, os roedores, edentados, procionídeos e primatas são relatados como

reservatórios naturais e potenciais da doença (ASHFORD, 1996; DANTAS-TORRES, 2006; DEANE ; DEANE, 1955b; LAINSON; RANGEL, 2005).

As propriedades do parasita e do hospedeiro irão definir o desenvolvimento da LVC de caráter crônico ou agudo (GENARO, 1993; PINELLI et al., 1999). A resposta das células T é o principal fator que influencia a evolução da doença. Estudos realizados em camundongos demonstram que as células apresentadoras de antígenos (APC), que incluem os macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, quando infectadas por estes parasitas, ativam linfócitos ($CD4^+$) Ta1 e Ta2. Quando são estimuladas preferencialmente células Ta1, serão produzidas citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-2 (IL-2), interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), os quais aumentam a eficiência das células fagocíticas e dos linfonodos citotóxicos, desencadeando uma resposta imune celular protetora no controle do parasitismo e podendo até mesmo levar à eliminação da infecção (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; FERRER, 2002). Em contraste, a indução de linfócitos Ta2 promove a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), as quais desencadearão a proliferação de linfócitos B com subsequente produção de uma resposta imune humoral não protetora, estimulando a evolução da infecção (CIARAMELLA; CORONA, 2003; FEITOSA et al., 2000; FERRER, 2002).

As manifestações clínicas da doença no cão e no homem são similares e apresentam sinais inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final (LONGSTAFF et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). As lesões de pele são manifestações comuns na LVC e muitas delas já foram descritas, como a alopecia e as dermatites esfoliativas, ulcerativas, nodulares ou papulares (ORDEIX et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2004). A dermatite esfoliativa é a manifestação cutânea mais comum da LVC (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1992). Mas, os animais com esta doença apresentam também outros sinais clínicos e alterações histopatológicas, como a ortoqueratose; crostas; edemas;

hiperplasia epidermal; dermatites perivascular, intersticial e nodular; perifoliculites; adenite sebácea e paniculites (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Também são observados sinais gerais como linfadenomegalia (em 81% dos casos), hiporexia (58%), onicogribose (51%) e emaciação (47%). A anemia é um achado clínico consistente em 30% dos animais com leishmaniose. Além disso, os cães apresentam sinais oculares (conjuntivite, edema e uveíte), emagrecimento, hipertermia, diarreia, melena, pneumonia, comprometimento do sistema urinário e hepático e sinais de alterações neurológicas (FEITOSA et al., 2000).

No entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta qualquer sinal clínico (CABRAL et al., 1998; SIDERIS et al., 1999). Em torno de 60% a 80% dos cães pertencentes a áreas endêmicas podem ter contato com o parasita e não desenvolver sinais clínicos da doença (FERRER, 1999). Existem evidências de que a taxa de prevalência da infecção em cães assintomáticos pode ser mais alta do que as obtidas por estudos sorológicos (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Os cães assintomáticos são reservatórios perigosos que merecem atenção quanto à expansão da leishmaniose visceral (CABRAL et al., 1998; SIDERIS et al., 1999; SILVA et al., 2001). Análises das peles clinicamente normais de cães com LVC demonstraram a presença de parasitas nestes tecidos, o que alerta para a chance de transmissão da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2004), comprovada em estudos experimentais por Michalsky et al. (2007) que observaram a capacidade de cães assintomáticos em infectarem flebotomíneos assim como os sintomáticos, porém em menor proporção.

As estratégias de controle da doença, no Brasil, estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores através do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (BRASIL, 2003). O custo destas atividades é alto e gera controvérsias, particularmente quanto à eliminação do reservatório canino, que não tem reduzido a incidência da LV em cães e humanos (BRAGA et al., 1998; COSTA; VIEIRA, 2001). A ineficiência desta medida está

relacionada a alguns prováveis fatores, como a incapacidade dos métodos diagnósticos em identificar todos os cães infectados, o longo período de tempo entre diagnóstico e eliminação dos cães positivos, a reposição dos cães por filhotes susceptíveis ou por cães já infectados e a possível existência de outros reservatórios (MILES et al., 1999; REITHINGER et al., 2002). Nunes et al. (2007) observaram que a reposição de uma considerável parcela de cães submetidos a eutanásia, em determinado bairro de Araçatuba – SP, aconteceu em curto período de tempo, preferencialmente por filhotes (< 1 ano) sabidamente mais susceptíveis, sendo uma parcela dos quais já sintomáticos (20,7%) e outra parcela (12,9%) sorologicamente positiva para LVC ao teste ELISA, o que contribuiu para manter no local o processo de transmissão da doença.

A partir dos trabalhos de Chagas et al. (1938), Deane e Deane (1955a) e Alencar (1956), demonstrando a importância do cão na transmissão da leishmaniose visceral no Brasil, vários pesquisadores dedicaram-se ao estudo sorológico de cães infectados, visando obter métodos de diagnósticos que facilitassem a realização de inquéritos epidemiológicos e o conhecimento da distribuição geográfica da leishmaniose.

No Brasil o cão é encontrado parasitado tanto pela *L. chagasi* como pela *L. braziliensis* e pelo *Trypanosoma Cruzi*, sendo comum o encontro de áreas de superposição das leishmanioses tegumentar e visceral, bem como da doença de Chagas (PESSÔA; MARTINS, 1982). Costa et al. (1991) realizaram um estudo comparativo da reação de imunofluorescência indireta em eluatos de sangue de cães infectados experimentalmente com diferentes tripanosomatídeos e utilizaram como antígenos promastigotas de *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Os resultados mostraram que a sensibilidade do método foi de 87,5% para diagnóstico da LVC, independentemente do antígeno empregado; e que ocorreu reação cruzada com leishmaniose tegumentar em 75% dos casos e com doença de Chagas em 83,3%. Outras pesquisas continuaram comprovando a reação cruzada com malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar (SUNDAR; RAI, 2002), com outros tripanossomatídeos

(ALVES; BEVILACQUA, 2004), e com *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (OLIVEIRA et al., 2008). Em estudo realizado por Ferrer (1999), demonstrou-se que a sensibilidade e a especificidade da RIFI variaram de 80 a 100% e Mettler et al. (2005) mostraram baixa sensibilidade desta técnica principalmente em cães assintomáticos. Assim, os autores sugeriram que a RIFI deveria ser usada com cautela nas campanhas de saúde pública, em relação à prevalência da LVC.

Em função da RIFI apresentar baixa especificidade, novos métodos de diagnóstico foram propostos por vários autores nos últimos anos. Deste modo, o teste ELISA-padrão, com a vantagem da possibilidade de automação, foi aprimorado na década de 70 e surgiram diversas variações desta técnica (CABRERA et al., 1999; CHATTERJEE et al., 1999; RACHAMIN; JAFFE, 1988; SCOTT et al., 1991). Entretanto, reações cruzadas continuaram ocorrendo mesmo utilizando o método ELISA (BADARÓ et al., 1996; FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; ROSÁRIO et al., 2005; ROSYPAL et al., 2007; ZANETTE, 2006). O teste ELISA indireto, bem como suas modalidades: Dot-ELISA, fucose-manose-ligante-ELISA, Fast-ELISA e Micro-ELISA, utilizam antígenos solúveis totais ou fracionados de formas amastigotas ou promastigotas de *Leishmania* sp. Este tipo de antígeno limita a especificidade das técnicas e novas buscas por antígenos mais específicos tem sido realizadas (ALVAR et al., 2004), incluindo o estudo de antígenos recombinantes como rK39 e rK26, os quais contribuíram para o aumento da especificidade do teste ELISA indireto, que foi de 100% com o rK-39 e de 96% com o rK-26 (METTLER et al., 2005; REITHINGER et al., 2002; SCALONE et al., 2002) e não apresentaram nenhuma reação cruzada com outros parasitas (ROSÁRIO et al., 2005).

Atualmente, como preconizado pela Secretaria da Saúde do estado de São Paulo, um cão é considerado suspeito para LVC quando apresente pelo menos um dos três seguintes sintomas: descamação, úlceras de pele ou onicogribose, associado(s) a dois ou mais dos seguintes sintomas: ceratoconjuntivite, coriza, apatia, emagrecimento, diarreia, hemorragia

intestinal, vômitos, edema das patas, paresia das patas posteriores e/ou caquexia. A confirmação da suspeita pode ser feita por exames laboratoriais: identificação de *L. chagasi*, a partir da cultura e/ou inoculação em hamster e/ou por técnicas moleculares; exame parasitológico direto; e pesquisa positiva de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* sp. Os cães provenientes de área endêmica ou onde esteja ocorrendo surto, mesmo sem a confirmação de diagnóstico laboratorial, já serão considerados positivos para LVC apenas pela análise dos sinais clínicos citados acima (BRASIL, 2006).

O diagnóstico de escolha para LVC é a demonstração do parasita através de exame direto em amostras de biópsia de linfonodo e medula óssea, coradas por Giemsa. Os testes sorológicos utilizando os “kits” fornecidos pelo Ministério da Saúde, produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, podem ser utilizados também para a confirmação de casos suspeitos e nos inquéritos epidemiológicos caninos, sendo o ELISA utilizado como técnica para a triagem das amostras, visando identificar as negativas, e a RIFI aplicada para a confirmação das amostras reagentes pelo ELISA, como demonstra o quadro 1. Na RIFI, a amostra será considerada reagente quando forem obtidos títulos iguais a 1:40 (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos apresentam mais resultados falso positivos por causa das reações inespecíficas e/ou cruzadas com outros patógenos, além de serem ineficientes para diagnóstico no período de tempo entre infecção e soroconversão (BADARÓ et al., 1983; BARBOSA-DE-DEUS, et al., 2002; INIESTA et al., 2002; MANNA et al., 2004). A manutenção de animais em laboratório para fins diagnósticos é difícil e a cultura do protozoário é demorada e freqüentemente sofre contaminação, o que dificulta seu emprego em larga escala. Já os métodos parasitológicos são mais específicos, mas também trazem desvantagens por serem de difícil aplicação em inquéritos epidemiológicos, mais invasivos já que usualmente requerem punção de medula ou linfonodo e por apresentarem baixa sensibilidade, de 60% para

esfregaços de medula óssea e menor que 30% para esfregaços de linfonodos (FERRER, 1999).

Quadro 1 - Resultado sorológico final para diagnóstico da leishmaniose visceral canina a partir dos resultados obtidos por ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Condutas a serem empregadas segundo normas do Ministério da Saúde do Brasil:

RESULTADO SEGUNDO REAÇÃO SOROLÓGICA		RESULTADO FINAL	CONDUTA EM RELAÇÃO AO RESULTADO FINAL
ELISA	RIFI		
NÃO REAGENTE	NÃO REALIZAR	NEGATIVO	_____
REAGENTE	NÃO REAGENTE	INCONCLUSIVO	- COLETAR NOVA AMOSTRA*
REAGENTE	REAGENTE	POSITIVO	- PROCEDER A EUTANÁSIA DO CÃO EM MUNICÍPIOS COM TRANSMISSÃO CONFIRMADA - REALIZAR EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO E/OU PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE <i>Leishmania</i> EM MUNICÍPIOS SILENCIOSOS RECEPTIVOS VULNERÁVEIS OU NÃO

* Repetir após no mínimo 15 dias e no máximo de 30 dias da data da coleta, se NÃO REAGENTE OU INCONCLUSIVO considerar NEGATIVO. A técnica a ser utilizada na repetição deverá ser a RIFI.

Fonte: Brasil, 2006

Na LVC o parasitismo na pele é muito intenso, pois é nela que se inicia a infecção através da picada do flebotomíneo e durante todo o ciclo o parasita permanece no tecido cutâneo permitindo que novos mosquitos se infectem ao se alimentar do sangue e estejam aptos para transmitir os parasitas a outros vertebrados. Estudos demonstraram que o aumento da carga parasitária na pele estava diretamente relacionado à severidade dos sinais clínicos da doença (GIUNCHETTI et al., 2006; REIS et al., 2006; XAVIER et al., 2006).

A detecção de *Leishmania* sp pela biópsia de pele, que pode ser obtida através de procedimentos cirúrgicos extremamente simples, é uma ferramenta alternativa para o diagnóstico. Entretanto, exames rotineiros, particularmente, secções histológicas coradas com hematoxilina/eosina são muitas vezes

inconclusivas (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2001). Outra técnica interessante que vem sendo aprimorada é a detecção direta de formas amastigotas de *Leishmania* sp pelos métodos imunoistoquímicos, onde os cortes de tecidos de cão e de humanos (LIVNI et al., 1983) são fixados em formalina e embebidos em parafina. O método de imunoistoquímica para identificação da *Leishmania* sp em tecidos é simples, não precisa de equipamentos especiais e é mais sensível e específico do que o exame histoquímico (BOURDOISEAU et al., 1997; FERRER et al., 1988; LIVNI et al., 1983), pois diminui as reações cruzadas com outros tripanossomídeos. A imunoistoquímica, além de aumentar a detecção da forma amastigota da *Leishmania* sp em muitos órgãos, também aumenta em 50% a positividade na pele, quando comparada aos testes histopatológicos de rotina (TAFURI et al., 2004).

Os métodos de amplificação gênica por PCR, mesmo tendo um custo mais elevado, têm se mostrado cada vez mais úteis tanto no diagnóstico como na identificação das espécies de *Leishmania* (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; IKONOMOPOULOS et al., 2003), detectando mais adequadamente a população soronegativa e tentando ultrapassar as limitações do diagnóstico sorológico, pois são mais rápidos, mais sensíveis e específicos, particularmente para a detecção de cães assintomáticos. Rodriguez et al. (1994) mostraram que a PCR adaptava-se especialmente às situações onde poucos organismos são encontrados, com sensibilidade de 94% e podendo detectar a presença de tão pouco quanto 10 parasitas de *Leishmania* sp. Neste tipo de diagnóstico “primers” têm sido desenvolvidos para amplificação específica das regiões do DNA de *Leishmania* sp, podendo ser primers de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) em seqüências de cinetoplastos (kDNA) (RODGERS et al., 1990; SMYTH et al., 1992), ácidos ribonucleicos (RNA) genes espaçadores (HASSAN et al., 1993; VAN EYS et al., 1992) ou repetitivas seqüências nucleares (PIARROUX et al., 1993). Entretanto, os seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, entre elas temos: área endêmica;

tipo de amostra; alvo do DNA utilizado para amplificação; método de extração do DNA, etc. (BRASIL, 2003).

O cinetoplasto é uma organela presente nos kinetoplastidas, formada por cerca de 10.000 minicírculos de DNA (kDNA), com 600 a 800 pb nos membros do gênero *Leishmania* (RODRIGUEZ et al., 2002). Rodgers et al. (1990), adotando “primers” específicos, sugeriram ser possível a amplificação do fragmento da região conservada do kDNA, contendo 120 pb, a partir de um único parasita presente na amostra, sendo a amplificação da região conservada 10 vezes mais sensível do que a região variável. Assim, desenvolveu-se um diagnóstico molecular baseado na amplificação feita por “primers” anelados na região alvo do kDNA de cepas de *Leishmania* sp pela PCR, que tem sido muito utilizado em diversos estudos (FISA et al., 2001; GOMES et al., 2007; IKONOMOPOULOS et al., 2003; LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004; NUNES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2005; QUINNEL et al., 2001; REALE et al., 1999; RODGERS et al., 1990; SOLANO-GALLEGU et al., 2001; XAVIER et al., 2006).

As amostras clínicas mais comumente utilizadas para a detecção por PCR são os aspirados por punção de medula óssea, baço e linfonodos; e as biópsias de pele. Amostras de sangue circulante e “swab” conjuntival apresentam a vantagem de serem de colheita menos invasiva do que punções de medula óssea ou de linfonodos (FERREIRA, 2008; FISA et al., 2001; IKONOMOPOULOS et al., 2003; LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004; STRAUSS-AYALI et al., 2004). No entanto, Solano-Gallego et al. (2001) observaram maior positividade na PCR em amostras de pele de cães (51%) quando comparadas à conjuntiva (32%) e medula óssea (17,8%). E em outro estudo, Manna et al. (2004) encontraram maior positividade nas amostras de linfonodo (99%) quando comparadas às amostras de pele (95%) e de sangue (94%).

Nunes et al. (2007) mostraram que a PCR de sangue periférico não foi uma boa ferramenta para triagem diagnóstica devido à baixa sensibilidade (55%) e especificidade (66,3%) quando comparada à RIFI. Outro estudo

realizado através da amplificação de kDNA de amostras de pele demonstrou uma positividade de 94,9%, enquanto a técnica ELISA revelou apenas 69,2%, mostrando que embora a coleta de pele seja mais invasiva do que a de sangue, a análise de tecidos cutâneos é importante quando se deseja determinar a presença do parasita e a possibilidade de transmissão ao vetor, permitindo assim melhor caracterizar o potencial de reservatório do cão (TRINCONI et al., 2007).

Em áreas de risco para a doença é essencial o uso de métodos de diagnóstico principalmente sensíveis, apresentando altas taxas de positividade e que auxiliem no controle da zoonose. Mas, parece não haver um único método capaz de isoladamente diagnosticar a infecção em todos os cães. A sensibilidade das técnicas varia durante a evolução da doença bem como entre os indivíduos, sendo que no início, antes da soroconversão ou desenvolvimento de sintomas, o exame parasitológico e a PCR são mais sensíveis (QUINNELL et al., 2001). A combinação das técnicas sorológicas e moleculares tem aumentado a prevalência da infecção canina em diferentes áreas endêmicas (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Na comparação dos métodos de histoquímica, imunoistoquímica e PCR, utilizando diferentes regiões da pele de cães, Xavier et al. (2006) sugeriram que a PCR pode ser o melhor método de diagnóstico para LVC utilizando a pele da orelha como amostra, além de apontar a imunoistoquímica como método alternativo para diagnóstico da doença independentemente do estado clínico do animal.

A intenção de auxiliar no controle e combate desta zoonose estimulou a realização desta pesquisa, que focou o estudo da utilização da PCR e da imunoistoquímica de biópsias de pele em busca de uma alternativa para colaborar na complementação e confirmação dos diagnósticos de LVC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a utilização da PCR e da imunoistoquímica de biópsias de pele para colaborar na complementação e confirmação dos diagnósticos de LVC e assim, ajudar no controle e combate desta zoonose.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp em soros de cães assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos pela RIFI e ELISA;
- Verificar a presença de amastigotas de *Leishmania* sp em amostras de tecidos cutâneos com lesão e sadios, através de exames parasitológicos diretos para detecção do parasita (histoquímica e imunoistoquímica) e por exame molecular (PCR);
- Realizar a descrição histopatológica dos tecidos cutâneos infectados com amastigotas de *Leishmania* sp;
- Realizar a comparação entre os métodos de diagnóstico e a associação entre eles, buscando uma alternativa para complementar e confirmar o diagnóstico da LVC.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local

Os cães do presente trabalho pertenciam ao município de Ilha Solteira localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, a uma latitude 20°25'58" Sul e a uma longitude 51°20'33" Oeste.

As técnicas aplicadas neste estudo foram desenvolvidas nos seguintes laboratórios:

- Histoquímica e Imunoistoquímica foram desenvolvidas no Laboratório de Parasitologia/Imunologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - Universidade Estadual Paulista (FEIS-UNESP);
- Exames Sorológicos (RIFI e ELISA) realizados no Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP), Campus de Jaboticabal;
- PCR realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista (FOA-UNESP).

3.2 Animais

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de sangue e pele, sendo 22 amostras de pele sadia e 23 de pele com lesão, colhidas no período de agosto a novembro de 2005 de 34 cães de idade adulta, ambos os sexos e raças variadas, os quais foram doados para pesquisa pelo Controle de

Zoonoses (CCZ) do município de Ilha Solteira - SP. As amostras de pele com lesão foram coletadas principalmente dos locais onde as lesões eram maiores ou estavam mais evidentes e as peles sadias preferencialmente do focinho e ponta de orelha.

Estes animais foram entregues pelos proprietários ao CCZ ou recolhidos por este órgão em áreas de risco por serem suspeitos de estarem positivos para leishmaniose visceral. Os animais tiveram positividade confirmada pelos testes padrões recomendados pelo Ministério da Saúde e realizados rotineiramente nos animais do CCZ (RIFI - utilizando kit Bio Manguinhos, título 1:40).

Os cães foram submetidos à eutanásia pelo CCZ, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser eutanasiados. Para a eutanásia os cães foram anestesiados com pentobarbital sódico (15 mg/kg/iv) e ainda em plano anestésico, aplicou-se posteriormente uma ampola de cloreto de potássio (Samtec) a 19,1%, por via intravenosa, seguindo as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia de animais.

Durante as necropsias, foram realizados “imprinting” de amostras de fígado, baço e linfonodo e a presença de amastigotas de *Leishmania* sp nestes órgãos confirmou a leishmaniose visceral nos cães (dados não mostrados).

3.2.1 Formação dos Grupos de Cães

Antes da eutanásia os animais foram examinados quanto aos sinais clínicos e após a necropsia foram avaliados os sinais anatomopatológicos mais evidentes para leishmaniose visceral e assim, os cães foram separados em três grupos:

- **Cães Assintomáticos (n = 8):** cães sem alterações ao exame físico e macroscópico realizados durante a necropsia;

- **Cães Oligossintomáticos (n = 14):** cães que possuíam até três sinais clínicos, evidenciados por meio de exame físico, ou comprometimento de até três órgãos (evidenciado por exame macroscópico durante a necropsia), independente da gravidade ou dos órgãos acometidos;
- **Cães Polissintomáticos (n = 12):** cães com mais de três sinais clínicos, evidenciados por meio de exame físico, ou com mais de três órgãos acometidos (evidenciado por exame macroscópico durante a necropsia), independente da gravidade ou dos órgãos acometidos.

3.3 Exames Sorológicos

Antes da eutanásia amostras de sangue foram coletadas por venopunção cefálica dos 34 cães e armazenadas em tubo sem EDTA, para obtenção de soro e posterior investigação de anticorpos anti-*Leishmania* sp pelos exames sorológicos.

3.3.1 ELISA indireto

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) para *B. bovis* e adaptado por Oliveira et al. (2005; 2008) para *L. chagasi*.

3.3.1.1 Descrição da técnica

O antígeno solúvel bruto de *L. chagasi* foi obtido após ciclos de congelamento e descongelamento das formas promastigotas. As amastigotas eram coletadas por punção de medula óssea de cão sintomático para LVC e mantidas em meio de cultura RPMI até o desenvolvimento para a forma promastigota.

Em cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nuncclon™ Surface, Nunc. Denmark) para ELISA eram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *L.*

chagasi (na concentração 5µg/ml), diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4°C o excesso de antígeno era removido por três lavagens consecutivas com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram previamente bloqueadas com PBS-Tween 20 acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a 37°C por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador foram adicionados, em duplicata, 100µL dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos na diluição de 1:100 em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As placas foram então novamente incubadas e lavadas. Em seguida, 100 µL do conjugado (IgG de coelho anti IgG de cão, acoplada à fosfatase alcalina, SIGMA A-0793) diluído em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de soro de coelho, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; SIGMA N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 45 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

3.3.1.2 Tratamento dos dados

Os valores de Densidade Óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de 0 (zero) a 9 (nove). O ponto de corte foi para o $NE \geq 3$.

O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. de animais negativos para *L. chagasi*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Machado et al. (1997).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos de acordo com a seguinte equação:

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}{\text{Absorbância média do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}$$

3.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A RIFI foi realizada conforme a técnica utilizada pelo Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, de Belo Horizonte-MG, para diagnóstico de animais infectados por *L. chagasi*, adaptada por Oliveira et al. (2005; 2008).

3.3.2.1 Descrição da técnica

As lâminas contendo o antígeno (promastigotas de *L. chagasi*) foram retiradas do “freezer” e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno foram dispensados 10µL de cada soro teste diluído na concentração de 1:40. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão, de cinco minutos cada. Após secagem à temperatura ambiente, os círculos das lâminas foram recobertos com 10µL do anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (KPL cat nº 02-19-02), diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato

0,5M pH 9,6 e, posteriormente, observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus, BX-FLA).

Após a leitura neste microscópio foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluição $\geq 1:40$.

3.4 Exames Parasitológicos

Os exames parasitológicos e moleculares foram realizados em amostras de pele dos 34 cães, sendo 22 amostras de pele sadia e 26 de pele com lesão. As amostras cutâneas foram fixadas em formalina tamponada a 10% ou em solução Bouin para a histoquímica e a imunoistoquímica.

3.4.1 Histoquímica (HE)

Os tecidos fixados foram emblocados em parafina e três secções de cada amostra foram montadas em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina para posterior avaliação, através de microscópio de luz branca, relativa ao grau de parasitismo de uma a quatro cruzes (+ a +++) e à histopatologia.

Os tecidos foram avaliados conforme a visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp da seguinte forma: tecido negativo (-), sem amastigotas; tecido suspeito (+), quando a coloração não permitiu visualizar e definir claramente os parasitas no tecido, mas havia forte suspeita de que naquele fragmento poderiam haver células parasitadas por amastigotas; tecidos positivos, quando os parasitas foram visualizados dentro ou fora de macrófagos, sendo considerado: tecido fraco positivo (++), quando os parasitas estavam distribuídos esparsamente no tecido; tecido moderado positivo (+++), quando os parasitas estavam presentes em torno de 50% do tecido e tecido forte positivo (++++), quando os parasitas estavam presentes em mais de 50% do tecido. Os animais só foram considerados negativos ou suspeitos após a análise de no mínimo cinco cortes teciduais.

3.4.2 Imunoistoquímica (IMIQ)

A imunoistoquímica seguiu os procedimentos indicados por Tafuri et al. (2004), com algumas adaptações. O anticorpo primário foi o soro hiperimune de cães naturalmente e comprovadamente infectados com *L. chagasi* (RIFI com título = 1: 2560) e como anticorpo secundário anti-IgG biotinilado de coelho produzida em cabra, que reage de forma cruzada com imunoglobulinas de cão produzindo pouco “background”.

Nesta técnica as lâminas foram previamente desparafinizadas e hidratadas em passagens sucessivas em xilol e álcool etílico. Antes de adicionar o anticorpo primário, a enzima peroxidase endógena foi bloqueada usando-se a solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,3% diluído em 0,01M de solução salina fosfatada tamponada (PBS) e as reações inespecíficas do anticorpo secundário foram inibidas usando-se o soro normal de coelho na diluição 1/50. O anticorpo primário foi incubado sobre o tecido a ser analisado em uma câmara úmida a 4°C por aproximadamente 12 horas. Após os enxágües em PBS, o anticorpo secundário foi usado na diluição 1/500 e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo secundário utilizado foi uma anti-IgG de coelho (reação cruzada com cão) produzido em cabra, conjugado à biotina e não à peroxidase, sendo esta a alteração realizada por nós na técnica descrita por Tafuri et al (2004). O complexo “Avidin-Biotin Peroxidase” (Vectstain ABC Kit; Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) foi usado para detecção da reação imunológica. Após os devidos enxágües em PBS, as lâminas foram imersas por 7-15 minutos em uma solução preparada a fresco de substrato cromógeno específico para peroxidase (Substrato “New Red”- Vector Laboratories). Após outro enxágüe, mas em água destilada, os tecidos foram corados pela hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula. Os controles negativos sofreram este mesmo procedimento, mas sem o anticorpo primário ou o secundário. Duas lâminas para cada grupo de animal foram analisadas imunoistoquimicamente. Soros e tecidos de cães saudáveis também

foram testados como controle negativo da reação. Os parasitas quando presentes nos tecidos coraram-se na cor vermelho tijolo.

As amostras de tecido tratadas como descrito acima tiveram o diagnóstico concluído após exame de uma a cinco secções, sendo o resultado já considerado positivo quando pelo menos em uma secção detectou-se a presença de amastigotas.

3.5 Exame Molecular

3.5.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

No momento das necropsias as amostras de pele dos 34 animais (22 amostras de pele sadia e 26 de pele com lesão), colhidas assepticamente, foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido antes de serem armazenadas em freezer a -70° C até a extração do DNA.

3.5.1.1 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de pele foi realizada utilizando o “Kit QIAamp Blood and Tissue” (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA), conforme o protocolo a seguir: 30 mg de tecidos cutâneos sofreram lavagem rápida com tampão fosfato-salina (PBS) sendo depositados em tubos de 1,5 mL. Os tecidos foram macerados com o auxílio de pistilo de plástico, foram adicionados 180 µL de “Buffer ATL” e 20 µg/mL de Proteinase K, sendo as misturas intensamente homogeneizadas (Vortex®) e incubadas a 56° C por três horas e agitadas a intervalos de 15 minutos ou durante a noite. Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e adicionou-se 200 µL de “Buffer AL” seguindo-se de nova agitação e incubação a 70° C por 10 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 200 µL de álcool etílico absoluto gelado, seguida de nova agitação por 15 segundos e deposição da mistura no centro da coluna de cromatografia contida no kit, que foi centrifugada por 6.000 g por

dois minutos. O tubo contendo o líquido eluído foi descartado, sendo substituído por outro igual. Foram adicionados 500 µL de “Buffer AW1” à coluna de cromatografia, que foi centrifugada a 6.000 g por dois minutos. O mesmo procedimento de descarte e substituição foi realizado e, após a adição de 500 µL de “Buffer AW2” foi realizada a centrifugação da coluna contendo a amostra (20.000 g por três minutos), seguida pelo descarte do líquido e nova centrifugação por mais um minuto. A coluna, contendo o DNA aderido, foi introduzida em um tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 50 µL de tampão AE e em seguida incubada a temperatura ambiente por cinco minutos, com subsequente centrifugação (6000 g por dois minutos). Este procedimento foi realizado novamente sendo o DNA eluído da coluna em volume final de 100µL.

3.5.1.2 Concentração e pureza do DNA

A concentração de DNA extraído foi avaliada por espectrofotômetro, sendo que a referência foi determinada na DO de 260 nm, enquanto a pureza do DNA foi determinada pela razão de DO de 260 a 280 nm.

3.5.1.3 Amplificação do DNA

Na reação de amplificação utilizou-se o par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* sp descrito por Rodgers et al. (1990): 13A 5´-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3´ e 13B 5´-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3´ como iniciadores para a amplificação de fragmentos de DNA de 120 pares de base (pb) conservados do minicírculo do cinetoplasto. As reações foram constituídas de 1 U de DNA polimerase Platinum® *Taq* (Invitrogen-Carlsbad-Califórnia), 15,25 µL de água ultra pura, tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,31 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,26 µM de “Primer” “Forward”, 0,26µM “Primer” “Reverse” e 2,5 µL de DNA extraído da amostra, sendo que a quantidade de DNA variou de 50 ng a 300 ng nas reações, num volume final de 25 µL. Os DNAs das amostras foram submetidos

a ciclos de temperaturas pelo aparelho termociclador (MJ Research Thermal Cycler GMI, Inc. Ramsey-Minnesota) com desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos e 35 ciclos de 95° C por 30 segundos para desnaturação, 63° C por 45 segundos para associação, 72° C por 30 segundos para extensão e 5 minutos por 72° C para extensão final. Os controles positivos utilizados foram DNA de *Leishmania* sp extraído de pele de cães naturalmente infectados, segundo Nunes et al. (2007); e os controles negativos foram DNA de pele de cães saudáveis de área não endêmica para leishmaniose visceral (Lençóis Paulista – SP), sabidamente negativos pela PCR. Além disso, uma mistura contendo apenas 22,5 µL dos reagentes, sem DNA, foi utilizado para o controle da reação (NO).

3.5.1.4 Análise do DNA

Para analisar os resultados das reações, 8µL dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, por 3 horas e meia, a 100 V, em tampão TBE (89 mM Tris borato, 2 mM EDTA, pH 8,3). Como controle foi adicionado também o peso molecular de 100pb em cada gel. Após a corrida o gel foi corado com nitrato de prata e fotografado com câmera digital Cyber-shot de 7.2 Mega pixels, modelo DSC-W70 – SONY.

3.6 Análise Estatística

Para avaliar a concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico, calculou-se o índice Kappa (κ) de concordância (intervalo de confiança 95%), usando o programa Biostat (versão 4.0) (AYRES et al., 2005), sendo $\kappa < 0,4$ aceito como concordância fraca, $0,4 < \kappa < 0,7$ como concordância boa e $\kappa > 0,7$ como ótima.

4 RESULTADO

4.1 Sinais Clínicos e Alterações Anatomopatológicas

De acordo com os exames clínicos os cães foram subdivididos em três grupos: cães assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Desta forma, no grupo dos assintomáticos os cães apresentavam aparência saudável. Nos cães oligossintomáticos, as alterações clínicas e anatomopatológicas mais comuns foram: alterações gerais de pele 10/14 (71,0%) e mucosas pálidas 5/14 (36,0%) (Figura 3).

Já os cães sintomáticos estavam bastante comprometidos, apresentando principalmente alterações gerais de pele em 12/12 (100,0%), esplenomegalia em 10/12 (83,0%), fígado ictérico em 9/12 (75,0%), emagrecimento 7/12 (58,0%), linfonodos hipertróficos e onicogrifose em 6/12 (50,0%), além de outros sinais clínicos menos freqüentes (Figura 4).

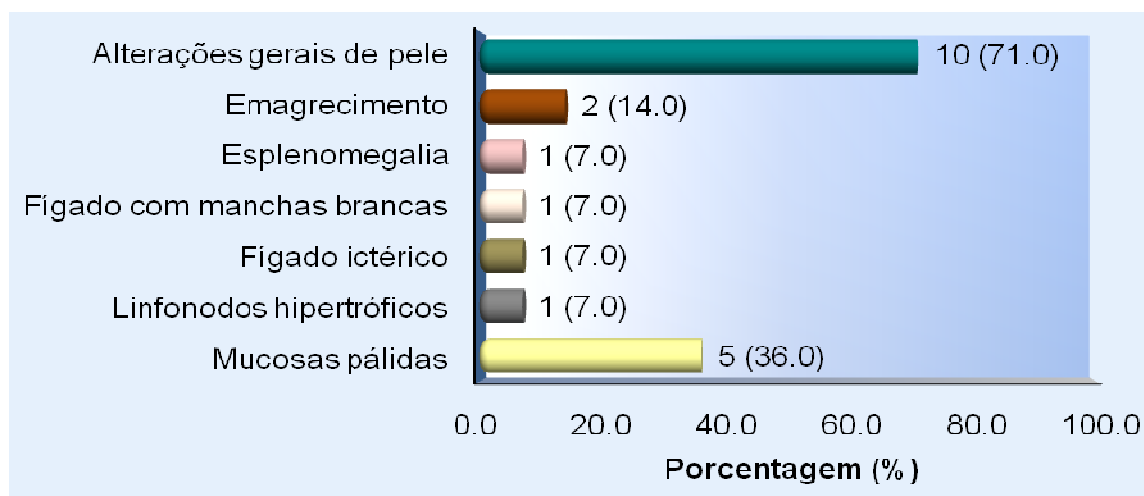


FIGURA 3 - Sinais clínicos e alterações anatomopatológicas observados em 14 cães oligossintomáticos, portadores de leishmaniose visceral canina e provenientes de Ilha Solteira (Araçatuba-SP, 2008).

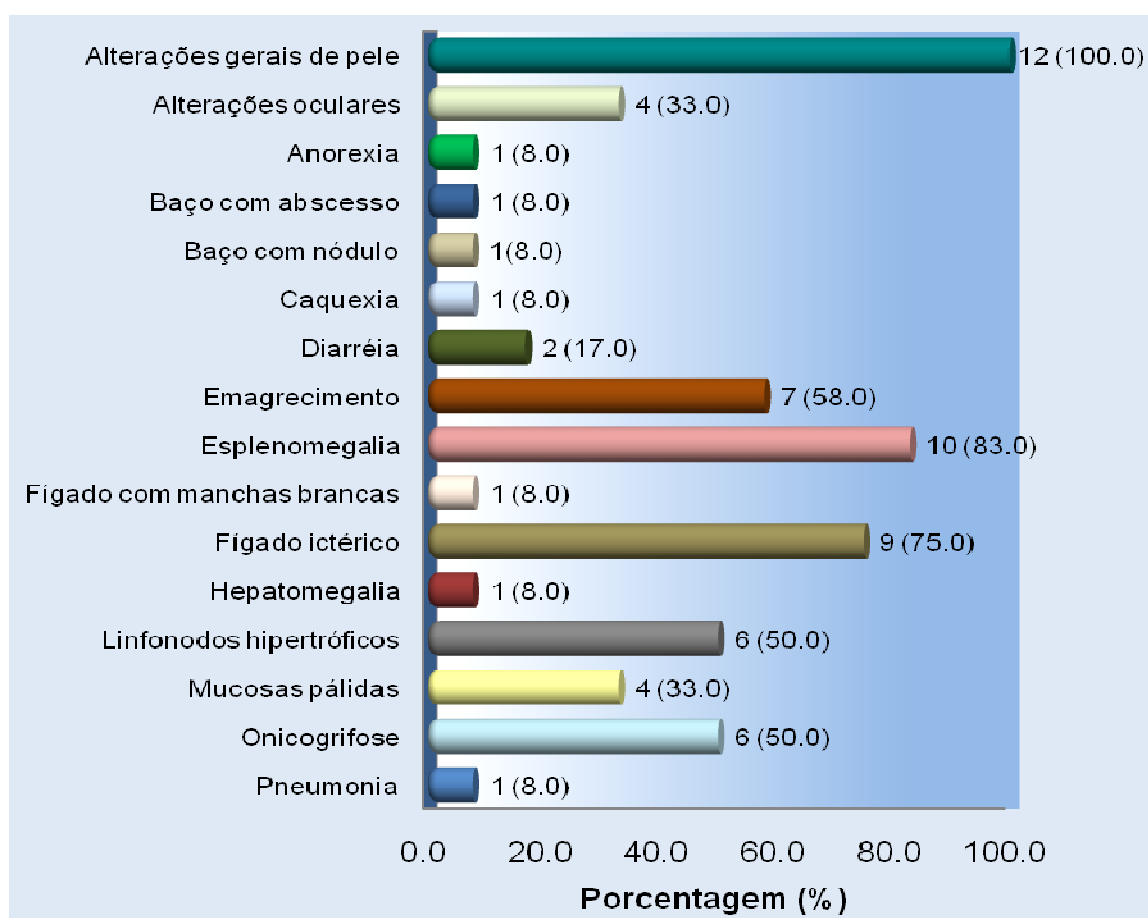


FIGURA 4 - Sinais clínicos e alterações anatomopatológicas observados em 12 cães sintomáticos, portadores de leishmaniose visceral canina e provenientes de Ilha Solteira (Araçatuba-SP, 2008).

4.2 Exames Parasitológicos

4.2.1 Exame Histoquímico (HE) e Avaliação Histopatológica

Dentre os 34 cães estudados no presente trabalho, oito (23,5%) foram classificados como assintomáticos, 14 (41,2%) oligossintomáticos e 12 (35,3%) polissintomáticos para leishmaniose visceral canina.

Pela avaliação clínica, os cães assintomáticos não apresentavam qualquer lesão cutânea aparente e pelo exame parasitológico direto verificou-se que a maioria das amostras de peles sadias colhida destes animais estava de fato negativa (5/8 ou 62,5%) (Tabela 1). No entanto, 3/8 (37,5%) dos cães assintomáticos apresentaram de moderada a intensa carga parasitária (++ a ++++) nas amostras sadias de pele, especialmente o animal nº 19 que apresentava numerosos macrófagos parasitados com *Leishmania* sp.

No grupo dos cães oligossintomáticos, as amostras foram colhidas tanto de peles com lesão (11 cães) como de peles sadias (14 cães). Embora neste grupo (Tabela 1), 11/14 (78,6%) cães apresentassem lesões de pele, apenas 2/11 (18,2%) das amostras de pele destes cães foram confirmadas como positivas e 7/11 (63,6%) foram consideradas suspeitas. Nas amostras de pele sadia, por outro lado, 10/14 (71,6%) eram negativas, 2/14 (14,2%) consideradas suspeitas e 2/14 (14,2%) positivas com carga parasitária variando de moderada a intensa (++ e ++++).

As análises microscópicas das amostras de pele dos cães oligossintomáticos revelaram diferentes manifestações de dermatites, sendo as dermatites perivasculares e perifoliculares as mais comuns (Figura 5). Semelhante ao assintomático, um cão oligossintomático nº 12 (Figura 5 e Apêndice) apresentou carga parasitária intensa (++++) mesmo na pele aparentemente sadia. Amastigotas foram vistas, particularmente dentro dos macrófagos da derme superior, média (Figura 5A, 5B e 5D) e profunda, hipoderme (Figura 5C) e entre as fibras musculares (Figura 5E e F). Porém, na maioria dos casos, os parasitas não foram identificados nos cães apresentando

dermatites com predominância de células polimorfonucleares, especialmente neutrófilos, edema, epidermes lesionadas, hemorragias e congestão dermal.

Entre os cães polissintomáticos, 100% apresentavam lesões de pele e destes 75,0% foram positivos com cargas parasitárias variando de ++ (25,0%), +++ (16,7%) e ++++ (33,3%) (Tabela 1). A dermatite esfoliativa foi a manifestação observada na maioria destes cães caracterizada pela ocorrência de hipotricose e alopecia em diferentes partes do corpo e por presença de crostas e hiperqueratose, principalmente em regiões correspondentes a articulações dos membros torácicos e pélvicos. Os animais apresentavam também alopecia periocular e lesões na ponta dos pavilhões auriculares. Estes animais com positividade intensa, particularmente o animal nº 30 (Apêndice), apresentaram intenso infiltrado de células mononucleares, com predominância de macrófagos repletos de amastigotas de *Leishmania* sp em todas as camadas da pele: derme superior (Figura 6A e D), média e profunda (Figura 6C) e ao redor das células musculares logo abaixo da hipoderme. Observou-se ainda uma inflamação dermal difusa com desarranjo completo das fibras conjuntivas que foram substituídas por uma reação inflamatória mononuclear (Figura 6A) nodular (Figura 6B) e dermatite perivascular (Figura 6D). Além disso, poucas amastigotas foram vistas fora das células, pois na maioria dos casos havia predominância de amastigotas de *Leishmania* sp intramacrofágicas (Figura 6E e F).

Tabela 1 – Resultados em números (N) e porcentagens (%) da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp em fragmentos de pele com ou sem lesão processados por histoquímica (HE), obtidos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Grupos (N)	Classifi- cação das Pele (N)	Números e porcentagens de fragmentos de pele negativas ou positivas pela HE					
		Negativos	Suspeitos	Positivos			Total
				++	+++	++++	
				N (%)	N (%)	N (%)	
A (8)	Sadia (8)	05 (62,5)	00 (00,0)	02 (25,0)	00 (00,0)	01 (12,5)	03 (37,5)
O (14)	Sadia (14)	10 (71,6)	02 (14,2)	01 (07,1)	00 (00,0)	01 (07,1)	02 (14,2)
	Lesão (11)	02 (18,2)	07 (63,6)	01 (9,1)	01 (9,1)	00 (0,0)	02 (18,2)
P (12)	Lesão (12)	00 (00,0)	03 (25,0)	03 (25,0)	02 (16,7)	04 (33,3)	09 (75,0)
Total de amostras (45)		17 (37,8)	12 (26,7)	7 (15,5)	3 (06,7)	6 (13,3)	16 (35,5)

++ = fraco positivo, +++ = moderado positivo, ++++ = forte positivo. N = número de animais ou amostras de pele.

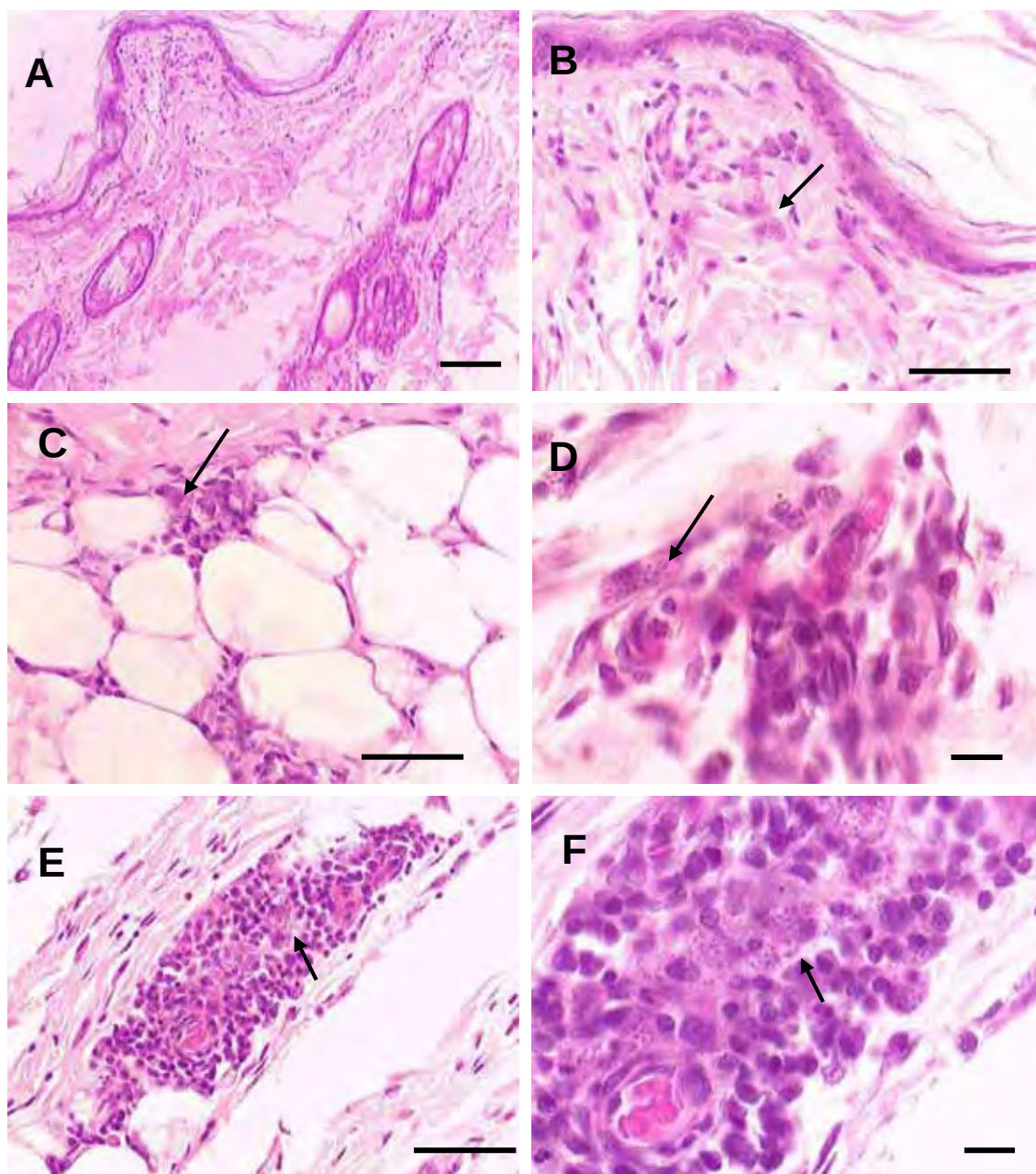


FIGURA 5 - Fotomicrografias de secções de **pele sadia** de focinho de um cão portador de leishmaniose visceral e oligossintomático (cão nº 12). (A) Moderada dermatite pervascular e perifolicular na derme superior e profunda. (B) Ampliação da Fig. A, mostrando muitos macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* sp logo abaixo da epiderme. (C) Moderada reação inflamatória na hipoderme, com parasitas nos macrófagos ao redor dos vasos linfáticos e sanguíneos (D). Nas Figs. E e F, é possível ver uma reação inflamatória nodular entre as fibras musculares abaixo da hipoderme com predominância de células mononucleares, especialmente macrófagos, poucos linfócitos e plasmócitos. Muitas células infectadas por *Leishmania* sp no centro do nódulo e ao redor de vasos sanguíneos podem ser vistas (F). Setas pretas mostram amastigotas intracelulares. Barra = 100 μ m (A); 50 μ m (B, C e E); 10 μ m (D e F). Coloração HE.

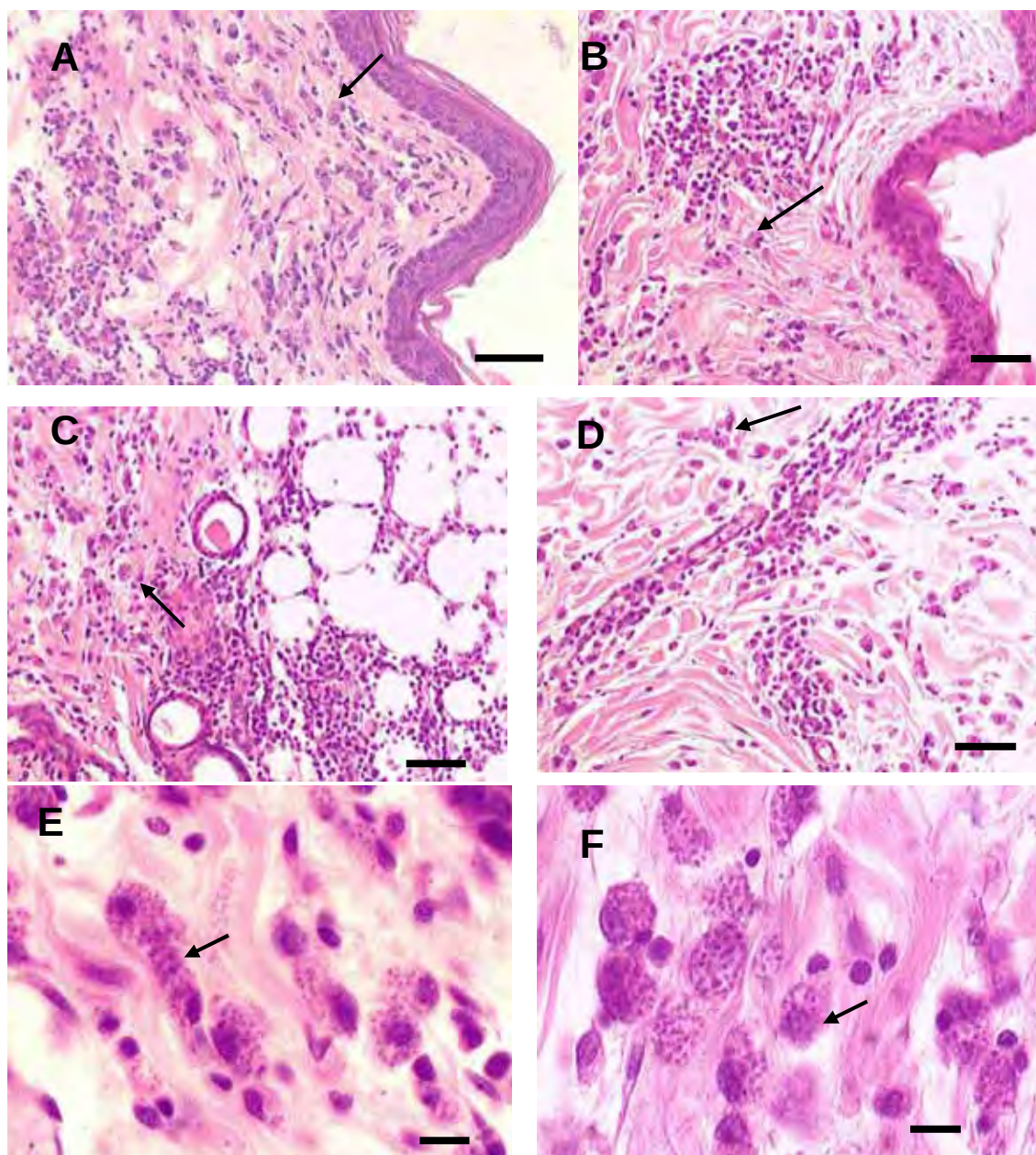


FIGURA 6 - Fotomicrografias de secções de pele com lesão de um cão portador de leishmaniose visceral e sintomático (cão nº 30) que apresentava intensa carga parasitária. Dermatite mononuclear difusa (A) e nodular (B) mostrando um alto número de células inflamatórias mononucleares, com predominância de macrófagos na região superior e média da derme com grande quantidade de amastigotas. (C) Dermatite perivascular na região média da derme e reação inflamatória intensa na derme profunda e hipoderme (D). Ampliação destas secções na E e F mostrando predominância de amastigotas de *Leishmania* sp intramacrofágicas. Setas pretas mostram amastigotas intracelulares. Barras = 50 μ m (A, B, C e D) e 10 μ m (E e F). Coloração HE.

4.2.2 Exame Imunoistoquímico (IMIQ)

O método IMIQ foi utilizado para detectar *Leishmania* sp em amostras de pele dos cães e para confirmação dos resultados do HE. Os resultados relativos à técnica de coloração IMIQ estão na Tabela 2 e mostraram que 04/08 (50%) das amostras cutâneas dos cães assintomáticos e 03/14 (29,4%) dos oligossintomáticos tinham parasitas intactos nas amostras de pele sadia, enquanto 02/11 (18,2%) e 11/12 (91,7%) dos oligossintomáticos e polissintomáticos, respectivamente, apresentavam amastigotas nas amostras de pele com lesão.

A Figura 7 mostra uma reação imune positiva em amostra de pele com lesão do cão sintomático nº 30 (Apêndice), onde haviam muitos macrófagos repletos de amastigotas de *Leishmania* sp. As amastigotas foram coradas em vermelho tijolo pela imunoperoxidase devido ao cromógeno utilizado e assim foi possível visualizar um alto grau de contraste entre o parasita e o tecido do hospedeiro.

Quando os resultados das técnicas HE e IMIQ foram comparados, observou-se que o número de cães positivos foi maior pela IMIQ (19/34, 55,9%) do que pela HE (15/34; 44,1%) (Tabela 8 e Apêndice) e 11/34 (32,3%) cães foram considerados suspeitos (+) ou inconclusivos na HE, principalmente no grupo dos oligossintomáticos. Quando estas amostras de pele inconclusivas foram especificamente coradas por imunoistoquímica, três delas passaram a ser consideradas positivas e nove negativas. O índice Kappa de concordância entre IMIQ x HE não foi testado em função da presença do alto número de suspeitos pelo exame parasitológico HE.

Tabela 2 – Resultados em números (N) e porcentagens (%) da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp em fragmentos de pele com ou sem lesão processados por imunoistoquímica (IMIQ), obtidos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Grupos (N)	Classificação das peles (N)	Números e porcentagens de fragmentos de peles negativas ou positivas pela IMIQ	
		Negativos N (%)	Positivos N (%)
A (8)	Sadia (8)	04 (50,0)	04 (50,0)
O (14)	Sadia (14)	11 (78,6)	03 (21,4)
	Lesão (11)	09 (81,8)	02 (18,2)
P (12)	Lesão (12)	01 (08,3)	11 (91,7)
Total de amostras (45)		25 (55,5)	20 (44,5)

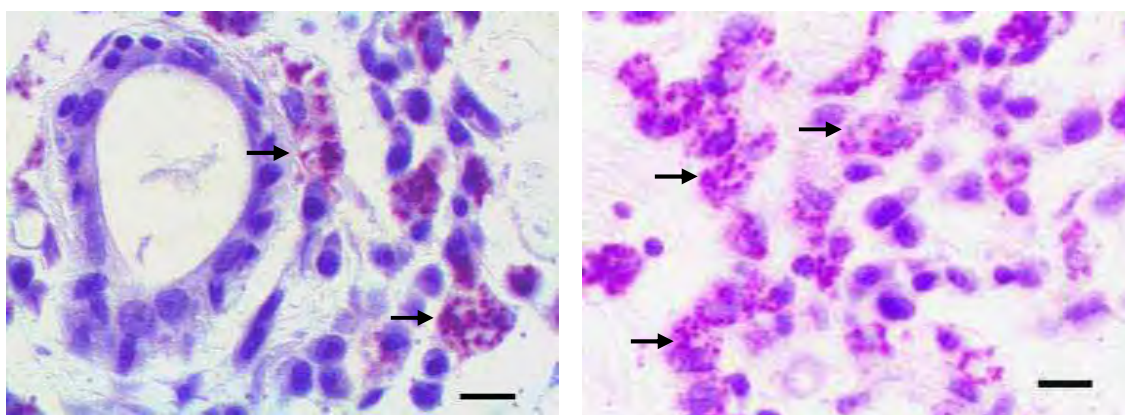


FIGURA 7 - Fotomicrografias de secções de pele com lesão de um cão portador de leishmaniose visceral e sintomático (cão nº 30), mostrando amastigotas coradas por imunoistoquímica em vermelho escuro (técnica utilizando o complexo Avidina-biotina peroxidase, contraste por hematoxilina) na região média da derme. Setas pretas mostram amastigotas intracelulares. Barras = 10 µm.

4.3 Exames sorológicos (ELISA e RIFI)

Na Tabela 3 encontram-se os dados dos resultados dos testes sorológicos, tanto RIFI quanto ELISA para diagnosticar cães com leishmaniose visceral, mas divididos nos grupos assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos.

Desta forma, observou-se que estes testes sorológicos diagnosticaram 24/34 (70,6%) dos cães para LVC. Destes testes, ELISA detectou anticorpos anti-*Leishmania* sp em 22 cães (64,7%) e a RIFI um número levemente inferior de 19 (55,9%) cães. Através dos exames sorológicos encontrou-se apenas um cão positivo (12,5%) para leishmaniose visceral no grupo dos assintomáticos, nos oligossintomáticos foram 12 (85,7%) cães e entre os polissintomáticos 11 (91,6%) animais (Tabela 3).

Além disso, no grupo dos animais oligossintomáticos, 7/14 (50,0%) dos cães foram positivos em ambos os exames sorológicos (ELISA e RIFI), mas em quatro cães houve discordância entre os exames, ou seja, um cão foi positivo pela RIFI e negativo pelo ELISA e três cães foram positivos pelo ELISA e negativos pela RIFI. Estes três cães negativos somente na RIFI apresentaram os tecidos cutâneos também negativos pela IMIQ e/ou suspeitos pela HE (Apêndice).

Tabela 3 – Resultados em números (N) e porcentagens (%) da positividade em 34 cães de Ilha Solteira, classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P) e que foram sororreagentes nos exames sorológicos (ELISA e RIFI) para leishmaniose visceral canina. Araçatuba, SP, 2008.

Grupos (N)	Positividade		
	ELISA N (%)	RIFI N (%)	TOTAL N (%)
A (8)	01 (12,5)	01 (12,5)	1 (12,5)
O (14)	11 (78,6)	08 (57,1)	12 (85,7)
P (12)	10 (83,3)	10 (83,3)	11 (91,6)
Total de animais (34)	22 (64,7)	19 (55,9)	24 (70,6)

4.4 Exame Molecular por PCR

Nas Figuras 8 a 11, estão ilustrados os resultados das amplificações pela PCR de DNA de *Leishmania* sp em amostras de pele, tanto sadias (PS) como com lesão (PL) dos 34 cães. Entre todas as amostras analisadas apenas a pele com lesão do cão oligossintomático de número 14 (14PL) não apresentou banda positiva de DNA (Figura 8). As amostras cutâneas 1PS, 2PL, 6 PS e 6 PL (Figura 8), 11 PL, 15 PS (Figura 9), 21 PS e 22 PS (Figura 10) e 34 PL (Figura 11), apresentaram bandas de fraca intensidade, mas, consideradas positivas. Já todas as demais amostras apresentaram bandas coradas intensamente.

Embora a amostra de pele (14PL) tenha sido negativa pela PCR, a amostra de pele sem lesão deste mesmo animal (14 PS) estava positiva (Figura 9). Desta forma, pode-se afirmar pelo resultado da PCR realizada nas amostras cutâneas (Tabela 4), que todos os cães eram positivos para LVC.

Apesar da HE e IMIQ terem detectado um menor número de amostras cutâneas positivas com formas amastigotas de *Leishmania* sp com 16/45 (45,6%), 20/45 (44,4%) e 44/45 (97,8%), respectivamente para o teste HE, IMIQ e PCR, todos os testes detectaram o parasita tanto nas peles sadias como nas peles com lesão. PCR, IMIQ e HE detectaram respectivamente, 100,0%, 31,8% e 22,7% de peles sadias e 95,6%, 56,5% e 47,8% de peles com lesão infectadas com *Leishmania* sp (Tabela 5).

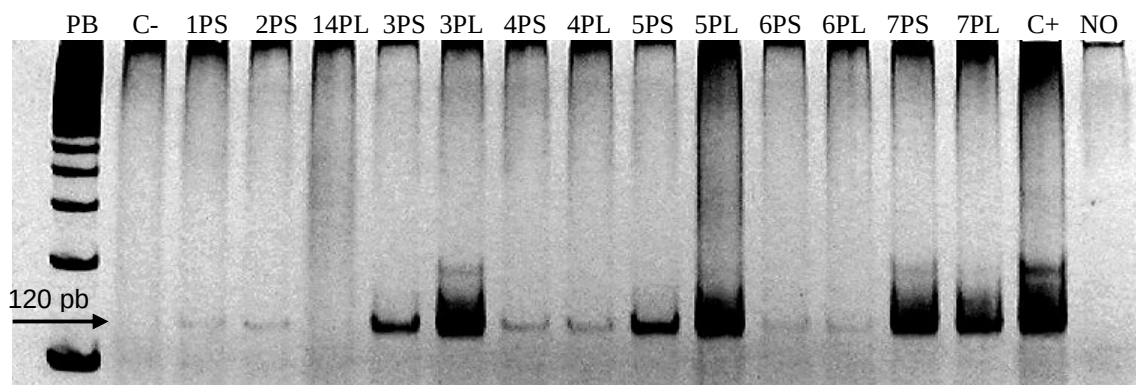


FIGURA 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR de fragmentos de 120pb de DNA de *Leishmania* sp em amostras de peles sadias (PS) e com lesão (PL) dos seguintes animais: cão 1 DNA de pele sadia (1PS), cão 2 DNA de pele sadia (2PS), cão 14 DNA de pele com lesão (14PL), cão 3 DNA de pele sadia (3PS), cão 3 DNA de pele com lesão (3PL), cão 4 DNA de pele sadia (4PS), cão 4 DNA de pele com lesão (4PL), cão 5 DNA de pele sadia (5PS), cão 5 DNA de pele com lesão (5PL), cão 6 DNA de pele sadia (6PS), cão 6 DNA de pele com lesão (6PL), cão 7 pele sadia (7PS), cão 7 DNA de pele com lesão (7PL). PB = marcador molecular em escala de 100 pb (Invitrogen®); C- = controle negativo (DNA pele sadia de cão de área não endêmica); C+ = controle positivo (DNA pele sadia cão 12); NO.

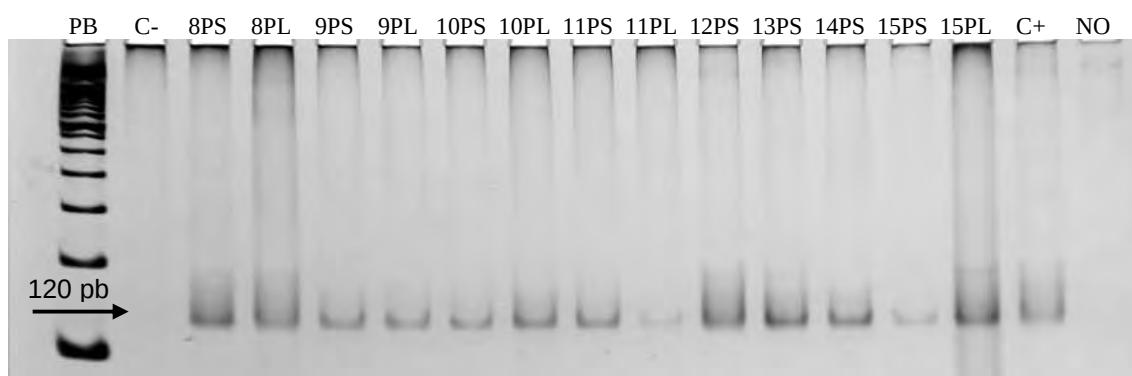


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR de fragmentos de 120pb de DNA de *Leishmania* sp em amostras de peles sadias (PS) e com lesão (PL) dos seguintes animais: cão 8 DNA de pele sadia (8PS), cão 8 DNA de pele com lesão (8PL), cão 9 DNA de pele sadia (9PS), cão 9 DNA de pele com lesão (9PL), cão 10 DNA de pele sadia (10PS), cão 10 DNA de pele com lesão (10PL), cão 11 DNA de pele sadia (11PS), cão 11 DNA de pele com lesão (11PL), cão 12 DNA de pele sadia (12PS), cão 13 DNA de pele sadia (13PS), cão 14 DNA de pele sadia (14PS), cão 15 pele sadia (15PS), cão 15 DNA de pele com lesão (15PL). PB = marcador molecular em escala de 100 pb (Invitrogen®); C- = controle negativo (DNA pele sadia de cão de área não endêmica); C+ = controle positivo (DNA pele sadia cão 12); NO.

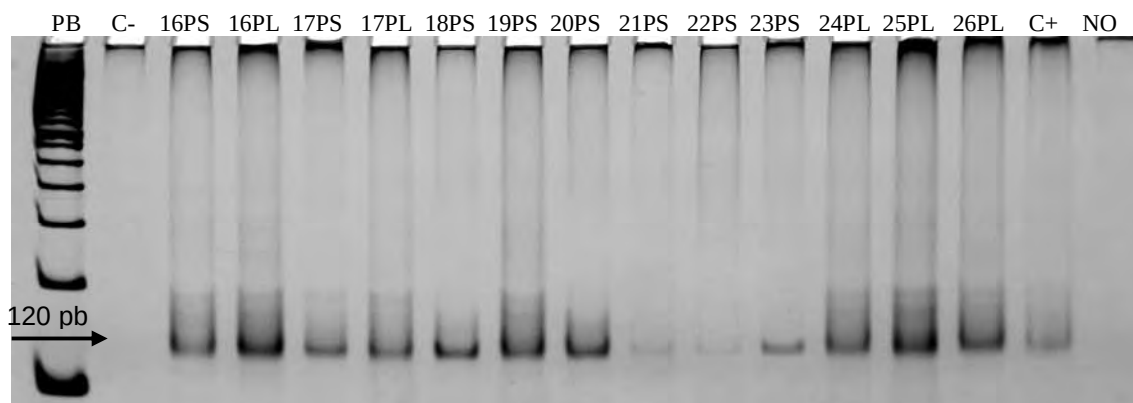


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR de fragmentos de 120pb de DNA de *Leishmania* sp em amostras de peles sadias (PS) e com lesão (PL) dos seguintes animais: cão 16 DNA de pele sadia (16PS), cão 16 DNA de pele com lesão (16PL), cão 17 DNA de pele sadia (17PS), cão 17 DNA de pele com lesão (17PL), cão 18 DNA de pele sadia (18PS), cão 19 DNA de pele sadia (19PS), cão 20 DNA de pele sadia (20PS), cão 21 DNA de pele sadia (21PS), cão 22 DNA de pele sadia (22PS), cão 23 DNA de pele sadia (23PS), cão 24 DNA de pele com lesão (24PL), cão 25 pele com lesão (25PL), cão 26 DNA de pele com lesão (26PL). PB = marcador molecular em escala de 100 pb (Invitrogen®); C- = controle negativo (DNA pele sadia de cão de área não endêmica); C+ = controle positivo (DNA pele sadia cão 12); NO.

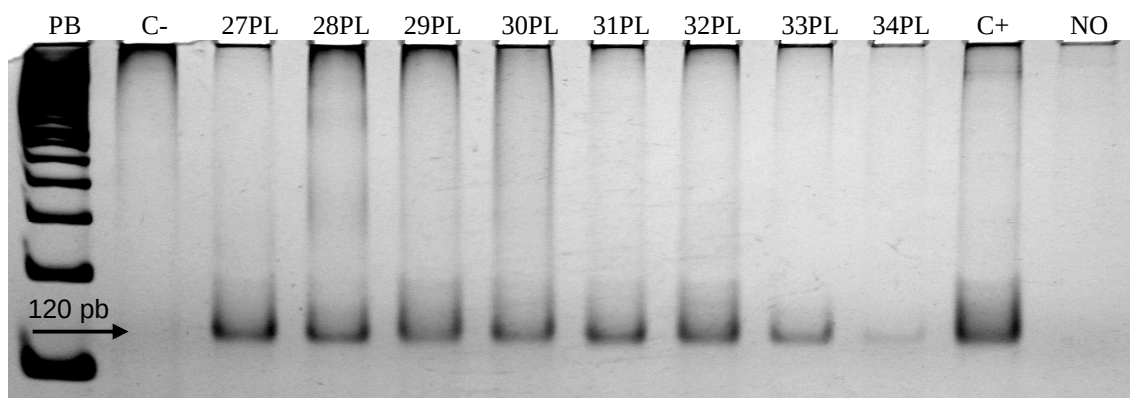


FIGURA 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR de fragmentos de 120pb de DNA de *Leishmania* sp em amostras de peles sadias (PS) e com lesão (PL) dos seguintes animais: cão 27 DNA de pele com lesão (27PL), cão 28 DNA de pele com lesão (28PL), cão 29 DNA de pele com lesão (29PL), cão 30 DNA de pele com lesão (30PL), cão 31 DNA de pele com lesão (31PL), cão 32 DNA de pele com lesão (32PL), cão 33 DNA de pele com lesão (33PL), cão 34 DNA de pele com lesão (34PL). PB = marcador molecular em escala de 100 pb (Invitrogen®); C- = controle negativo (DNA pele sadia de cão de área não endêmica); C+ = controle positivo (DNA pele sadia cão 12); NO.

Tabela 4 – Resultados em números (N) e porcentagens (%) da pesquisa de produtos de amplificação por PCR de fragmentos de 120pb de DNA de *Leishmania* sp extraídos de amostras de pele com ou sem lesão, obtidos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Grupos Clínicos (N)	Classificação das Peles (N)	Números e porcentagens de fragmentos de peles negativas ou positivas pela PCR	
		Negativas N (%)	Positivas N (%)
A (8)	Sadia (8)	00 (00,0)	8 (100,0)
O (14)	Sadia (14)	00 (00,0)	14 (100,0)
	Lesão (11)	01 (09,1)	10 (90,9)
P (12)	Lesão (12)	00 (00,0)	12 (100,0)
Total de amostras (45)		01 (02,2)	44 (97,8)

Tabela 5 - Resultados em números (N) e porcentagens (%) da pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp em fragmentos de pele com ou sem lesão processados por histoquímica (HE), imunoistoquímica (IMIQ) e PCR, obtidos de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Ilha Solteira. Araçatuba, SP, 2008.

Classificação das Pele (N)	Positividade dos fragmentos de pele		
	HE N (%)	IMIQ N (%)	PCR N (%)
Sadia (22)	5 (22,7)	7 (31,8)	22 (100,0)
Lesão (23)	11 (47,8)	13 (56,5)	22 (95,6)
Total (45)	16 (35,6)	20 (44,4)	44 (97,8)

4.5 Análise comparativa entre os métodos de diagnóstico

A Tabela 6 mostra uma análise comparativa entre as técnicas IMIQ x ELISA, IMIQ x RIFI e ELISA x RIFI para avaliar o diagnóstico de leishmaniose visceral em cães classificados como assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos.

Por esta análise comparativa, observou-se que no geral o índice de concordância entre os dois testes sorológicos (RIFI e ELISA) foi bom ($\kappa = 0,57$), porém, quando o nível de concordância foi analisado de acordo com a presença dos sinais clínicos, a concordância entre RIFI e ELISA foi ótima ou de 100,0% somente entre os assintomáticos ($\kappa = 1,0$), mas regular (83,3%) nos polissintomáticos e fraca (64,3%) nos oligossintomáticos (Tabela 6).

Quando o teste IMIQ foi comparado com o ELISA ou a RIFI, no grupos dos assintomáticos, verificou-se uma concordância fraca com ambos os testes sorológicos, de apenas 6,5% ($\kappa = 0,25$) (Tabela 6). Isto aconteceu devido ao fato de que apenas um cão assintomático (cão nº 19) foi positivo com alto título de anticorpos anti-*Leishmania* sp (ELISA e RIFI), confirmado pela intensa carga parasitária na pele, mas em contrapartida outros três cães foram negativos pelos testes sorológicos e positivos nos exames parasitológicos (Apêndice).

Comparando-se ainda o teste parasitológico IMIQ e o sorológico, a concordância continuou baixa, sendo a menor entre IMIQ e ELISA onde houve apenas 50,0% de concordância e $\kappa = 0,20$, pois neste grupo apenas 5/14 (35,7%) dos cães foram simultaneamente positivos na sorologia e nos testes parasitológicos da pele (Apêndice). Desta forma, o teste ELISA detectou anticorpos anti-*Leishmania* sp em maior número de amostras séricas de cães do que a RIFI, mas sem correlação com a presença dos parasitas na pele pela IMIQ. Embora os níveis de concordância entre IMIQ x ELISA e ELISA x RIFI tenham sido baixos, entre IMIQ x RIFI esta concordância foi boa (concordância 71,4% e $\kappa = 0,46$) (Tabela 6).

No grupo dos cães sintomáticos, o nível de concordância entre esses testes foi o mais alto, atingindo porcentagens de concordância variando de

83,3% a 91,7% e índices Kappa variando de 0,40 a 0,62 (Tabela 6). Porém, um animal polissintomático (cão nº 28) deste grupo foi negativo para todos esses testes (Apêndice), o que fez com que diminuísse o nível de concordância entre os métodos neste grupo.

Já a Tabela 7 mostra os dados da análise comparativa entre a técnica PCR e as técnicas IMIQ, ELISA e RIFI. Quando a PCR foi comparada com IMIQ, ELISA e RIFI verificou-se uma concordância muito baixa, obtendo os menores valores entre a PCR e os exames sorológicos (RIFI ou ELISA) no grupo assintomático (concordância de 12,5%), seguido pelos oligossintomáticos e polissintomáticos (Tabela 7).

Finalmente, através da Tabela 8 e da Figura 12, observaram-se os números e as porcentagens de cães positivos para leishmaniose visceral canina pelos testes sorológicos (RIFI e ELISA), parasitológicos (HE e IMIQ) e pela PCR em amostras de pele sadia e com lesão dos cães assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Desta forma, estes resultados mostraram que os testes PCR, IMIQ, HE, RIFI e ELISA apresentaram respectivamente os seguintes resultados de positividade: 100,0%, 55,9%, 44,1%, 55,9% e 64,7%.

Tabela 6 – Análise comparativa de concordância e índice Kappa entre as técnicas imunoistoquímica (IMIQ) x ELISA, imunoistoquímica x RIFI e ELISA x RIFI para diagnóstico de leishmaniose visceral em cães naturalmente acometidos por esta doença no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Grupos	Análise comparativa entre os métodos de diagnóstico		
	IMIQ x ELISA N (%)	IMIQ x RIFI N (%)	ELISA x RIFI N (%)
Cães (n = 34)			
Concordância	23 (67,6)	26 (76,5)	27 (79,4)
Índice Kappa	0,32	0,52*	0,57*
Assintomáticos (n = 8)			
Concordância	5 (62,5)	5 (62,5)	8 (100%)
Índice Kappa	0,25	0,25	1,0
Oligossintomáticos (n = 14)			
Concordância	7 (50,0)	10 (71,4)	9 (64,3)
Índice Kappa	0,20	0,46*	0,22
Polissintomáticos (n = 12)			
Concordância	11 (91,7%)	11 (91,8)	10 (83,3)
Índice Kappa	0,62*	0,62*	0,40

*Estatisticamente significativa $p \leq 0,05$. Intervalo de confiança = 95%.

Tabela 7 – Análise comparativa de concordância entre a PCR e as técnicas imunoistoquímica (IMIQ), ELISA e RIFI para diagnóstico de leishmaniose visceral em cães naturalmente acometidos por esta doença no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Grupos	Análise comparativa entre os métodos de diagnóstico		
	PCR x IMIQ N (%)	PCR x ELISA N (%)	PCR x RIFI N (%)
Cães (n = 34)			
Concordância	19 (55,9)	22 (64,7)	19 (55,8)
Assintomáticos (n = 8)			
Concordância	4 (50,0)	1 (12,5)	1 (12,5)
Oligossintomáticos (n =14)			
Concordância	4 (28,6)	11 (78,6)	8 (57,1)
Polissintomáticos (n = 12)			
Concordância	11 (91,6%)	10 (83,3)	10 (83,3)

Tabela 8 – Número (N) e porcentagens (%) de cães positivos para leishmaniose visceral pelos testes sorológicos (RIFI e ELISA), parasitológicos (histoquímica - HE e imunoistoquímica - IMIQ) e molecular (PCR) em amostras de peles sadias e com lesão de cães naturalmente acometidos por esta doença no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Positividade dos cães para leishmaniose visceral					
Grupos (N)	ELISA N (%)	RIFI N (%)	HE N (%)	IMIQ N (%)	PCR N (%)
A (8)	1 (12,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50,0)	8 (100,0)
O (14)	11 (78,6)	8 (57,1)	3 (21,4)	4 (28,6)	14 (100,0)
P (12)	10 (83,3)	10 (83,3)	9 (75,0)	11 (91,7)	12 (100,0)
Total (N = 34)	22 (64,7)	19 (55,9)	15 (44,1)	19 (55,9)	34 (100,0)

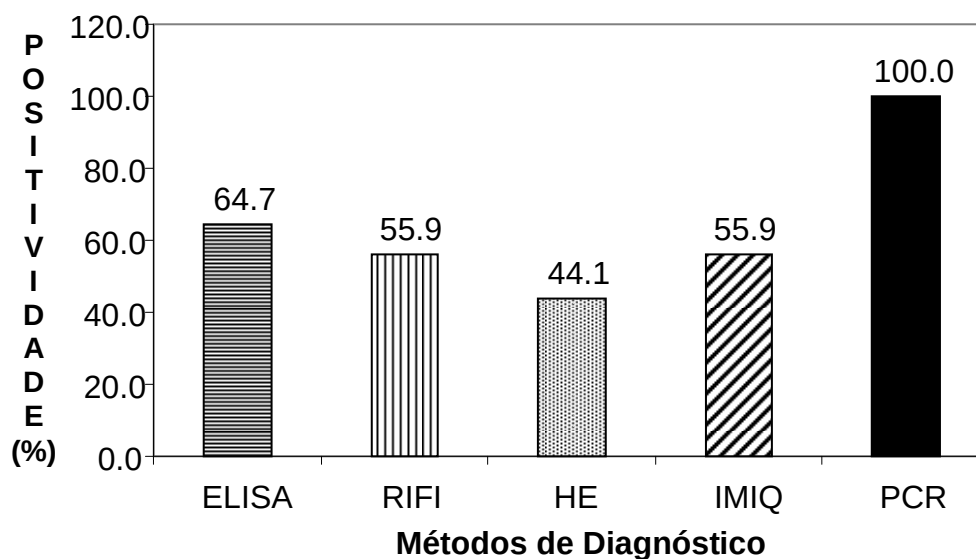


FIGURA 12 - Porcentagem (%) de cães positivos para leishmaniose visceral pelos testes sorológicos (RIFI e ELISA), parasitológicos (histoquímica - HE e imunoistoquímica - IMIQ) e molecular (PCR) em amostras de peles sadias e com lesão de cães naturalmente acometidos por esta doença no município de Ilha Solteira. Araçatuba, SP, 2008.

5 DISCUSSÃO

Na leishmaniose visceral canina a pele é a parte do corpo que mais comumente apresenta os sinais da doença e a presença do parasita. Assim, a pele dos cães infectados é o reservatório do parasita e tem um papel importante na infecção dos insetos vetores e na transmissão do parasita para os cães e o homem. Da infecção cutânea localizada, o parasita pode se disseminar através dos vasos linfáticos ou sanguíneos, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodos, fígado, baço, rins e trato gastrointestinal, dentre outros (DIAS et al., 1999; GENARO et al., 1988). Estudos anteriores revelaram a dermatite esfoliativa como a manifestação cutânea mais comum da LVC, com frequência registrada de 56%-91% (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1992). Em concordância, a anormalidade mais freqüentemente observada nas peles analisadas foi a dermatite esfoliativa, com presença de descamação, hiperqueratose e alopecia.

Neste trabalho, várias amostras de tecido cutâneo com e sem lesões foram colhidas das patas, tórax, abdômen, focinho, ponta da orelha, região peri-ocular e outras partes da face e do corpo, mas particularmente das regiões onde haviam lesões evidentes de pele. Na maioria dos casos os tecidos eram do focinho e da orelha. A colheita das amostras foi feita de forma aleatória e a intensidade da carga parasitária das diferentes regiões não foi comparada. Segundo Xavier et al. (2006), a sensibilidade da IMIQ e da HE não depende da região anatômica de onde são colhidas as amostras e de acordo com Saridomichelakis et al. (2007) a densidade parasitária não tem diferença significativa entre as diferentes partes do corpo.

Os cães foram classificados como assintomáticos (23,5%), oligossintomáticos (41,1%) e polissintomáticos (35,2%) por meio da análise dos sinais clínicos e anatomopatológicos evidentes para leishmaniose visceral. Embora, as amostras séricas de 7/8 (87,5%) cães assintomáticos tenham sido negativas nos testes sorológicos, os exames HE e IMIQ revelaram positividade em 50% dos animais deste grupo, com carga parasitária variando de moderada a intensa e a PCR revelou positividade de 100% nas amostras de pele sadia. De forma semelhante, Abranches (1991) demonstrou que os cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentaram grande quantidade de parasitas na pele independente da presença de lesões. A baixa detecção de anticorpos nos animais assintomáticos pode indicar que estão no início da infecção e que ainda não houve soroconversão, mas com parasitas presentes na pele. Estudos mostraram uma variação no período de soroconversão em cães naturalmente infectados de 94 dias até um ano (OLIVA et al., 2006; QUINNELL et al., 1997; QUINNELL et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al.; 2005). Quinnell et al. (2001) sugerem que antes da soroconversão ou desenvolvimento de sintomas, o exame parasitológico e a PCR são mais sensíveis.

Relativo aos cães oligossintomáticos, 85,7% foram positivos pelos testes sorológicos (RIFI ou ELISA) e apenas 28,6% destes animais foram simultaneamente positivos nos testes sorológicos e parasitológicos (IMIQ ou HE), com carga parasitária de moderada a intensa, incluindo três cães que tiveram os mais altos títulos de anticorpo anti-*Leishmania* sp e forte parasitismo, mesmo sem lesão nas amostras de pele. Por outro lado, 66,6% dos cães soropositivos (particularmente ELISA) não apresentaram amastigotas nas amostras de pele pelos métodos HE e IMIQ. Porém, o resultado positivo do teste sorológico presume um contato com o parasita e uma subsequente resposta imune humoral, não indicando necessariamente infecção ativa por *Leishmania* sp ou presença dela na pele. Além disso, a maioria dos cães com amostras de pele onde não se verificou a presença de parasitas foi também negativa pela RIFI, mas com ELISA positivo, sugerindo maior sensibilidade

desta última técnica. A infecção por *Leishmania* sp ficou comprovada posteriormente pelos resultados da PCR que foram positivos em 97,0% das amostras de pele destes animais. No momento em que os parasitas migram do local de infecção na pele para outras partes do organismo, provocando o aparecimento dos sintomas, percebe-se o aumento da produção de anticorpos, sendo possível que as pequenas quantidades de parasitas restantes na pele durante esta fase, possam ser detectadas apenas por técnicas mais sensíveis como a PCR, semelhante ao que sugere Rodgers et al. (1990). Courtenay et al. (2002), observaram correlação positiva entre infectividade, nível de anticorpos anti-*Leishmania* sp, detecção de DNA do parasita por PCR e presença de sinais clínicos.

A presença de amastigotas de *Leishmania* sp foi observada pela IMIQ em 56,5% das amostras de pele com lesão e em apenas 31,8% das peles clinicamente sadias, sendo esta positividade aumentada pela PCR nas amostras de pele com lesão (100,0%) e principalmente nas de pele sadia (95,6%). Trabalhos anteriores também revelaram a presença de parasitas em peles clinicamente sadias, independente da manifestação clínica dos cães de áreas endêmicas, através da imunoistoquímica (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007) e da PCR (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Além disso, Rodríguez-Cortés et al. (2007) sugerem que as biopsias de pele para diagnóstico não precisam ser obtidas apenas de peles com lesão, mas também podem ser colhidas de peles sadias.

No presente trabalho, um cão assintomático e dois oligossintomáticos soropositivos, com altos níveis de anticorpos, mas com leve ou ausente reação inflamatória em peles sadias, mostraram carga parasitária de moderada a intensa. Existe uma falta de correlação entre a densidade de parasitas e a severidade do infiltrado inflamatório (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007), além disso, lesões histológicas, como dermatites perifoliculares a difusas e adenite sebácea foram relatadas em tecidos clinicamente sadios do focinho de cães sintomáticos pela LVC (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007; SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Segundo Papadogiannakis et al. (2005), a presença de

células inflamatórias e parasitas em cães sem evidências de dermatite pode ser explicada pela hipótese de que lesões macroscópicas acompanham a infiltração de células inflamatórias, mas isto ocorre em um período de tempo após a infecção.

Nos cães oligossintomáticos, parasitas intactos foram associados com a presença de reação inflamatória crônica caracterizada pela predominância de células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Por outro lado, 70,5% dos cães com lesões de pele representadas pela predominância de células polimorfonucleares, em sua maioria neutrófilos, edema, epiderme danificada, hemorragia e congestão dermal, quadro este que poderia ter sido causado ou intensificado também pela presença de co-infecções ou infecções secundárias por bactérias, tiveram a visualização direta do parasita por exames parasitológicos extremamente dificultada e a confirmação da positividade de LVC nestas amostras só foi possível através da PCR. De forma semelhante, Santos et al. (2004) mostraram que o parasitismo cutâneo não estava associado com infiltrado inflamatório agudo.

No grupo polissintomático, 100% dos cães apresentaram diferentes alterações cutâneas e a positividade nestes animais variou de acordo com o método de diagnóstico utilizado, aumentando de 75,0% pela HE (intensidade parasitária variando de fraca a intensa) para 91,6% quando foram empregados tanto a IMIQ quanto a sorologia e atingindo positividade total (100,0%) quando avaliados pela PCR. Os cães do presente trabalho, com alto título de anticorpos anti-*Leishmania* sp e alta carga parasitária mostraram sempre um processo inflamatório crônico intenso que variava de um padrão inflamatório difuso a focal granulomatoso com células mononucleares, particularmente macrófagos, mas também plasmócitos e linfócitos em todas as camadas da pele: abaixo da epiderme, derme superficial, média e profunda, hipoderme e ao redor das células musculares. Em concordância, Xavier et al. (2006) registraram que em geral, a reação inflamatória crônica era caracterizada por infiltrado mononuclear e este era difuso na região superior da derme e focal ao redor de vasos sangüíneos, folículos pilosos e glândulas na epiderme profunda,

com infecção mais intensa no grupo sintomático. Também neste grupo, a carga parasitária estava diretamente relacionada à severidade dos sinais clínicos da doença (GIUNCHETTI et al., 2006; XAVIER et al., 2006), semelhante aos nossos resultados.

Através da técnica HE, 11/34 (32,4%) cães, principalmente do grupo oligossintomático, foram considerados suspeitos devido à dificuldade de visualização das amastigotas, sendo que destes, três posteriormente tiveram a positividade confirmada pela IMIQ e 11 pela PCR. Também Bourdoiseau et al. (1997) relataram que embora o exame microscópico direto do parasita por HE fosse uma técnica específica e usada como avaliação de rotina, as amastigotas freqüentemente eram difíceis de serem visualizadas e algumas vezes os exames eram inconclusivos.

A positividade das peles pela HE foi sempre mais baixa do que pela IMIQ em nosso estudo, sendo respectivamente 37,5% e 50,0% no grupo dos assintomáticos, 21,4% e 28,6% nos oligossintomáticos e as mais altas foram observadas nos polissintomáticos, atingindo 75,0% e 91,7%. A técnica imunoistoquímica tem sido freqüentemente empregada para a detecção de amastigotas de *Leishmania* sp em tecidos fixados em formalina (BOURDOISEAU et al., 1997; FERRER et al., 1988b; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; TAFURI et al., 2004; XAVIER et al., 2006), verificando-se maior sensibilidade em relação à técnica histológica (HE), mas variando de acordo com os sinais clínicos dos animais, entre 92,7%, 76,0% a 100,0%, respectivamente para cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos (MOREIRA et al., 2007). O método IMIQ permite, portanto uma melhor visualização do parasita, pois possibilita um alto grau de contraste entre os parasitas e o tecido do hospedeiro, sendo possível o diagnóstico preciso da leishmaniose, mesmo quando existem apenas poucos parasitas (ORDEIX et al., 2005). Contudo, a IMIQ tem sido considerada por alguns autores como menos sensível do que a PCR (Roura et al., 1999; Xavier et al., 2006), técnica esta que segundo Ordeix et al. (2005) é sensível o suficiente para detectar número muito baixo de parasitas nas amostras de tecidos cutâneos. Neste

trabalho a maior positividade foi obtida quando se utilizou a PCR, sendo de 100%, independente dos sinais clínicos, da sorologia e da presença de parasitas na pele.

Para o diagnóstico da LVC as técnicas sorológicas são consideradas rápidas e práticas, mas com sensibilidade variável e especificidade baixa (BADARÓ et al., 1983; BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; INIESTA et al., 2002). Neste estudo não foi avaliado o índice de especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos, pois isso já foi objeto de muitos estudos, mostrando diferenças e controvérsias entre os resultados, possivelmente em função, principalmente dos diferentes protocolos utilizados. Dentre eles destacam-se alguns autores como Mettler et al. (2005), Moreira et al. (2007) e Nunes et al. (2007). Além disso, os exames sorológicos apresentaram baixa positividade no grupo dos animais assintomáticos, sendo de 12,5% tanto pelo ELISA quanto pela RIFI, e valores maiores nos oligossintomáticos (ELISA = 78,6% e RIFI = 57,1%) e polissintomáticos, que tiveram 83,3% de positividade para ambos os testes sorológicos. Mas no geral, verificou-se também que o ELISA apresentou uma positividade de (65,0%), seguido pela RIFI e IMIQ (56%) e pela HE (55,1%).

Quando a análise comparativa foi realizada entre RIFI e ELISA verificou-se que o índice de concordância foi de 100% nos animais assintomáticos, mas fraca nos animais oligossintomáticos e polissintomáticos. Zanette (2006), verificou resultados semelhantes, validando a comprovação de que estes dois testes podem apresentar em alguns casos, resultados divergentes no diagnóstico da LVC. Quando se comparou os testes sorológicos (ELISA ou RIFI) com o teste parasitológico IMIQ, verificou-se uma associação fraca entre IMIQ x ELISA (Kappa = 0,32) e boa entre IMIQ x RIFI (Kappa = 0,52), embora ambas as associações de testes tenham melhorado o índice de concordância nos animais polissintomáticos. Como nenhum destes testes aproximou ao nível de concordância excelente, fica difícil a replicabilidade entre eles no diagnóstico da LVC, pois depende muito do estado evolutivo da doença e da resposta imune do hospedeiro.

Desta forma, cabe salientar aqui que a maioria dos animais com títulos altos de anticorpos, pela RIFI ou ELISA apresentou também amastigotas intactas nas amostras de pele. Altos títulos de anticorpos pela RIFI, assim como pela ELISA, foram detectados nos grupo dos sintomáticos, em concordância com os dados de Reis et al. (2006). Porém, quando não houve concordância entre ambos os testes sorológicos e quando os títulos de anticorpos foram baixos, as amastigotas não foram detectadas na pele destes animais usando os testes parasitológicos (HE e IMIQ), sendo positivos apenas pela PCR, fato que aconteceu particularmente nos cães oligossintomáticos. Courtenay et al. (2002) observaram que antes da soroconversão os cães não eram infectantes para os flebotomíneos e a identificação do parasita nesta fase era possível através da PCR, assim, sugerem o uso de um teste de diagnóstico altamente sensível neste período e um esquema de eliminação rápida quando a incidência da infecção for alta, aumentando a possibilidade de alcançar melhor eficácia da eutanásia como medida de controle.

A baixa concordância entre os testes sorológicos e também entre os parasitológicos, particularmente nos cães oligossintomáticos, não permitiu um diagnóstico apropriado em 11/34 (32,4%) cães que continuaram na categoria de suspeitos ou inconclusivos, aguardando confirmação por outro método. Assim, o método empregado foi o exame molecular (PCR) para confirmar os diagnósticos parasitológicos e sorológicos. Nestes casos, a PCR foi a técnica que apresentou maior positividade (100,0%) entre os cães, detectando DNA do parasita em todas as amostras de tecido cutâneo dos três grupos, tanto nas peles sadias quanto nas peles com lesão, com exceção de uma única amostra de pele com lesão de animal oligossintomático (cão 14) que foi negativa, mas este cão foi considerado positivo pela presença de DNA em sua amostra de pele sadia. Como no presente estudo, todos os cuidados necessários para evitar a contaminação das amostras foram tomados durante os procedimentos da técnica, as chances de ocorrência de resultados falso-positivos na PCR foram mínimas. Além disso, por Ilha Solteira pertencer a uma área considerada endêmica para LVC, não foi surpresa observar esta alta positividade pela PCR

entre os cães analisados. Solano-Gallego et al. (2004) mostraram que as peles dos cães assintomáticos não demonstraram lesões macroscópicas ou amastigotas, mas tiveram resultados positivos pela PCR, indicando que o número de parasitas nas amostras de tecido cutâneo devia ser muito pequeno e de difícil identificação, mesmo utilizando técnicas parasitológicas mais sensíveis como a imunoistoquímica.

A PCR foi também comparada com os testes sorológicos e a IMIQ e à exceção dos animais polissintomáticos, as análises comparativas revelaram baixa concordância entre os testes. Este resultado não é inesperado, pois a PCR revelou-se muito mais sensível, diagnosticando um número maior de cães com LVC. Outros estudos já haviam também detectado baixos valores de concordância entre o sorológico (ELISA) e a PCR, com exceção apenas para os cães severamente infectados, que apresentaram concordância moderada (NUNES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, o teste PCR deve ser analisado com cautela nas campanhas epidemiológicas, pois ele detecta apenas o DNA do parasita no sangue ou nos tecidos e não necessariamente o parasita intacto que determina a doença no animal.

Os resultados da presente pesquisa revelaram que nenhuma prova diagnóstica quando testada isoladamente identificou adequadamente os cães infectados com LVC, reforçando assim as observações de outros autores (NUNES, 2007; OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Demonstrando assim, a necessidade da associação de técnicas, pois os resultados dos diagnósticos variam muito com a evolução da doença e com a resposta imune desenvolvida pelo cão.

Em locais onde a LVC é endêmica, como no caso de Ilha Solteira, e principalmente nas áreas que oferecem risco para a transmissão da doença, é essencial a busca por métodos de diagnóstico que ofereçam alta positividade para auxiliar no controle desta enfermidade. Portanto, a associação entre métodos se faz necessária, tentando melhorar o diagnóstico em todos os grupos clínicos e estágios da infecção. Desta forma, enquanto os animais ainda não apresentarem sinais clínicos da doença e possivelmente antes da

soroconversão, o diagnóstico sorológico não seria o recomendado, sendo preferível neste período utilizar os métodos parasitológicos e a PCR, buscando a presença dos parasitas na pele, como sugerem também Quinnell et al. (2001). No presente trabalho, observou-se que o método sorológico em associação aos parasitológicos, principalmente pela IMIQ, aumentou a positividade para 79,4% e com a PCR este resultado alcançou 100,0%.

De acordo com Gramiccia; Gradoni (2005) a combinação das técnicas sorológicas e moleculares aumenta a prevalência da infecção canina em diferentes áreas endêmicas. Como sugerido por estes autores, os métodos sorológicos por serem mais rápidos e práticos, seriam realizados em primeira investigação, principalmente em inquéritos epidemiológicos onde existem muitos casos a serem pesquisados.

Cabe salientar aqui que a PCR é comprovadamente mais sensível e poderia ser a técnica de eleição para o diagnóstico da LVC, no entanto, ela requer equipamentos caros, treinamento técnico e muito cuidado para evitar a contaminação, tornando-se assim, inviável a sua aplicação em grande escala nas campanhas epidemiológicas. Desta forma, para confirmação da sorologia, sugere-se a IMIQ dentre os métodos parasitológicos, por ser mais sensível que a HE e mais viável que a PCR, ficando esta técnica molecular restrita apenas à confirmação dos casos ainda suspeitos após a IMIQ. Mediante o exposto nesta discussão, propõe-se a seqüência de procedimentos diagnósticos ilustrada na Figura 13, que demonstra como a associação entre as técnicas pode aumentar os níveis de positividade e contribuir para o controle da doença.

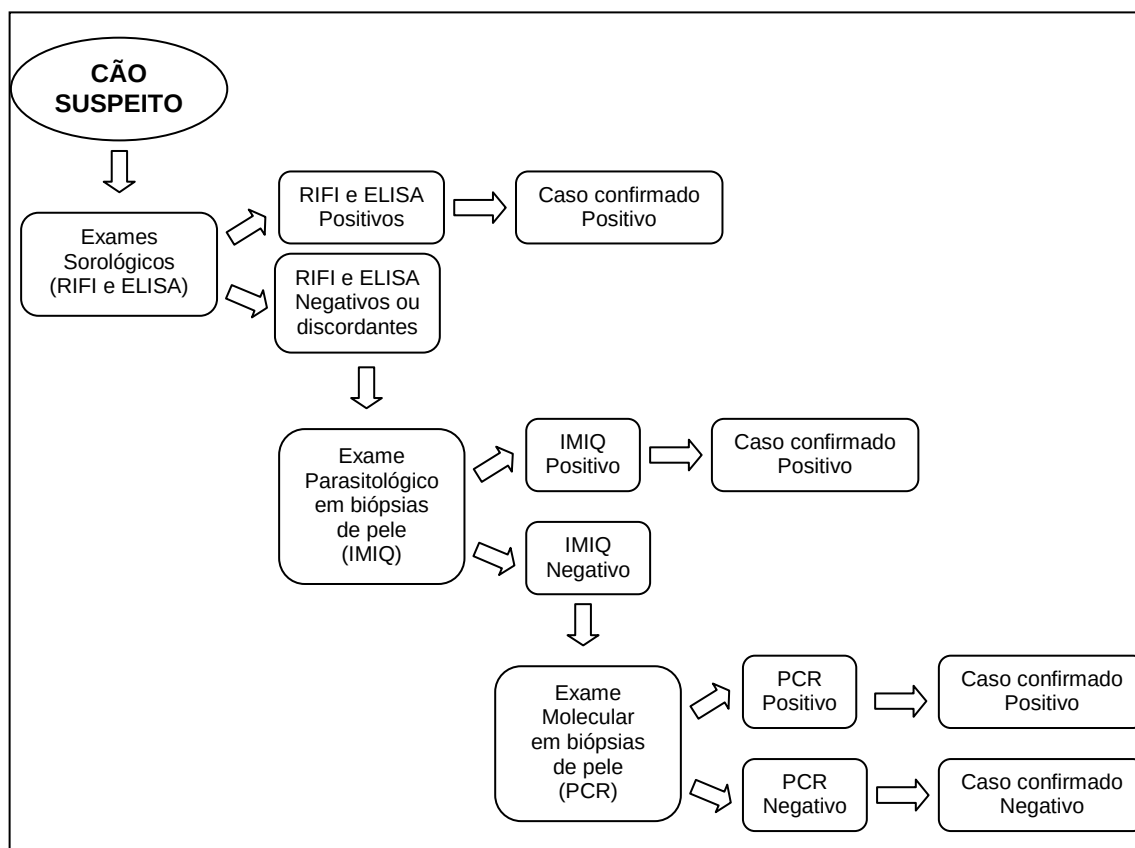


FIGURA 13 – Diagrama proposto para orientação do diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

6 CONCLUSÃO

- No grupo dos cães assintomáticos, os testes sorológicos não foram boas opções para o diagnóstico da LVC, sendo preferível o uso de métodos parasitológicos e da PCR;
- Os exames parasitológicos (IMIQ e HE) foram pouco eficientes para o diagnóstico da LVC em cães oligossintomáticos;
- Para os animais do grupo polissintomático todos os testes utilizados foram eficientes no diagnóstico da LVC;
- Ambos os métodos IMIQ e HE demonstraram a presença de amastigotas intactas na pele com nível de positividade semelhante, embora pelo HE, alguns tecidos cutâneos foram inconclusivos e classificados como suspeitos;
- IMIQ foi considerado um método seguro e importante ferramenta em adição aos exames sorológicos ou ao teste HE;
- PCR foi o método que apresentou maior positividade nos três grupos de cães, tanto em amostras de pele com lesão quanto nas sadias, independente dos sinais clínicos e anatomopatológicos dos animais ou dos resultados dos exames sorológicos e parasitológicos;
- A presença de amastigotas também nas amostras de peles sadias, especialmente dos cães assintomáticos e oligossintomáticos, reforçou a relevância destes animais na epidemiologia da LVC;
- A associação dos métodos sorológicos com o parasitológico IMIQ e molecular (PCR), realizados em biópsias de pele com lesão ou sadias, possibilitou atingir níveis ótimos de positividade, muito importante para o controle da doença, visto que a presença de parasitas na pele indica o seu potencial infectivo e a relevância destes animais como reservatório para a LVC.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine Leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal of Parasitology**, v. 77, n.4, p. 557-561, 1991.

ALENCAR, J. E. **Calazar canino**: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. 1959. Tese (Livre-Docência) - Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza.

ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Novo Mundo. **Publicações Médicas**, n. 196, p. 71-87, 1956.

ALEXANDER, J. A. R.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, pt. 8, p. 2993-3002, 1999.

ALVAR, J. *Leishmania* and HIV co-infection in the Mediterranean countries, In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 78-81.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D.; Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ANDRADE, H. M.; TOLEDO, V. P. C. P.; MARQUES, M. J.; FRANÇA SILVA, J. C.; TAFURI, W. L.; MAYRINK, W.; GENARO, O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 71-81, 2002.

ANTONIALLI, S. A. C.; TORRES, T. G.; PARANHOS-FILHO, A. C.; TOLEZANO, J. E. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato

Grosso do Sul State, Central Brazil. **Journal of Infection**, v. 54, n.5, p. 509-514, 2007.

ASHFORD, D. A. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. 2000. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dogs control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JUNIOR, R. H.; BADARO, R.; DAVID, JÚNIOR, R. H. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 251-255, 1995.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P. Q.; STARKE-BUZETTI, W. A.; TENÓRIO, M. S.; NORONHA-JUNIOR, A. C. F. Leishmaniose Visceral Canina: Novos Casos no Município de Ilha Solteira-SP. In: VIII Semana de Divulgação Científica da UNESP de Araçatuba. **Anais...** Araçatuba: SEDIC, 2008.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. BioEstat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Versão 4.0. 2005. Instituto de desenvolvimento sustentável Mamirauá, Belém, Pará, Brasil.

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody teste in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 32, n.3, p. 480-84, 1983.

BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M. L. NUNES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. P. *Leishmania major*-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1361-1366, 2002.

BARBOZA, D. C. P. M.; GOMES NETO, C. M. B.; LEAL, D. C.; BITTENCOURT, D. V. V.; CARNEIRO, A. J. B.; SOUZA, B. M. P. S.; OLIVEIRA, L. S.; JULIÃO, F. S.; SOUZA, V. M. M.; FRANKE, C. R. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 152-163, 2006.

BLACKWELL, J. M. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 606-612. 1985.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 9, p. 439-440, 1997.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por testes de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas técnicas**. Brasília: Ministério da Saúde. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral: normas e manuais técnicos**. Brasília: Ministério da Saúde. 2003. 120p

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. Série A. Normas e manuais técnicos. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. 160p.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 3, n. 76, p. 173-180, 1998.

CABRERA, G. P. B.; SILVA, V. O.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATINIK-DE-SOUSA, C. B.. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 296-301, 1999.

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

CAMARGO-NEVES, V. L. F. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**. 2007. Disponível

em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa48_lva.htm> Acesso em: 5 jul. 2008.

CASTRO, A. G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar):** normas técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

CHAGAS E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G., GUIMARÃES, F. N.; VON PAUMGARTTEN, M. J.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 33, p. 89-229, 1938.

CHANG, K. P. *Leishmania donovani*: promastigote -macrophage surface interactions in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 48, n. 2, p. 175-189, 1979.

CHATTER, J. E. E. M.; BAHETH, G.; MANDAL, C. Diagnostic and prognostic potential of antibodies against o-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 1-2, n. 70, p. 55-65, 1999.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, S. M.; MELO, M. N.; COSTA, R. T.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M.; MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: Avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1991.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. N.; WERNECK, G. L.; RODRIGUES JÚNIOR, L. SANTOS, M. V.; ARAÚJO, I. B.; MOURA, L. S.; MOREIRA, S.; GOMES, R. B. B.; LIMA, S. S. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 229-236, 2005.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M.; ODAIR, G.; LINARD, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54-60, 2006.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 47, p. 75-87, 1955a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopes vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica da calazar, no Ceará. **O Hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955b.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniosis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 4, p. 149-212, 1962.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIAS, D. V.; DA COSTA, C. A.; TOLEDO, V. P. C. P.; BAMBIRRA, E.; GENARO, O.; MICHALICK, M. S. M.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; ORÉFICE, F. Leishmaniose visceral canina-Estudo parasitológico e histológico em olhos de cães – Parte I. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 58, p. 331-337, 1999.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235-241, 2007.

FERREIRA, S. A. **Avaliação do swab conjuntival para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina por PCR-hibridização**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. Comissão Nacional de Energia Nuclear, Belo Horizonte.

FERRER, L. M. Clinical aspect of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 6-10.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002, Sevilla. **Proceeding...** Sevilla, 2002. p. 21-24.

FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research Veterinary Science**, v. 2, n. 44, p. 194-196, 1988b.

FERRER, L.; FONDEVILA, D.; MARCO, A.; PUMAROLA, M. Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. **Veterinary Record**, v. 126, n. 4, p. 90, 1990.

FISA, R.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.

GALIMBERTTI, M. Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; CASANOVA, C.; COSTA, A. I.; ARAUJO, M. F. L.; TANICUCHI, H. H.; BARBOSA, J. A. R.; BARBOSA, J. E. R.; TOLEZANO, J. E.; PINTO, P. L. S. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, supl. 32, p. 217, 1999.

GENARO, O. **Leishmaniose Visceral canina experimental**. 1993. 202 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte.

GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; DA COSTA, C. A.; MELO, M. N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 43, 1988.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between Canine Leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 2-3, p. 100-107, 2006.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, 2007.

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

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DEJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HASSAN, M. Q.; GHOSH, A.; GHOSH, G. G.; GUPTA, M.; BASU, D.; MALLIK, K. K.; ADHYA, S. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*—primers and probes for DNA diagnosis. **Parasitology**, v. 107, pt. 5, p. 509–517, 1993.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L.; MOLANO, C.; MOHEDANO, I.A.; CARCELÉM, J.; MIRON, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of

intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 3, p. 113-118, 2001.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 1, p. 26-31, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002. Sevilla. **Proceeding...** Sevilla, 2002. p. 57-68.

KOUTINAS, A. F.; SCOTT, D. W.; KANTOS, V. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 121-130, 1992.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p. 291-363.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Archiv Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Fur Klinische Medizin**, v. 401, n. 2, p. 147-151, 1983.

LONGSTAFF, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; BEDFORD, P. G. C.; HERRTAGE, M. E.; DARKE, P. G. G. Leishmaniasis imported dogs in the United Kingdom: a potencial human health hazard. **Small Animal Practice**, v. 24, p. 23-30, 1983.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 17-26, 1997.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, suppl. 2, p. S359-S375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; CARVALHO, R. W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 34–37, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; RANGEL, FILHO, F. B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde pública**, v. 1, n. 4, p. 432-46, 1985.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, pt 3, p. 237-246, 1999.

MENDES, W. L.; SILVA, A. A. M.; TROVÃO, J. R.; SILVA, A. R.; COSTA, J. M. L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. 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 Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, 2005.

MICHALIK, M. S. M. Gênero leishmania. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 41-46.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania spp* in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Díptera: *Psychodidae: Phlebotominae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 255-259, 2002.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to

Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 67-76, 2007.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. Canine leishmaniasis: na update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 46-53.

MOREIRA JUNIOR, E. D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.; BARRETO, R. B.; CARVALHO, L. P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniosis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393-397, 2003.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p.245-252, 2007.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; GENARO, O.; LAMBERTUCCI, J. R.; SEFURO, J. C.; ANDRADE, A. S. R.; ANTUNES, C. M. F.; CARNEIRO, M. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in na urban área of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 456-463, 2005.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. Leishmania–macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 315–322, 1993.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V.F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infection examined by parasitological, serological and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 19, p. 1318-1322, 2006.

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from na endemic área of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 219-227, 2005.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

ORDEIX, L.; SOLANO-GALLEGAO, L.; FONDEVILA, D.; FERRER, L.; FONDATI, A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. Infection in dogs with specific cellular immune response. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 187, 2005.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniasis**: 2007 update. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/leish-2007.htm>>. Acesso em: 5 maio 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 3-4, p. 227-237, 2005.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A. M.; REYNIER, P.; MUSCATELLI, F.; GAMBARELLI, F.; FONTES, M.; DUMON, H.; QUILICI, M. Isolation and characterization of a repetitive sequence from *Leishmania infantum*: development of visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 3, p. 364-369, 1993.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G.; RUITENBERG, E. J. Cellular immune response in canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 60-64.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs

Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

QUINELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.; DYE, C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in amazonian Brazil. **Parasitology**, v. 115, pt. 2, p. 143-156, 1997.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p.161-168, 2003.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 253-261, 2001.

RACHAMIN, N.; JAFFE, C. L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: of three methods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 5, n. 85, p. 503-508, 1988.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESGO, G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352-2356, 2002.

REY, L. Parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In:____. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 856.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 11, v. 3, p. 13-14, 1997.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast as tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267-275, 1990.

RODRIGUEZ, E. H. G.; BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; WERKHAUSER, R. P.; COUTINHO, E. M.; SOUZA, W. V.; ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Evaluation of PCR for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUEZ, N. B. G.; RODAS, A. H. T.; BLOOM, R. B.; JACINTO, C. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Species Discrimination of Parasites by PCR and Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n. 9, p.2246-2252, 1994.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; FERNANDÉZ-BELLÓN, H.; RAMIS, A.; FERRER, L.; ALBAROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 116, n. 3-4, 190-198, 2007.

ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2, p.1261-1401. 1903.

ROSYPAL, A. C.; CORTÉS-VECINO, J. A.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; TIDWELL, R. R.; LINDSAY, D. S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *trypanosome cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 172-177, 2007.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, n. 10, p. 262-264, 1999.

SALIBA, E. K.; OUMEISH, O. Y. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 275-277, 1999.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, W. L. C.; BADARÓ, J. D. R.; FREITAS, L. A. R. Association between skin parasitism and granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 92, p. 89-94, 2004.

SANTOS, W. L. C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic área for american visceral leishmaniasis. Implication for the disease control. **Acta Tropical**, v. 69, p. 75-83, 1998.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. **Leishmaniose visceral Americana**: II Informe técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doneças/leish_visc/LVA24ago03.pdf>. Acesso em 28 abr. 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S. M.; FARMAKI, R.; KOUTINAS, C. K.; PETANIDES, T. J. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Compilation-ESVD and ACVD**, v. 18, p. 227-233, 2007.

SCALONE, A.; LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESGO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standatized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 275-285, 2002.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. Leishmania infections damage mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission **Proceedings of the National Academi of Science**, v. 89, n. 20, p. 9944-9948, 1992.

SCOTT, J. M.; SHREFFLER, W. G.; GHALIB, H. W.; BADARÓ, R.; REED, S. G. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 3, n. 44, p. 272-277, 1991.

SIDERIS, V.; PAPADOPOULOU, G.; DOTSIKA, E.; KARAGOUNI, E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece, **European Journal of Epidemiology**, v. 3, n. 15, p. 271-276, 1999.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HASSAN, M. Q.; BASU, D.; BRUIJN, M. H. L.; ADHYA, S.; MALLIK, K. K.; BARKER, D. C. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, n. 105, p. 183–192, 1992.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-30, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILLA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and Immunoistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. **Journal Comparative of Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, S.; LIULL, J.; RAMIS, A.; FERNADÉZ-BELLON, H.; RODRIGUÉZ, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serology analysis and the leishmanin skin test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 815-818, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; LIULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C. ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 33-1729, 2004.

SUNDAR, S.; RAY, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALIK, M. S. M. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 1-2, n. 292, p. 17-23, 2004.

TRINCONI, C. M., SANGALLI, J. R., PAULA, B. P., LIMA, V. M. F., LAURENTI, M. D., NUNES, C. M. Diagnóstico de eishmaniose visceral em cães de área endêmica visceral. IN: 7ª SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA, E SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 1., Araçatuba. **Anais. UNESP campus Araçatuba - SP**, 2007.

VAN EYS, G. J. J. M.; SCHOONE G. J.; KROON N. C. M.; EBELING S. B. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular Biochemical Parasitology**, n. 51, p. 133–142, 1992.

XAVIER, S. C.; ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J. H.; CHIARELLI, I. M.; LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research on leishmaniosis**. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 5 maio 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Urbanization: an increasing risk factor for Leishmaniasis. **Weekly epidemiological record**, v. 77, n. 44, p. 365–370, 2002.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba.

APÊNDICES

Apêndice A - Resultado geral dos testes sorológicos (RIFI e ELISA), parasitológicos (histoquímica - HE e imunoistoquímica - IMIQ) e molecular (PCR) em amostras de peles sadias (PS) e com lesão (PL) de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral no município de Ilha Solteira e classificados de acordo com a presença de sintomas em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Araçatuba, SP, 2008.

Grupos	Cães	SOROLOGIA			HE ***			IMIQ			PCR		
		ELISA*	RIFI**	PS	PS	PL	R	PS	PL	R	PS	PL	R
A	01	N	N	++		NR	P	P	NR	P	P	NR	P
	02	N	N	N		NR	N	N	NR	N	P	NR	P
	04	N	N	N		NR	N	N	NR	N	P	NR	P
	13	N	N	N		NR	N	N	NR	N	P	NR	P
	18	N	N	++		NR	P	P	NR	P	P	NR	P
	19	P (NE-4)	P (1/1.280)	+++		NR	P	P	NR	P	P	NR	P
	20	N	N	N		NR	N	P	NR	P	P	NR	P
	22	N	N	N		NR	N	N	NR	N	P	NR	P
O	03	P (NE-4)	P (1/2.500)	N		++	P	N	P	P	P	P	P
	06	P (NE-4)	N	N		S	S	N	N	N	P	P	P
	07	P (NE-5)	P (1/1.280)	N		S	S	N	N	N	P	P	P
	08	P (NE-6)	P (1/1.280)	++		++	P	P	P	P	P	P	P
	09	P (NE-3)	N	S		S	S	N	N	N	P	P	P
	10	P (NE-4)	P (1/640)	N		S	S	N	N	N	P	P	P
	11	N	N	N		N	N	N	N	N	P	P	P
	12	P (NE-6)	P (1/1.280)	+++		NR	P	P	NR	P	P	NR	P
	14	N	N	N		N	N	N	N	N	P	N	P

Continua

Continuação – Apêndice A

Grupos		SOROLOGIA		HE ***			IMIQ			PCR		
		ELISA*	RIFI**	PS	PL	R	PS	PL	R	PS	PL	R
O	15	P (NE-4)	P (1/320)	N	S	S	P	N	P	P	P	P
	21	P (NE-4)	N	N	NR	N	N	NR	N	P	P	P
	23	P (NE-3)	N	S	NR	S	N	NR	N	P	P	P
	33	N	P (1/320)	N	S	S	N	N	N	P	P	P
	34h	P (NE-5)	P (1/640)	NR	S	S	N	N	N	P	P	P
	05	N	P (1/160)	NR	S	S	NR	P	P	NR	P	P
P	16	P (NE-6)	P (1/1.280)	NR	++	P	NR	P	P	NR	P	P
	17	P (NE-5)	P (1/1.280)	NR	S	S	NR	P	P	NR	P	P
	24	P (NE-6)	P (1/1.280)	NR	+++	P	NR	P	P	NR	P	P
	25	P (NE-6)	P (1/1.280)	NR	+++	P	NR	P	P	NR	P	P
	26	P (NE-5)	P (1/1.280)	NR	+++	P	NR	P	P	NR	P	P
	27	P (NE-5)	P (1/1.280)	NR	++	P	NR	P	P	NR	P	P
	28	N	N	NR	S	S	NR	N	N	NR	P	P
	29	P (NE-6)	P (1/1.280)	NR	+++	P	NR	P	P	NR	P	P
	30	P (NE-4)	P (1/2560)	NR	+++	P	NR	P	P	NR	P	P
	31	P (NE-6)	N	NR	+++	P	NR	P	P	NR	P	P
	32	P (NE-5)	P (1/1.280)	NR	+	P	NR	P	P	NR	P	P

* ELISA ponto de corte: NE ≥ 3 ; ** RIFI ponto de corte: $\geq 1:40$; *** Carga parasitária; NE: níveis de ELISA; NR: Não realizado; N: Negativo; P: Positivo; S = Suspeito; R: Resultado.

Apêndice B – Artigo científico submetido à revista Veterinary Parasitology.

VETERINARY PARASITOLOGY

GUIDE FOR AUTHORS

Types of contributions

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Rapid Communications
4. Short Communications
5. Letters to the Editor
6. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Rapid Communications should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

Short Communications should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Dr F.H.M. Borgsteede
Animal Sciences Group, Wageningen UR
Division Infectious Diseases

Laboratory of Parasitic Diseases
P.O. Box 65
8200 AB Lelystad
The Netherlands

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work.

Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* edit@lucidusconsultancy.com offers a bespoke service to putative contributors to *Veterinary Parasitology* who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the

journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:
 <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit  <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:

a.	<i>For</i>	<i>periodicals</i>
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. <i>Vet. Parasitol.</i> 49, 123–158.		

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*
 Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993.
 Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in
 calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), Doramectin – a novel avermectin. Vet.
 Parasitol. 49, 45–50.

c. *For books*
 Blaha, T. (Ed.), 1989. Applied Veterinary Epidemiology. Elsevier, Amsterdam,
 344 pp.

d. *For multi-author books*
 Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate
 method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp,
 W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), Immunofluorescence and Related Staining
 Techniques. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in
 accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The
 correct abbreviation for this journal is Vet. Parasitol.

7. In the case of publications in any language other than English, the original
 title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets
 should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek,
 with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as
 "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications"
 should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary.
 Any further information, such as Author names, dates, reference to a source
 publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be
 referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulare

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they
 are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses.
 In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers
 of e are often more conveniently denoted by exp. 5. In chemical formulae,
 valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where
 reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full.
 Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very
 frequently or in the case of a compound being described as the end product of a
 gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. Vet. Parasitol. 29, 299–326).

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use

- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit  <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site:  <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible,

then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600 , Fax: (+353) 61 709111/113, authorsupport@elsevier.com.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Veterinary Parasitology* has no page charges**

Imunoistoquímica e histoquímica para a detecção de *Leishmania (L.) chagasi* em peles de cães de acordo com seus sinais clínicos.

Immunohistochemical and histochemical detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin according to clinical signs in dogs.

N. M.G. P. de Queiroz^a; W. A. Starke-Buzetti^{a*}; R. de C. V. da Silveira^a; A. C. F. de Noronha Jr^b; R.Z. Machado^c; T.M. F. S. Oliveira^c.

^a Departamento de Biologia e Zootecnia, FEIS/UNESP-Ilha Solteira, 15385-000, São Paulo, SP, Brasil.

^b Centro de Controle de Zoonoses, Ilha Solteira, 15385-000, São Paulo, SP, Brasil.

^c Departamento de Patologia Veterinária, FCAVZ/UNESP-Jaboticabal, 14879-000, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência do autor: Tel.: 55-18-3743-1281; Fax: 55-18-3743-1186.

E-mail: starke@bio.feis.unesp.br (W.A. Starke-Buzetti)

Resumo

A Leishmaniose Visceral é causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (L.) chagasi* e é endêmica para humanos e cães em muitas regiões do Brasil. A presença do parasita na pele dos cães reforça a importância destes animais domésticos no ciclo de vida da *L. chagasi* e na infecção humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar os métodos imunoistoquímico (IMIQ) e histoquímico (HE) para detecção de *Leishmania* em peles de cães de três diferentes grupos, divididos de acordo com os sinais clínicos da LVC (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) e compará-los com outros testes sorológicos comumente utilizados (ELISA e RIFI). Amostras de pele com ou sem lesão foram colhidas de 34 animais suspeitos ou positivos de LVC pelos testes sorológicos (RIFI e ELISA), para posteriormente serem analisadas quanto a histopatologia e a presença do parasita pelos métodos IMIQ e HE. Os cães sintomáticos apresentaram a mais intensa reação inflamatória, altos títulos de anticorpos e a maior carga parasitária, com grande número de células mononucleares infectadas em todas as camadas da pele e ao redor das células musculares lisas. O padrão inflamatório das amostras positivas de pele foram caracterizadas por uma inflamação crônica na maioria dos casos, com a predominância de macrófagos infectados por amastigotas de

Leishmania. Não apenas as peles com lesão (52%), mas também as amostras de peles sadias (36%) foram positivas para a presença de amastigotas, particularmente em cães assintomáticos e oligossintomáticos. A concordância encontrada entre os métodos utilizados foi considerada boa entre os animais oligossintomáticos e sintomáticos na comparação entre IMIQ x RIFI e ótima no grupo sintomático quando feita a concordância entre IMIQ x ELISA. A comparação dos níveis de concordância entre IMIQ x HE demonstrou que nos animais sintomáticos, ambos os exames puderam ser usados com facilidade na identificação das amastigotas, mas para os animais assintomáticos e oligossintomáticos, foi necessária a IMIQ para elucidar os casos inconclusivos. IMIQ foi considerado um método importante em adição ao teste HE ou aos exames sorológicos. A presença de amastigotas não apenas em peles lesionadas, mas também nas sadias, especialmente nos cães assintomáticos e oligossintomáticos, reforça a relevância destes animais na epidemiologia da LVC.

Abstract

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by a protozoa parasite of the *Leishmania* (*L.*) *chagasi* species, which is endemic for humans and dogs in many regions of Brazil. The purpose of the present study was to evaluate the immunohistochemical (IMHC) and histochemical (HE) methods for detection of *Leishmania* in the skin of dogs from three different groups divided according to clinical signs: asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic *Leishmania*-infected dogs. Skin tissues presenting lesions or not from the dogs were processed for routine IMHC and HE methods and the results were also compared with an indirect fluorescence antibody test (IFAT) and ELISA. This study demonstrated the presence of intact amastigote parasites in the skin of dogs from all groups regardless of their clinical status or of the serological test results. However, the most intense inflammatory reaction, parasitic load and the highest antibody titres were seen in symptomatic dogs. Those dogs with high serological antibody titre for *Leishmania* showed a great number of infected mononuclear cells for all layers of skin: below the epidermis, superficial, midi and deep dermis, hypodermis and around the smooth muscle cells. The inflammatory pattern of positive skin samples was characterized by a chronic inflammation in most cases, with a predominance of

intramacrophagic *Leishmania*-amastigotes. Not only skin lesions (52%), but also clinically healthy skin samples (36%) were positive due to the presence of amastigotes, particularly in asymptomatic and oligosymptomatic dogs. In comparison with HE, the sensitivity and specificity of IMHC was 100% and 79%, respectively. The results of the present study support the relevance of infected but asymptomatic or oligosymptomatic dogs in the epidemiology of canine leishmaniasis. Immunohistochemistry proved to be a valuable method to support the diagnosis of this disease. The level of concurrence between tests was also discussed in this paper.

Key words: *Leishmania chagasi*; Dogs; Immunohistochemistry; Canine Visceral Leishmaniasis

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral Canina é uma zoonose causada por um parasita protozoário da espécie *Leishmania* (L.) *chagasi*, sendo endêmica tanto para humanos quanto para cães de muitas regiões do Brasil (Deane & Deane, 1955 e 1962). A transmissão da LVC ocorre pela picada das fêmeas dos insetos vetores, conhecidos como flebotomíneos, principalmente da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que para se alimentar sugam o sangue de homens e animais transmitindo o parasita (Laison, 1988). Por causa da relação de proximidade entre cães e homens, os cães são considerados os reservatórios mais importantes da doença em área urbana. A presença da *Leishmania* na pele dos cães reforça a importância destes animais domésticos no ciclo de vida da *L. chagasi* e na infecção humana (Deane & Deane, 1955 e 1962). A pele dos cães tem três aspectos importantes para a LVC: é a região do corpo que mais manifesta os sinais clínicos da doença, é o local onde acontece a primeira interação entre o parasita e o sistema imune do cão e é o reservatório do parasita para a transmissão ao vetor (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999).

Os cães infectados com LVC são classificados de acordo com os sinais clínicos apresentados. Desta forma, as seguintes categorias foram estabelecidas por Mancianti et al. (1988): 1. sintomáticos (aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos), 2. oligossintomáticos (um a três sinais clínicos), e 3. assintomáticos (sem sinais clínicos).

Os principais sinais clínicos da leishmaniose canina clássica são: perda progressiva de peso, anemia, lesões cutâneas, linfadenopatia generalizada, glomerulonefrites, epistaxias, colites crônicas, artrites, lesões oculares e perioculares, ceratoconjuntivites e uveítes (Chapman & Hanson, 1984; Chang et al., 1985; Ferrer et al., 1991; Ciaramella, et al., 1997; Ferrer et al., 1999; Blavier et al., 2001; Tafuri et al., 2001). As lesões de pele são manifestações comuns na LVC e muitas formas severas já foram descritas, como alopecia e dermatites esfoliativas, ulcerativas, nodulares ou papulares (Solano-Gallego et al., 2004; Ordeix et al., 2005). A dermatite esfoliativa é a manifestação cutânea mais comum da LVC, com frequência registrada de 56-91% (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1992). Existem ainda outras lesões histológicas que foram recentemente verificadas em cães com LVC, como a ortoqueratose; hiperplasia epidermal; exocitose; crostas; edema superficial; dermatites perivascular, intersticial e nodular; perifoliculites; dermatites periglandulares; adenite sebácea e paniculites (Papadogiannakis et al., 2005 ; Saridomichelakis et al., 2007).

Porém, nos estudos de coorte com cães infectados por *Leishmania*, a maioria não apresenta sinais clínicos característicos da doença. Embora o papel dos cães assintomáticos na epidemiologia da doença ainda não esteja completamente claro (Abranches et al., 1991; Cabral et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2004), eles devem contribuir significativamente para o nível atual de casos de infecções humanas por *L. chagasi* no Brasil.

Atualmente, o controle da LVC no Brasil envolve a detecção dos cães infectados por análises sorológicas (RIFI e ELISA) ou ainda pela visualização do protozoário através de métodos parasitológicos (exame microscópico direto de amastigotas em esfregaços). Enquanto os testes sorológicos apresentam mais resultados falso positivos por causa das reações cruzadas com outros patógenos (Badaró et al., 1983; Barbosa-de-Deus, et al., 2002; Iniesta et al., 2002), os métodos parasitológicos são mais precisos, mas também mais invasivos porque usualmente requerem punção de medula ou linfonodo. A utilização da técnica de imunoistoquímica possibilita a detecção de amastigotas mesmo em quantidades pequenas na pele de cães, maior sensibilidade, especificidade e eficiência no diagnóstico da LVC em população de cães com infecções subclínicas (Ferrer et al., 1988b; Tafuri et al, 2004).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os métodos imunoistoquímicos (IMIQ) e histoquímicos (HE) para demonstrar a presença de *Leishmania* na pele de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos de Ilha Solteira, SP, Brasil. Estes métodos foram também comparados a outros comumente utilizados para o diagnóstico desta doença em cães, como RIFI e ELISA. Além disso, objetivou-se também a realização de um estudo histopatológico das peles clinicamente normais ou lesadas destes animais.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Trinta e quatro cães errantes, recolhidos em áreas de risco para LVC por serem suspeitos ou naturalmente infectados pela *Leishmania (L.) chagasi* (RIFI e ELISA; títulos ≥ 40), foram doados para pesquisa pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, SP, Brasil. Os cães foram divididos em três grupos de acordo com seus sinais clínicos característicos da doença, seguindo as definições de Mancianti et al. (1988), como: cães assintomáticos (n = 9), oligossintomáticos (n = 17) e sintomáticos (n = 8). Os principais sinais clínicos observados nos cães oligossintomáticos e sintomáticos foram onicogribose, linfadenomegalia, emagrecimento, lesões de pele, apatia, pelos opacos e/ou alopecia, conjuntivite e anemia.

Para a realização das eutanásias pelo CCZ, os cães foram previamente anestesiados com 25 mg/Kg de sódio tiopental e em seguida receberam uma injeção intravenosa letal de cloreto de potássio a 19,1%. Uma amostra de pele por animal foi coletada de 8 cães assintomáticos (pele sem lesão) e de 9 sintomáticos (pele com lesão). No entanto, dos cães oligossintomáticos, foram coletadas duas amostras de cada animal, sendo uma de pele com lesão (17 cães) e outra de pele sadia (14 cães).

Durante as autópsias, foram realizados “imprinting” de amostras de fígado, baço e linfonodo e a presença de amastigotas de *Leishmania* nestes órgãos confirmou a Leishmaniose Visceral nestes cães.

2.2. Exame histoquímico

As amostras cutâneas foram fixadas em formalina tamponada a 10% ou em solução Bouin para os exames histológicos e imunoistoquímicos. Os tecidos fixados foram emblocados em parafina e três secções de cada amostra foram montadas em lâminas e coradas pela H&E para posterior avaliação, através de microscópio de luz branca, relativa ao grau de parasitismo (+ a ++++) e à histopatologia. O grau de parasitismo em cada secção tecidual foi determinado por observação de pelo menos cem campos microscópicos (aumento de 1000 x), incluindo nestas análises todas as camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme). O número de campos microscópicos positivos para a presença de amastigotas de *Leishmania* foram contados e a porcentagem de campos positivos calculada com base na média dos campos positivos para cada amostra de pele. A carga parasitária foi posteriormente classificada, como segue: -, negativo (nenhuma amastigota encontrada); +, suspeito (< 5% campos microscópicos, mas inconclusivo e de difícil visualização); ++, positivo, mas com baixa carga parasitária (5-25% campos microscópicos positivos); +++, moderado (25-50%); ou ++++, intenso (>50% campos microscópicos). Quando as amostras foram consideradas negativas ou suspeitas, até cinco ou mais secções teciduais eram examinadas por cada animal.

2.2. Exame Imunoistoquímico

Para execução da técnica de imunoistoquímica (IMIQ) (Tafari et al., 2004), as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio para bloquear a atividade da peroxidase endógena, seguida da incubação em soro normal de cabra (diluição 1:100) para bloquear as ligações não específicas das imunoglobulinas no tecido. O soro hiper imune de um cão, naturalmente infectado com *L. chagasi* (RIFI com título = 1: 2560), foi usado como anticorpo primário. O secundário foi um anticorpo de cabra anti-coelho biotinilado (reação cruzada com cão). Após as lavagens apropriadas, o tecido foi incubado com uma solução do complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vectastain ABC Kit; Vector Lab.) seguido pela incubação com o substrato VIP (VIP substrate Kit; Vector Lab.). Finalmente, as lâminas foram desidratadas, clareadas, coradas com hematoxilina de Mayers e montadas entre lâminas e lamínulas.

As amostras de tecido tratadas como descrito acima tiveram o diagnóstico concluído após exame de uma a cinco secções, sendo o resultado já considerado positivo quando pelo menos em uma secção detectou-se a presença de amastigotas.

2.4. Exames Sorológicos

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro foi investigada em todos os 34 cães pelo método ELISA indireto (Machado et al., 1997) usando antígeno solúvel de *L.(L.) chagasi* e também através de RIFI de acordo com Oliveira (2008).

2.4.1. ELISA

Para o método ELISA indireto, 100 µl de antígeno solúvel de *L. chagasi*, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (0,05 M, pH 9,6) foi adicionado em cada cavidade das microplacas de ELISA para serem incubadas “overnight” a 4°C em câmara úmida. A concentração da proteína antigênica foi determinada como 5 µg/ml. Após cobrir as placas com o antígeno, elas foram bloqueadas por uma hora a 37°C com 6% de leite em pó diluído em 0,05 M de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. Após as lavagens (3 minutos cada lavagem), 100µl de soro canino diluído (1/400) em PBS-Tween-20, acrescido de 5% de soro de coelho, foi adicionado em duplicatas na placa e incubada em câmara úmida a 37°C por 60 minutos. Seguindo a incubação com soro canino, uma alíquota de 100 µl de fosfatase alcalina conjugada a IgG de coelho anti-cão (Sigma A-0793) diluída a 1:8000 foi adicionada em cada cavidade e incubada a 37°C por 60 minutos em câmara úmida. Após as lavagens apropriadas, 100 µl do substrato (p-nitrophenyl phosphate, Sigma N-9389) a 1 mg/ml em tampão dietanolamina, pH 9,8 foi adicionado e incubado por 45 minutos a temperatura ambiente. A reação foi parada com a adição de 30 µl de hidróxido de sódio 3,2 M e as placas foram lidas usando o leitor de microplacas a um comprimento de onda de 406 nm. Para controlar as variações intra-placa, controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. Ensaios de controle foram realizados sem antígeno, com soro de cão, conjugado e substrato.

A calibração do sistema ELISA foi feito de acordo com Oliveira (2008) usando soro de referência positivo coletado de cães sintomáticos para leishmaniose e soro

referência negativo de cães negativos para leishmaniose (área não endêmica). Valores de absorbância (valores DO) foram agrupados em níveis ELISA (EL), que variaram de 0 (nível mais baixo) a 9 (nível mais alto) de acordo com Voller et al. (1980) e adaptado por Oliveira (2008). O ponto de corte foi definido para $EL \geq 3$.

2.4.2. *Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)*

Soro canino (10 μ l), diluído 1:40 e a seguir em diluições seriadas e sucessivas, foi adicionado em cada lâmina contendo antígeno (promastigotas de *L. chagasi*) e incubado em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,01 M e depois foi adicionada IgG anti-cão conjugada com isotiocianato de fluoresceína (IgG-FITC, KPL # 02-19-02) diluída 1:30 em PBS contendo 1mg% de solução azul de Evans. As lâminas foram lavadas três vezes, secas e cobertas com solução tampão de glicerina na proporção 9:1 (solução tampão glicerina/carbonato/bicarbonato 0,5 M pH 9,6). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência. O ponto de corte para RIFI foi definido com a diluição de soro $\geq 1:80$.

3. *Análise Estatística*

Para avaliar o índice de concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico, calculou-se o índice Kappa de concordância (intervalo de confiança 95%), usando o programa Biostat (versão 4.0), sendo $\kappa < 0,4$ aceito como concordância fraca, $0,4 < \kappa < 0,7$ como concordância boa e $\kappa > 0,7$ como ótima.

3. Resultados

3.1. *Exame histoquímico e Avaliação Histopatológica*

Dentre os 34 cães estudados no presente trabalho, 8 (23,5%) foram classificados como assintomáticos, 17 (50%) oligossintomáticos e 9 (26,5%) sintomáticos para Leishmaniose Visceral Canina. Quando as amostras de pele destes animais, coradas por HE, foram examinadas microscopicamente, verificou-se que não somente as peles com

lesão (52%), mas também as clinicamente sadias (36%) eram positivas pela presença de amastigotas de *Leishmania*.

Pela avaliação clínica, os cães assintomáticos não apresentavam qualquer lesão cutânea aparente e pelo exame direto do parasita verificou-se que a maioria das amostras de peles sadias colhida destes animais estava de fato negativa (5/8 ou 62,5%) (Tabela 1). No entanto, 3/8 (37,5%) dos cães apresentaram de moderada a intensa carga parasitária (++ a +++) nas amostras sadias de pele, especialmente o animal nº 19 que apresentava numerosos macrófagos parasitados com *Leishmania*.

No grupo dos cães oligossintomáticos, as amostras foram colhidas tanto de peles com lesão (14 cães) como de peles sadias (17 cães). Embora neste grupo (Tabela 1), 14/17 (82,4%) cães apresentassem lesões de pele, apenas 3/14 (21,4%) tiveram as amostras confirmadas como positivas e 9/14 foram consideradas suspeitas. Nas amostras de pele sadia, por outro lado, 12/17 (70,5%) eram negativas, 02/17 (11,8%) consideradas suspeitas e 3/17 (17,6%) positivas com carga parasitária variando de moderada a intensa (++ a ++++).

Análises microscópicas das amostras de pele dos cães oligossintomáticos revelaram diferentes manifestações de dermatites, sendo as dermatites perivasculares e perifoliculares as mais comuns (Fig. 1). Semelhante ao assintomático, um cão oligossintomático, nº 12 (Fig. 1) apresentou carga parasitária intensa (+++++) mesmo na pele aparentemente sadia. Amastigotas foram vistas, particularmente dentro dos macrófagos da derme superior, média (Fig. 1A, 1B e 1D) e profunda, hipoderme (Fig. 1C) e entre as fibras musculares (Fig. 1E e F). Porém, na maioria dos casos os parasitas não foram identificados nos cães apresentando dermatites com predominância de células polimorfonucleares, especialmente neutrófilos, edema, epidermes lesionadas, hemorragias e congestão dermal.

Entre os cães sintomáticos, 100% apresentavam lesões de pele e destes 88,9% foram positivos com cargas parasitárias variando de ++ (22,2%), +++ (22,2%) e ++++ (44,5%) (Tabela 1). As alterações cutâneas observadas na maioria destes cães foram dermatites esfoliativa; crostas; hiperqueratose, principalmente nas juntas dos braços e pernas e nas patas; hipotricose e alopecia em diferentes partes do corpo. Havia também alopecia ao redor dos olhos e lesões na ponta das orelhas. Estes animais com

positividade intensa, particularmente o animal nº 30, apresentaram intenso infiltrado de células mononucleares, com predominância de macrófagos repletos de amastigotas de *Leishmania* em todas as camadas da pele: derme superior (Fig. 2A e D), média e profunda (Fig. 2C) e ao redor das células musculares logo abaixo da hipoderme. Observou-se ainda uma inflamação dermal difusa com desarranjo completo das fibras conjuntivas que foram substituídas por uma reação inflamatória mononuclear (Fig. 2A) nodular (Fig. 2B) e dermatites perivasculares (Fig. 2D). Além disso, poucas amastigotas foram vistas fora das células, pois na maioria dos casos havia predominância de amastigotas de *Leishmania* intramacrofágicas (Fig. 2E e F).

3.3. Exame Imunoistoquímico (IMIQ) x Histoquímico (HE)

O método IMIQ foi utilizado para detectar *Leishmania* na pele dos cães e para comparação com os resultados de HE. Os resultados relativos à coloração IMIQ estão na Tabela 2 e revelaram que 04/8 (50%) dos cães assintomáticos e 05/17 (29,4%) dos oligossintomáticos tinham parasitas intactos nas amostras de pele sadia, enquanto 05/14 (35,7%) e 08/9 (88,9%) dos oligossintomáticos e sintomáticos, respectivamente, apresentavam amastigotas nas amostras de pele lesionadas.

Quando os resultados das técnicas HE e IMIQ foram comparados, observou-se que o número de cães positivos foi maior pela IMIQ (19/34, 55,9%) do que pela HE (15/34, 44,1%) (Tabela 3 e Tabela 4) e 12 cães foram considerados suspeitos ou inconclusivos na HE. Quando estas amostras de pele inconclusivas foram especificamente coradas por imunoistoquímica, 03 tornaram-se positivas e 09 negativas, particularmente, no grupo dos oligossintomáticos. Por outro lado, 88,9% foram simultaneamente positivos por HE e IMIQ (Tabela 3). O nível de concordância entre IMIQ x HE foi mais baixo ($\kappa = 0,61$) nos oligossintomáticos e mais alto ($\kappa = 1$) no grupo dos sintomáticos (Tabela 5).

A Figura 3 mostra uma reação imune positiva em amostra de pele com lesão do cão sintomático nº 3, onde haviam muitos macrófagos cheios de amastigotas de *Leishmania*. As amastigotas foram coradas em vermelho tijolo pela imunoperoxidase devido ao cromógeno utilizado e assim foi possível visualizar um alto grau de contraste entre o parasita e o tecido do hospedeiro.

3.4. Testes sorológicos (ELISA e RIFI) x testes parasitológicos (IMIQ e HE)

No presente trabalho, 24/34 (70,6%) foram positivos pelos testes sorológicos, mas o número de cães positivos pelo ELISA foi ligeiramente superior ao RIFI (55,9% RIFI e 64,7% ELISA) (Tabelas 3 e 4). O índice de concordância geral entre estes dois testes sorológicos foi $\kappa = 0,57$; porém, quando o nível de concordância foi analisado de acordo com os sinais clínicos, a concordância entre RIFI e ELISA foi ótima ($\kappa = 1$) entre os assintomáticos, boa ($\kappa = 0,60$) nos sintomáticos e fraca ($\kappa = 0,16$) nos cães oligossintomáticos (Tabela 5).

Quando o teste ELISA foi comparado com IMIQ verificou-se uma concordância de apenas $\kappa = 0,32$. O nível de concordância também foi fraco quando os testes sorológicos e parasitológicos foram comparados ($\kappa = 0,25$) no grupo dos assintomáticos (Tabela 5). Isto aconteceu devido ao fato de que apenas um cão assintomático (cão nº 19) foi positivo com alto título de anticorpos anti-*Leishmania* (ELISA e RIFI), confirmado pela intensa carga parasitária na pele. Por outro lado, três outros cães foram positivos apenas pelos testes parasitológicos (Tabela 3).

No grupo dos animais oligossintomáticos, o nível de concordância entre os testes analisados 2 x 2 foi o mais fraco ($\kappa = 0,14$). Apenas 7/17 (41,2%) dos cães foram simultaneamente positivos na sorologia e nos testes parasitológicos da pele (Tabela 5). Embora os níveis de concordância entre IMIQ x ELISA e ELISA x RIFI tenham sido baixos, entre IMIQ x RIFI foi boa ($\kappa = 0,52$) e IMIQ x HE foi ótimo ($\kappa = 0,76$). Entre os sintomáticos, o nível de concordância entre esses testes foi o mais alto, atingindo índices de 0,60 e 1 (Tabela 5). Porém, um animal sintomático (cão nº 28) deste grupo foi negativo por todos os testes (Tabela 3), o que fez com que diminuísse o nível de concordância entre os métodos neste grupo.

4. Discussão

Na Leishmaniose Visceral Canina, a pele é a parte do corpo que mais comumente apresenta os sinais da doença e a presença do parasita. Assim, a pele dos cães infectados é o reservatório do parasita e pode ter um papel importante na infecção dos insetos vetores e na transmissão do parasita para os cães e o homem. Da infecção

cutânea localizada, o parasita pode se disseminar através dos vasos linfáticos ou sanguíneos, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodos, fígado e baço, bem como rins e trato gastrointestinal (Genaro et al., 1988, Dias et al., 1999). Em concordância com estudos anteriores (Ferrer et al., 1988a; Ciaramella et al., 1997; Feitosa et al., 2000), as anormalidades mais freqüentemente observadas na pele são alopecia e descamação, dermatites esfoliativa e ulcerativa e hiperqueratose.

Os cães foram classificados como sintomáticos (23,5%), oligossintomáticos (50%) e sintomáticos (26,5%) pela infecção por *L. chagasi*. Embora, 87,5% dos cães assintomáticos tenham sido negativos nos testes sorológicos, os exames HE e IMIQ revelaram 50% destes cães com moderada a intensa carga parasitária nas amostras de pele. De forma semelhante, Abranches (1991) demonstrou que os cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentaram grande quantidade de parasitas na pele independente da presença de lesões.

Relativo aos cães oligossintomáticos, 88,2% foram positivos pelos testes sorológicos (RIFI ou ELISA) e apenas 41,2% destes animais foram simultaneamente positivos nos testes sorológicos e parasitológicos (IMIQ ou HE), com carga parasitária de moderada a intensa, incluindo três cães que tiveram os mais altos títulos de anticorpo anti-*Leishmania* e forte parasitismo, mesmo sem lesão nas amostras de pele. Por outro lado, 58,8% dos cães soropositivos (particularmente ELISA) não apresentaram amastigotas nas amostras de pele pelos métodos HE e IMIQ. Porém, o resultado positivo do teste sorológico presume um contato com o parasita e uma subsequente resposta imune humoral, mas não indica necessariamente infecção ativa por *Leishmania*. Além disso, a maioria dos cães com a pele negativa foi também negativa pela RIFI, mas com ELISA positivo, sugerindo uma possível reação cruzada com outros patógenos. Resultados falso-positivos são possíveis em testes sorológicos, particularmente ELISA (Badaró et al., 1983; Barbosa-de-Deus, et al., 2002; Iniesta et al., 2002; Ferreira et al., 2007), sendo comum em cães as co-infecções com *Babesia*, *Ehrlichia* e *Trypanosoma Cruzi*. É possível que tenham ocorrido reações cruzadas com estes ou outros patógenos, principalmente nos cães oligossintomáticos, o que pode ser alvo para investigações em estudos futuros.

A presença de amastigotas de *Leishmania* foi observada em 52% das amostras de pele com lesão e em apenas 36% das peles clinicamente sadias. Trabalhos anteriores também revelaram a presença de parasitas em peles clinicamente sadias, independente da manifestação clínica dos cães de áreas endêmicas, através da imunoistoquímica (Papadogiannakis et al., 2005; Saridomichelakis et al., 2007) e da PCR (Solano-Gallego et al., 2004). De forma semelhante, lesões histológicas, como dermatites perifoliculares e difusas e adenites sebáceas foram relatadas em tecidos clinicamente sadios do focinho de cães sintomáticos pela LVC (Solano-Gallego et al., 2004; Saridomichelakis et al., 2007). Isto sugere que as biopsias de pele para diagnóstico não precisam necessariamente ser obtidas apenas de peles lesionadas, mas também de peles clinicamente sadias (Rodríguez-Cortés et al., 2007).

Um cão assintomático e três oligossintomáticos soropositivos, com altos níveis de anticorpos, mas com leve ou ausente reação inflamatória em peles sadias, mostraram carga parasitária de moderada a intensa com amastigotas de *Leishmania* dentro de numerosas células mononucleares na derme, particularmente em macrófagos concentrados na região superior e média da derme, indicando que a carga parasitária não está necessariamente correlacionada com a presença de lesões cutâneas ou a intensidade da inflamação. De acordo com esta observação, Saridomichelakis et al. (2007) informaram que em geral há uma falta de correlação entre a densidade parasitária e a intensidade do infiltrado inflamatório. Segundo Papadogiannakis et al. (2005), a presença de células inflamatórias e parasitas em cães sem evidências de dermatites pode ser explicada pela hipótese de que lesões macroscópicas acompanham a infiltração de células inflamatória, mas após um certo período de tempo. Porém, Solano-Gallego et al. (2004) não verificaram amastigotas mesmo usando a técnica de imunoistoquímica em peles sadias de cães assintomáticos.

Nos cães oligossintomáticos, parasitas intactos foram associados com a presença de reação inflamatória crônica caracterizada pela predominância de células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Por outro lado, 70,5% dos cães com lesões de pele representadas pela predominância de células polimorfonucleares, em sua maioria neutrófilos, edema, epiderme danificada, hemorragia e congestão dermal, apresentaram pouca chance de estarem parasitadas com

amastigotas, indicando a possibilidade de co-infecções causando ou intensificando as alterações dermatológicas no grupo dos cães oligossintomáticos. De forma semelhante, Santos et al. (2004) mostraram que o parasitismo cutâneo não estava associado com infiltrado inflamatório agudo.

No grupo sintomático, 100% dos cães apresentaram diferentes alterações cutâneas e intensa carga parasitária em 88,9% deles. Cães com alto título de anticorpos anti-*Leishmania* e alta carga parasitária mostraram sempre um processo inflamatório crônico intenso que variava de um padrão inflamatório difuso a focal granulomatoso com células mononucleares, particularmente macrófagos, mas também plasmócitos e linfócitos em todas as camadas da pele: abaixo da epiderme, derme superficial, média e profunda, hipoderme e ao redor das células musculares. Um animal (cão 30) possuía enorme quantidade de macrófagos com *Leishmania* em todas as camadas da pele. Em concordância, Xavier et al. (2006) registraram que em geral, a reação inflamatória crônica era caracterizada por infiltrado mononuclear e este era difuso na região superior da derme e focal ao redor de vasos sangüíneos, folículos pilosos e glândulas na epiderme profunda, com infecção mais intensa no grupo sintomático. Também neste grupo, a carga parasitária estava diretamente relacionada à severidade dos sinais clínicos da doença (Giunchetti, et al., 2006; Xavier et al., 2006) semelhante aos nossos resultados.

Através da técnica HE, 32,4% das amostras de pele, particularmente de cães assintomáticos e oligossintomáticos foram consideradas inconclusivas e classificadas como suspeitas devido à dificuldade de visualização das amastigotas. Em concordância, Bourdoiseau et al. (1997) relataram que embora o exame microscópico direto do parasita por HE fosse uma técnica específica e usada como avaliação de rotina, as amastigotas freqüentemente eram de difícil visualização e algumas vezes os exames eram inconclusivos. O uso da IMIQ para detectar amastigotas em tecidos caninos já havia sido relatada anteriormente como uma técnica eficiente para este diagnóstico (Tafuri et al., 2004; Xavier et al., 2006; Moreira et al., 2007), mas com sensibilidades diferentes de acordo com os sinais clínicos dos animais: 92.7%, 76% e 100%, respectivamente para cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos (Moreira et al., 2007).

A técnica imunoistoquímica (IMIQ) tem sido freqüentemente empregada para a detecção de amastigotas de *Leishmania* em tecidos fixados em formalina (Bourdoiseau et al., 1997; Ferrer et al., 1988b; Solano-Gallego et al., 2004; Tafuri et al., 2004; Xavier et al., 2006) e verificou-se uma melhor sensibilidade em relação à técnica histológica (HE) de rotina, especialmente em cães assintomáticos e oligossintomáticos. Nossos dados mostraram índices de positividade pela IMIQ de 50%, 41,2% e 88,8% nos grupos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, respectivamente, quando IMIQ foi utilizada. O método IMIQ permitiu uma melhor visualização do parasita, pois possibilitou um alto grau de contraste entre os parasitas e o tecido do hospedeiro, sendo possível o diagnóstico preciso da Leishmaniose, mesmo quando havia apenas poucos parasitas (Ordeix et al., 2005).

No presente estudo, o nível de concordância entre IMIQ x HE foi analisado e na comparação geral revelou-se ótimo ($\kappa = 0,76$), sendo o nível mais baixo ($\kappa = 0,82$) entre os animais oligossintomáticos e o mais alto ($\kappa = 1$) entre os sintomáticos. Isto significa que nos animais sintomáticos, ambos os exames (HE e IMIQ) podem ser usados com facilidade na identificação das amastigotas. No entanto, para os animais assintomáticos e oligossintomáticos, exames mais precisos como o IMIQ foram necessários.

Neste estudo, 24 (70,06%) cães soropositivos foram identificados, mas em apenas 17 (43,2%) destes animais o resultado foi confirmado pelo exame direto do parasita ou pela imunoistoquímica; porém, a maioria daqueles que apresentavam títulos altos de anticorpos, pela RIFI ou ELISA apresentou também amastigotas intactas nas amostras de pele. Altos títulos de anticorpos pela RIFI, assim como pela ELISA, foram detectados nos grupos dos sintomáticos, em concordância com os dados de Reis et al. (2006). Porém, quando não houve concordância entre ambos os testes sorológicos e quando os títulos de anticorpos foram baixos, as amastigotas não foram detectadas na pele destes animais mesmo usando imunoistoquímica, particularmente nos cães oligossintomáticos.

O nível ótimo de concordância entre IMIQ x HE foi observado no grupo sintomático ($\kappa = 1$), bem como no assintomático ($\kappa = 0,75$), mas entre ELISA x RIFI isto foi observado apenas entre os assintomáticos ($\kappa = 1$). É interessante notar que quando os testes sorológicos foram comparados com a imunoistoquímica, a

concordância foi considerada boa entre os animais oligossintomáticos ($\kappa = 0,55$) e sintomáticos ($\kappa = 0,60$) na comparação entre IMIQ x RIFI, e ótima no grupo sintomático ($\kappa = 1$) quando feita a concordância entre IMIQ x ELISA.

Após a realização de todos os testes diagnósticos, 7 (20,6%) animais foram negativos, 8 (23,5%) suspeitos e 19 (55,9%) positivos. Os resultados suspeitos ocorreram quando não houve concordância entre os testes sorológicos (ELISA e RIFI) com IMIQ ou HE negativos. O grupo oligossintomático teve o maior número de resultados suspeitos ou inconclusivos em nosso estudo.

Concluindo, ambos os métodos parasitológicos (IMIQ e HE) demonstraram a presença de amastigotas intactas na pele com um bom nível de concordância entre os resultados, independente dos sinais clínicos dos cães ou dos resultados dos exames sorológicos. Embora, poucos animais permaneceram na categoria de suspeitos, IMIQ foi considerado um método seguro e importante ferramenta em adição aos exames sorológicos ou ao teste HE. A presença de amastigotas não apenas em peles lesionadas, mas também nas sadias, especialmente nos cães assintomáticos e oligossintomáticos, reforça a relevância destes animais na epidemiologia da LVC.

Referências

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Conceição-Silva, F., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasit.* 77, 557-561.
- Badaró, R., Reed, S.G., Carvalho, E.M., 1983. Immunofluorescent antibody test in American Visceral Leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* 32, 480-484.
- Barbosa-De-Deus, R., Mares-Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, R.G., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro O., Tavares, C.A., 2002. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 1361-1366.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore, J.L., Bourdoiseau, G., 2001. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet. J.* 162, 108-120.
- Bourdoiseau, G., Marchal, T., Magnol, J.P., 1997. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 439-440.

- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H., Alexander, J., 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76, 173-180.
- Chang, K.P., Fong, D., Bray, R.S., 1985. Biology of leishmania and leishmaniasis. In: *Leishmaniasis*, ed. Chang K.P. and Bray, R.S., pp. 1-30. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Chapman, W., Hanson, W., 1984. Leishmaniasis. In: *Clinical Microbiology and Infectious Disease of the Dog and Cat*, ed. Greene C., pp. 764-770. WB Saunders, Philadelphia, PA.
- Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 22, 539-543.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1955. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hosp.* 47, 113-129.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1962. Visceral leishmaniosis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.* 4, 149-212.
- Dias, D.V., Da Costa, C.A., Toledo, V.P.C.P., Bambirra, E., Genaro, O., Michalick, M.S.M., Costa, R.T., Mayrink, W., Oréfice, F., 1999. Leishmaniose visceral canina- Estudo parasitológico e histológico em olhos de cães – Parte I. *Rev. Bras. Oftal.* 58, 331-337.
- Feitosa, M.M., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Perri, S.H.V., 2000. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba – São Paulo State (Brazil). *Clin. Vet.* 28, 36-44.
- Ferreira, E.C., Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M.F., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 31, 235-241.
- Ferrer, L., Juanola, B., Ramos, J.A., Ramis, A., 1991. Chronic colitis to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet. Pathol.* 28, 342-343.
- Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J.A., Domingo, M., 1988a. Skin-lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 29, 381-388.
- Ferrer, L., Rabanal, R.M., Domingo, M., 1988b. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res. Vet. Sc.* 44, 194-196.
- Ferrer, L.M., 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. In: *Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, Spain, 6-10.
- Genaro, O., Mayrink, W., Michalick, M.S.M., Dias, M., Da Costa, C.A., Melo, M.N., 1988. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83, 43.
- Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C.M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Reis, A.B., 2006. Relationship between Canine Leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* 135, 100-107.

- Iniesta, L., Fernández-Barreto, B., Bulle, S., Gómez, M.T., Piarroux, M., Gállego, M., Alunda, J.M., Potús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 1137-1141.
- Koutinas, A.F., Scott, D.W., Kantos, V., 1992. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Derm.* 3, 121-130.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K.G., 1999. Clinical Considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376-383.
- Laison, P., 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 321, 389-403.
- Machado, R.Z., Montassier, H.J., Pinto, A.A., Lemos, E.G., Machado, M.R.F., Valadão, I.F.F., Barci, L.G., Malheiros, E.B., 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.* 71, 17-26.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine control. 1. Evolutions of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566-567.
- Moreira, M.A.B., Luvizotto, M.C.R., Garcia, J.F., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D., 2007. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.* 145, 245-252.
- Oliveira, T.M.F.de S., Furuta, P.I., Carvalho, D. de, Machado, R.Z., 2008. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 17, 1, 7-11.
- Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L., Fondati, A., 2005. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. Infection in dogs with specific cellular immune response. *Vet. Dermatol.* 16, 187.
- Papadogiannakis, E.I., Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., 2005. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 227-237.
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., França-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R., 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *R. Vet. Sc.* 81, 68-75.
- Rodríguez-Cortés, A., Fernández-Bellón, H., Ramis, A., Ferrer, L., Alberola, J., Solano-Gallego, L., 2007. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 190-198.
- Santos, W.L.C., Badaró, J.D.R., Freitas, L.A.R. de, 2004. Association between skin parasitism and granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 92, 89-94.

- Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Olivry, T., Dunston, S.M., Farmaki, R., Koutinas, C.K., Petanides, T., 2007. J. Compilation-ESVD and ACVD. 18, 227-233.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *leishmania infantum*-infected dogs. J. Comp. Pathol. 130, 130-137.
- Tafuri, W.L., Oliveira, M.R de, Melo, M.N., Tafuri, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet. Parasitol. 96, 203-212.
- Tafuri, Wg.L, Santos, R.L., Arantes, R.M.E., Gonçalves, R., Melo, M.N., Michalik, M.S.M., 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J. Imm. Meth. 292, 17-23.
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., 1980. Enzyme immunoassorbent assay. In: Rose, N.R., Friedman, H. (Eds.), Manual of Clinical Immunology. second ed. American Society for Microbiology, Washington, pp. 359-371.
- Xavier, S.C., Andrade, H.M. de, Monte, S.J.H., Chiarelli, I.M., Lima, W.G., Michalick, M.S.M., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Vet. Res. 2, 17-23.

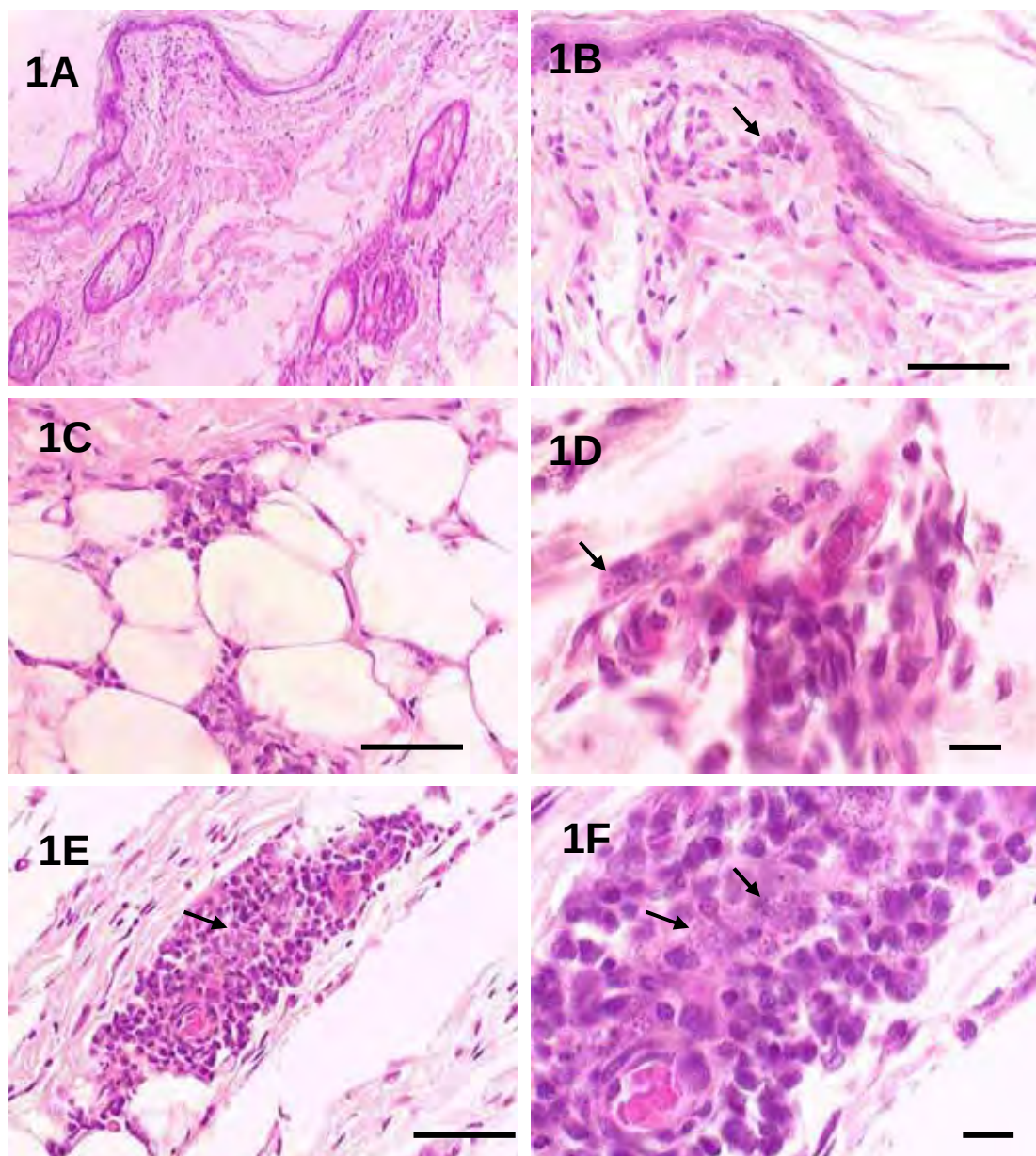


Fig. 1: Fotomicrografias de secções de pele de focinho de cães assintomáticos (cão nº 12) que não possuíam lesões macroscópicas. (1A) Moderada dermatite pervascular e perifolicular na derme superior e profunda. (1B) Ampliação da Fig. 2^a, mostrando muitos macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* logo abaixo da epiderme. (1C) Moderada reação inflamatória na hipoderme, mas infectada com parasitas nos macrófagos ao redor dos vasos linfáticos e sanguíneos (1D). Nas Figs. 1E e 1F, é possível ver uma reação inflamatória nodular entre as fibras musculares abaixo da hipoderme com predominância de células mononucleares, especialmente macrófagos e poucos linfócitos e células do plasma. Muitas células infectadas por *Leishmania* no centro do nódulo e ao redor de vasos sanguíneos (1F). Bar = 100 µm (1A); 50 µm (1B, 1C e 1E); 10 µm (1D e 1F) podem ser vistos. Coloração HE.

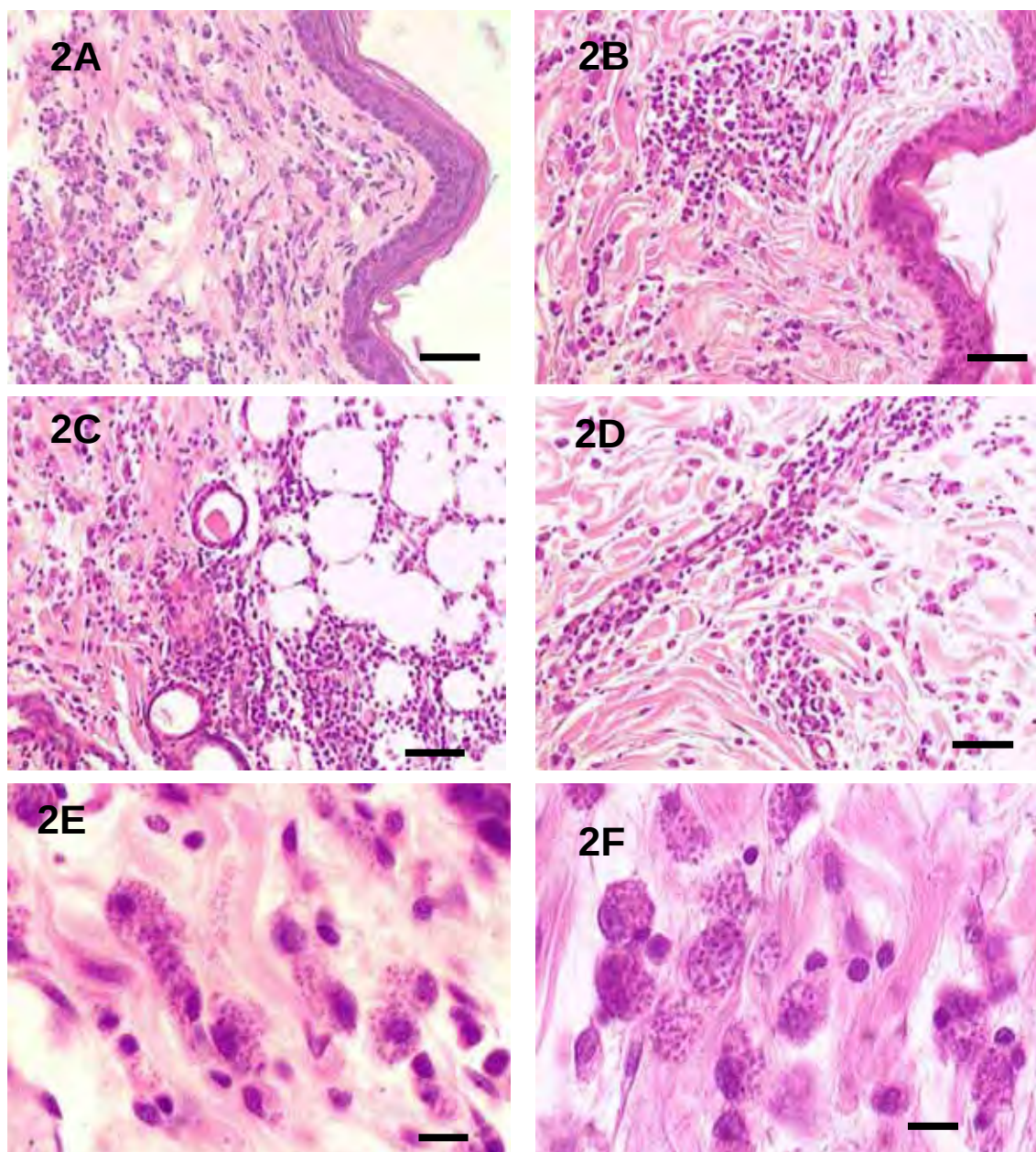


Fig. 2: Fotomicrografias de secções de pele com lesão de um cão sintomático (cão nº 30) que apresentava intensa carga parasitária. Dermatite mononuclear difusa (2A) e nodular (2B) mostrando um alto número de células inflamatórias mononucleares, com predominância de macrófagos na região superior e média da derme com grande quantidade de amastigotas. (2C) Dermatite perivascular na região média da derme e reação inflamatória intensa na derme profunda e hipoderme (2D). Alta ampliação das secções na 2E e 2F mostrando predominância de amastigotas de *Leishmania* intramacrofágicas. Bars = 50 μ m (2A, 2B, 2C e 2D) e 10 μ m (2E e 2F). Coloração HE.

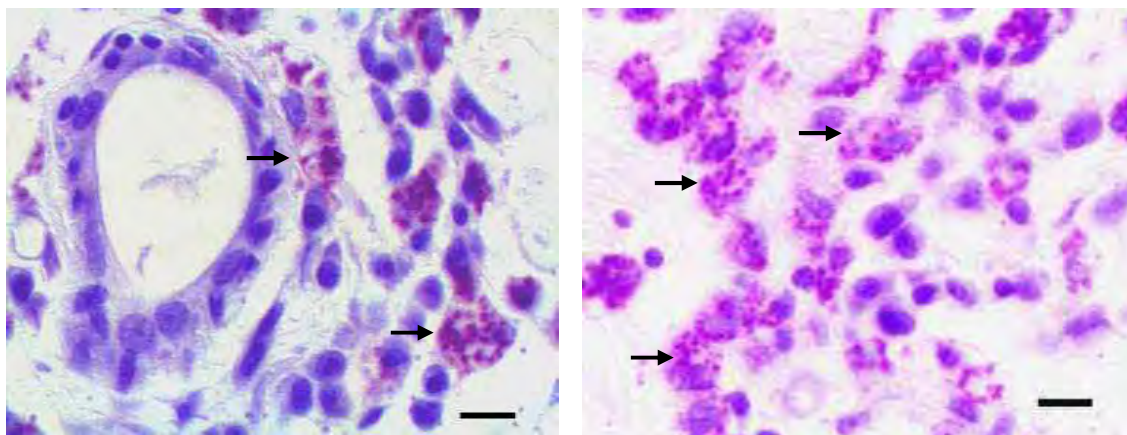


Fig. 3: Fotomicrografias de secções de pele com lesão de um cão sintomático com Leishmaniose Visceral mostrando amastigotas coradas por imunistoquímica em vermelho escuro (técnica utilizando o complexo Avidina-biotina peroxidase, contraste por hematoxilina) na região média da derme. Setas pretas mostram amastigotas dentro das células. Bars = 10 μ m.

Tabela 1: Números e porcentagens de cães com resultados negativos (N), suspeitos (Su) e positivos (P) para Leishmaniose Visceral após exame histoquímico (HE) em peles sadias e com lesão. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2007.

Número e porcentagem de cães				
Condições Clínicas	Pele sadia		Pele com lesão	
	Número de Cães	Porcentagem (%)	Número de Cães	Porcentagem (%)
Assintomáticos				
N	05	62,5	00	00,0
Su +	00	00,0	00	00,0
P ++ (moderado)	02	25,0	00	00,0
P +++ (média)	00	00,0	00	00,0
P ++++ (intensa)	01	12,5	00	00,0
Total	08	100,0	00	00,0
Oligossintomáticos				
N	12	70,5	02	14,3
Su +	02	11,8	09	64,3
P ++ (moderado)	01	05,9	02	14,3
P +++ (média)	01	05,9	01	07,1
P ++++ (intensa)	01	05,9	00	00,0
Total	17	100,0	14	100,0
Sintomáticos				
N	01	100,0	00	00,0
Su +	00	00,0	01	11,1
P ++ (moderado)	00	00,0	02	22,2
P +++ (média)	00	00,0	02	22,2
P ++++ (intensa)	00	00,0	04	44,5
Total	01	100,0	09	100,0

Tabela 2: Números e porcentagens de cães com resultados negativos e positivos para Leishmaniose Visceral após exame imunistoquímico (IMIQ) em peles sadias e com lesão. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2007.

Condições Clínicas	Número e porcentagem de cães			
	Pele sadia		Pele com lesão	
	Número de Cães	Porcentagem (%)	Número de Cães	Porcentagem (%)
Assintomáticos				
Negativo	04	50,0	00	00,0
Positivo	04	50,0	00	00,0
Total	08	100,0	00	00,0
Oligossintomáticos				
Negativo	12	70,6	09	64,3
Positivo	05	29,4	05	35,7
Total	17	100,0	14	100,0
Sintomáticos				
Negativo	01	100,0	01	11,1
Positivo	00	00,0	08	88,9
Total	01	100,0	09	100,0

Tabela 3: Resultados dos testes sorológicos (ELISA e RIFI), histoquímica (HE) e imunoistoquímica (IMIQ) de pele de cães assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e sintomáticos (S) para Leishmaniose Visceral. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2007.

Número de Cães	Condições Clínicas	Sorologia		HE ***		IMIQ	
		ELISA*	RIFI**	Pele Sadia	Pele com Lesão	Pele Sadia	Pele com Lesão
01	A	N	N	++	NT	P	NT
02	A	N	N	N	NT	N	NT
04	A	N	N	N	Su +	N	N
13	A	N	N	N	N	N	N
18	A	N	N	++	NT	P	NT
19	A	NE-4	1/1.280	++++	NT	P	NT
20	A	N	N	N	NT	P	NT
22	A	N	N	N	NT	N	NT
03	O	EL-4	1/2.500	N	++	N	P
05	O	N	1/160	N	Su +	P	P
06	O	EL-4	N	N	Su +	N	N
07	O	EL-5	1/1.280	N	Su +	N	N
08	O	EL-6	1/1.280	++	+++	P	P
09	O	EL-3	N	Su +	Su +	N	N
10	O	EL-4	1/640	N	Su +	N	N
11	O	N	N	N	N	N	N
12	O	EL-6	1/1.280	++++	NT	P	NT
14	O	N	N	N	N	N	N
15	O	EL-4	1/320	N	Su +	P	N
16	O	EL-6	1/1.280	+++	++	P	P
17	O	EL-5	1/1.280	N	Su +	N	P
21	O	EL-4	N	N	NT	N	NT
23	O	EL-3	N	Su +	NT	N	NT
33	O	N	1/320	N	Su +	N	N
34	O	EL-5	1/640	NR	Su +	N	N
24	S	EL-6	1/1.280	NT	++++	NT	P
25	S	EL-6	1/1.280	NT	++++	NT	P
26	S	EL-5	1/1.280	N	++++	N	P
27	S	EL-5	1/1.280	NT	++	NT	P
28	S	N	N	NT	Su +	NT	N
29	S	EL-6	1/1.280	NT	+++	NT	P
30	S	EL-4	1/2560	NT	++++	NT	P
31	S	EL-6	N	NT	+++	NT	P
32	S	EL-5	1/1.280	NT	++	NT	P

* ELISA ponto de corte: EL $\geq$ 3; ** RIFI ponto de corte $\geq$ 1:80; EL = níveis de ELISA; NT: Não testados. *** Carga parasitária; N = Negativo; P = Positivo; Su = Suspeito.

Tabela 4: Número e porcentagens de cães positivos pelos testes sorológicos (RIFI e ELISA), histoquímica (HE) e imunoistoquímica (IMIQ) em amostras de peles sadias e com lesão de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2007.

Condições Clínicas	Número e porcentagem de cães positivos			
	RIFI N (%)	ELISA N (%)	HE N (%)	IMIQ N (%)
Assintomáticos (n = 8)	1 (12.5)	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50.0)
Oligossintomáticos (n = 17)	11 (64.7)	13 (76.5)	4 (23.5)	7 (41.2)
Sintomáticos (n = 9)	7 (77.8)	8 (88.8)	8 (88.8)	8 (88.8)
Total (n = 34)	19 (55.9)	22 (64.7)	15 (44.1)	19 (55.9)

Table 5: Concordância entre as técnicas IMIQ, HE, RIFI e ELISA de acordo com os diferentes grupos de sinais clínicos dos cães examinados. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2007.

Condições Clínicas	Métodos Diagnósticos			
	IMIQ x RIFI N (%)	IMIQ x ELISA N (%)	IMIQ x HE N (%)	ELISA x RIFI N (%)
Cães (n = 34)				
Concordância	24 (77.2)	23 (67.7)	30 (88.2)	27 (79.4)
Índice Kappa	0.52	0.32	0.72	0.55
IC 95%				
Assintomáticos (n = 8)				
Concordância	5 (62.5)	5 (62.5)	7 (87.5)	8 (100%)
Índice Kappa	0.25	0.25	0.75	1.00
IC 95%				
Oligossintomáticos (n = 17)				
Concordância	13 (76.4)	9 (52.9)	14 (82.3)	9 (52.9)
Índice Kappa	0.55	0.14	0.61	0.16
IC 95%				
Sintomáticos (n = 9)				
Concordância	8 (88.9)	9 (100)	9 (100)	8 (88.9)
Índice Kappa	0.60	1.00	1.00	0.60
IC 95%				