



DIAGNÓSTICO DE LEISHIMANIOSE: DESVENDANDO OS SEGREDOS DE UMA DOENÇA COMPLEXA

Laura Nunes
Thiago Luiz Pereira Marques
Carine Cristine da Costa Ribeiro Ramos
Pietra Bárcia Alves Rechuem
Erica Cristina Rocha Roier
Ana Carolina Roma do Carmo

Universidade de Vassouras – UNIVASSOURAS
Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária

DIAGNÓSTICO DE LEISHIMANIOSE:
DESVENDANDO OS SEGREDOS DE UMA DOENÇA COMPLEXA

Autores:

Laura Nunes

Thiago Luiz Pereira Marques

Carine Cristine da Costa Ribeiro Ramos

Pietra Bárcia Alves Rechuem

Erica Cristina Rocha Roier

Ana Carolina Roma do Carmo

Vassouras
2024

© 2024 Presidente da Fundação Educacional Severino Sombra (FUSVE)
Adm. Gustavo de Oliveira Amaral

Reitor
Prof. Dr. Marco Antônio Soares de Souza

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação
Prof. Dr. Carlos Eduardo Cardoso

Coordenadora do Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária
Profa. Dra. Erica Cristina Rocha Roier

Editora-Chefe das Revistas Online da Universidade de Vassouras
Profa. Lígia Marcondes Rodrigues dos Santos

Editora Executiva Produções Técnicas da Universidade de Vassouras
Profa. Dra. Paloma Martins Mendonça

Modo de acesso:<https://editora.univassouras.edu.br/index.php/PT/article/view/4537>

D5408

Diagnóstico de *Leishmaniose*: desvendando os segredos de uma doença complexa. / Organizado por: Laura Nunes, Thiago Luiz Pereira Nunes, Carine Cristine da Costa Ribeiro Ramos... [et al.]. – Vassouras, RJ : Universidade de Vassouras, 2024.
50 f.; il.

Recurso eletrônico
Formato: E-book

ISBN: 978-65-87918-92-1

1. Leishmaniose. 2. Zoonoses. .I. Nunes, Laura. II. Nunes, Thiago Luiz Pereira. III. Ramos, Cristine da Costa Ribeiro. IV. Universidade de Vassouras. I. Título.

Sistema Gerador de Ficha Catalográfica Oline – Universidade de Vassouras

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. O texto é de responsabilidade de seus autores. As informações nele contidas, bem como as opiniões emitidas, não representam pontos de vista da Universidade de Vassouras.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	3
HISTÓRICO	5
ETIOLOGIA	7
AGENTE ETIOLÓGICO.....	8
AGENTE TRANSMISSOR	10
SINAIS CLÍNICOS.....	12
FISIOPATOLOGIA.....	17
Forma cutânea	18
Forma mucocutânea	20
Forma visceral	22
DIAGNÓSTICO	24
Achados clínico-patológicos.....	24
Métodos indiretos.....	26
Sorologia.....	26
Imunofluorescência indireta	28
DPP	28
ELISA.....	29
Métodos diretos.....	30
Parasitológico.....	30
Cultura.....	32
PCR	32
Imunossensores piézoelétricos.....	38
PREVENÇÃO	39
TRATAMENTO.....	41
REFERÊNCIAS	44

APRESENTAÇÃO

Caro leitor,

Bem-vindo ao e-book "Diagnóstico da Leishmaniose: desvendando os segredos de uma doença complexa". Neste guia abrangente, iremos explorar a fundo o diagnóstico dessa doença parasitária que tem afetado milhões de pessoas em todo o mundo. Ao longo das próximas páginas, você encontrará informações valiosas sobre o histórico da doença, sua etiologia, agentes causadores e transmissores, fisiopatologia das formas tegumentar (cutânea e mucocutânea) e visceral, técnicas de diagnóstico e diagnóstico diferencial, além de abordarmos a prevenção e os tratamentos disponíveis.

A leishmaniose é uma enfermidade que possui um longo histórico de ocorrência e impacto na saúde pública. Seus primeiros relatos datam de mais de um século atrás, e desde então, sua disseminação tem sido motivo de preocupação em diversos países, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. No entanto, o conhecimento sobre a doença e suas características evoluiu consideravelmente ao longo do tempo, resultando em avanços significativos no diagnóstico e tratamento.

A etiologia da leishmaniose é atribuída aos parasitas do gênero *Leishmania*, organismos microscópicos que infectam humanos e outros animais. Diferentes espécies de *Leishmania* são responsáveis por diferentes formas da doença, que podem variar de lesões cutâneas localizadas a quadros sistêmicos graves. Além disso, os vetores transmissores, como flebotomíneos (também conhecidos como mosquitos-palha), desempenham um papel crucial na propagação do parasita, tornando o controle da doença ainda mais desafiador.

Ao entendermos a fisiopatologia das formas tegumentar e visceral da leishmaniose, podemos compreender como essas doenças se desenvolvem e manifestam nos pacientes. As lesões cutâneas e mucocutâneas podem apresentar-se de diferentes maneiras, enquanto a forma visceral pode afetar órgãos internos, como o fígado, baço e medula óssea. Compreender os mecanismos por trás dessas manifestações clínicas é fundamental para um diagnóstico e tratamento precisos.

Neste e-book, também discutiremos as técnicas de diagnóstico utilizadas para identificar a presença do parasita no organismo. Desde exames laboratoriais tradicionais, como a pesquisa direta do parasita em amostras de tecidos, até métodos mais avançados, como testes sorológicos e moleculares, examinaremos suas vantagens, limitações e aplicabilidade em diferentes contextos clínicos. Além disso, abordaremos o diagnóstico diferencial, destacando outras doenças que podem apresentar sintomas semelhantes à leishmaniose e que requerem uma abordagem diferenciada.

Por fim, enfocaremos a importância da prevenção e do tratamento adequado para combater a leishmaniose. Discutiremos estratégias de controle vetorial, medidas de proteção individual e comunitária, bem como os protocolos terapêuticos mais utilizados para combater a infecção pelo parasita.

Este e-book foi elaborado com o intuito de fornecer informações abrangentes sobre o diagnóstico da leishmaniose. Esperamos que você encontre neste guia uma fonte confiável de conhecimento, que o auxilie na compreensão dessa doença complexa e na busca por soluções eficazes no combate à leishmaniose.

Boa leitura!

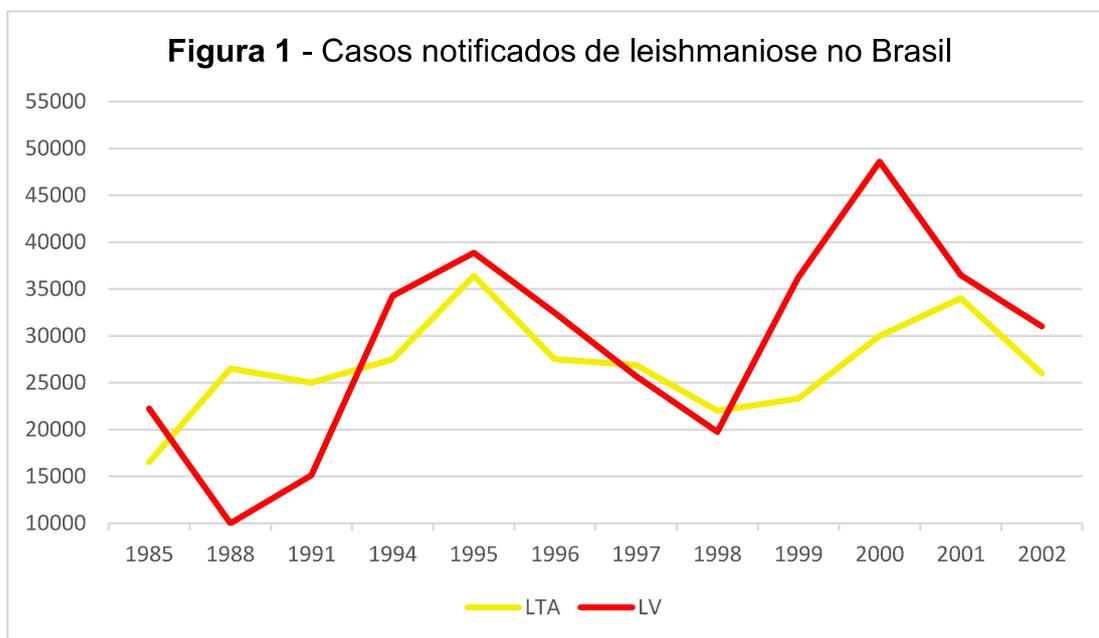
HISTÓRICO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causada por protozoários transmitidos por alguns vetores alados. Estas são comuns principalmente em países subdesenvolvidos e entre a classe mais carente. Na última década a leishmaniose ocuparam a nona posição no ranking mundial das doenças infecciosas prioritárias e a segunda doença parasitária que mais mata, ficando atrás somente da malária (PANTALEÃO et al., 2019). Segundo Moreno (2019) e Soares Leote (2018), a condição ocorre pela infecção por um dos mais de vinte espécies do gênero *leishmania*. No Velho Mundo o parasita é transmitido por vetores do gênero *Phlebotomus*, já no Novo Mundo membros do gênero *Lutzomyia* assumem esse papel, entretanto, atualmente mais de noventa espécies de vetores participam da transmissão. Dentre estes, inclui-se até mesmo o ***Triatoma infestans***, ou “barbeiro” como é conhecido, responsável também pela transmissão de tripanossomíase.

O termo "leishmaniose" foi cunhado a partir do sobrenome de um dos responsáveis pela descoberta dos protozoários que a causam. Conforme NEVES (1998), no final do século XIX, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna identificaram independentemente os parasitas que causam as Leishmanioses. Ronald Ross, por sua vez, deu o nome genérico de *Leishmania* a cada um desses parasitas. Contudo, as leishmanioses nem sempre assim foram conhecidas. Historicamente, as lesões recebiam o nome das regiões onde elas ocorriam como, ferida de Balkh (norte do Afeganistão), botão de Aleppo (na Síria), botão de Bagdá (Iraque), e botão-do-orientes, no primeiro século d.C., na Ásia Central.

No cenário nacional de 1908, os primeiros casos em de leishmaniose foram relatados. Tratava-se da forma tegumentar humana. De acordo com Yoshida (1990), a infecção foi denominada Úlcera de Bauru devido ao elevado número de ocorrências entre os funcionários envolvidos na construção da estrada de ferro Noroeste do Brasil, localizada em São Paulo. Benchimol (2019) relata que a forma tegumentar foi considerada a principal forma de afecção por vinte e seis anos desde o diagnóstico dos primeiros casos. Somente em 1934, ao examinar amostras de viscerotomia post-mortem em casos suspeitos de óbito por Febre Amarela, o patologista Henrique Penna encontrou a forma amastigota em fragmentos hepáticos. Desta forma, 41 casos foram subitamente relacionados à leishmaniose visceral. Essa forma da doença permaneceu subdiagnosticada e foi considerada ausente até então. Em 1957, foi comprovada a

participação dos animais silvestres como reservatórios da LTA, quando se demonstrou pela primeira vez a presença da infecção em roedores silvestres no Panamá (HERTIG et al., 1957; VERONESI e FOCACCIA, 1996; NEVES, 1998). Inicialmente, a configuração visceral apresentava um caráter predominantemente rural e, até a década de 90, aproximadamente noventa por cento dos casos notificados ocorriam na região do Nordeste. Todavia, Machado (2012) nos conta que no final do século XX, o processo de urbanização desordenada, em que as áreas urbanas expandiram em direção a regiões rurais, provocou novas interações entre seres humanos, ambiente e processos biológicos, resultando em uma modificação do perfil epidemiológico do país. O desmatamento e a presença de vetores sinantrópicos da leishmaniose contribuíram para a incidência da LV em regiões periurbanas e periferias dos grandes centros urbanos. Desde então, constatou-se um crescimento exponencial no registro de casos de ambas as formas da doença, sobremaneira a visceral. Segundo o Ministério da Saúde, em duas décadas de notificação a LTA chegou a 37.710 casos, e a LV a 48.455 (Figura 1). Dos casos totais de LV, 66% foram registrados na Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (LEOTE, 2018).



Fonte: Adaptado de COVEV/CGDT/DEVEP/SVS/MS

Conforme observado, em particular, a forma visceral da doença tem se expandido por todo o país, sendo que de 2000 a 2011, foram notificados mais de 40.000 novos casos (SOARES LEOTE, 2018). De acordo com o CRMV-MG (2012), a LV atualmente já está presente em 21 das 27 Unidades da Federação, afetando

aproximadamente 1.600 municípios com transmissão autóctone. Belo Horizonte é uma região que vem apresentando casos humanos tanto de leishmaniose visceral quanto de tegumentar há mais de 10 anos, bem como a presença de flebotomíneos vetores, o que demonstra a ocorrência de transmissão ativa da infecção. Na região, a taxa de mortalidade da forma visceral é de aproximadamente 100 casos anuais. Conforme Soares Leote (2018), no âmbito global, mais de 90% dos casos de LV ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil, sendo o terceiro maior foco mundial. Ainda, 90% dos casos de LVA ocorrem no Brasil.

Por muito tempo, a atenção esteve direcionada exclusivamente para a leishmaniose em humanos, resultando no sacrifício em massa de cães, vistos apenas como reservatórios naturais. Nos dias atuais, ainda há menos informações e estudos disponíveis acerca da forma canina da doença, em comparação com a doença humana.

É importante frisar que, das quatro vacinas disponíveis comercialmente em todo o mundo, somente uma tem autorização do MAPA para ser fabricada e vendida no Brasil, a LeishTec® (produzida pela Hertape-Calier, em parceria com a UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais) (SILVA, 2015).

ETIOLOGIA

A etiologia da Leishmaniose envolve a interação entre o parasita, o vetor e o hospedeiro. Fatores como a urbanização, clima propício, falta de saneamento, convivência de cães com outro cão e/ou animais silvestres, tem contribuído para a maior incidência, uma vez que há o aumento da densidade populacional de flebotomos.

A expansão urbana está diretamente ligada ao aumento de casos de leishmaniose, à medida que áreas rurais são transformadas em urbanas, ocorre a migração dos flebotomíneos. Apesar destes terem sua origem silvestre, habitantes de florestas primárias, estudos demonstram uma grande concentração dessas espécies em regiões periurbanas e urbanas (SOARES LEOTE, 2018).

O Vários fatores climáticos influenciam a variação do número de indivíduos de uma população de insetos e, para flebotomíneos, parece haver uma relação direta

entre a umidade do ambiente e o número de formas aladas que emergem. Portanto, o conhecimento da sazonalidade, quando comparada às características ambientais, permite a compreensão melhor da oscilação da população, contribuindo para a racionalização das atividades de vigilância e intervenção sobre o processo saúde-doença, visando garantir a efetividade e equidade nas ações de controle. (ALVES DE LIMA, 2019).

A presença de animais silvestres em áreas próximas a residências humanas pode aumentar a exposição dos cães e dos humanos aos vetores infectados, já que podem ser reservatórios, aumentando o risco de transmissão da leishmaniose.

Além desses fatores, migração, destruição ambiental, condições precárias de saneamento, desnutrição, são também alguns dos fatores sociais e ambientais associados a transmissão da leishmaniose visceral (ALVES DE LIMA, 2019).

AGENTE ETIOLÓGICO

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que é transmitido por picadas de mosquitos infectados com o parasita. Na América do Sul, acredita-se que existam cerca de 20 espécies de *leishmania*, sendo o Brasil o país com maior número dessas espécies, fato que pode ter correlação com a área geográfica ocupada por ele, além dos diferentes climas encontrados pelo território nacional. Estas espécies de *leishmania* podem parasitar cerca de 26 espécies diferentes de hospedeiros, inclusive o homem (SUNTER E GULL, 2017). Nas Américas, a *Leishmania chagasi* é a espécie comumente envolvida na transmissão da leishmaniose visceral e há sete espécies de leishmanias envolvidas na ocorrência de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil; as mais importantes são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

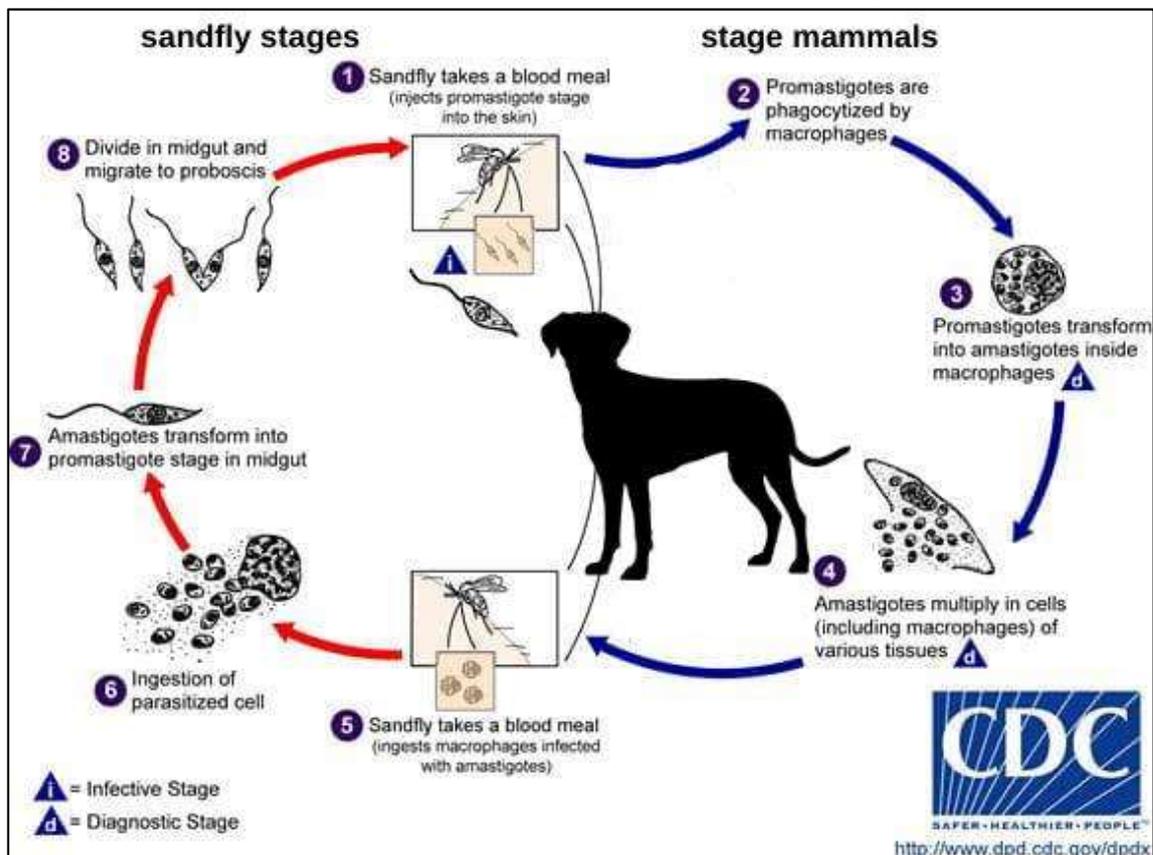
As leishmanias possuem em sua superfície, uma grande variedade de moléculas que são capazes de interagir com o hospedeiro acometido. O ciclo de vida da *leishmania* é heteróxico, sendo necessários dois hospedeiros para que se complete, sendo um vertebrado (mamífero) e um invertebrado (mosquito-palha). Dentre as espécies de hospedeiros, destacam-se as espécies de flebotomíneos, fato que torna o

território brasileiro um potencial país para surtos da doença, visto que o clima favorece a multiplicação de diversas espécies desses flebotomíneos (SERAFIM et al., 2017).

No hospedeiro vertebrado, os parasitas assumem a forma amastigota (aflageladas), arredondada e imóvel (3-6 µm), que se multiplicam obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (especialmente macrófagos). À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos, posteriormente, acontece a migração para os tecidos (SERAFIM et al., 2017).

O ciclo de vida (Figura 2) começa no interior do mosquito, quando a leishmania é sugada durante o repasto do mosquito em um animal já infectado, sendo ingerida a forma amastigota. No intestino do hospedeiro invertebrado, a leishmania se diferencia rapidamente uma forma promastigota, pois está é capaz de resistir aos mecanismos de defesa naturais do hospedeiro. A forma promastigota irá se aderir ao epitélio intestinal do hospedeiro e se multiplicar, após a multiplicação, estas começam um fluxo migratório para o intestino anterior do parasito (RAMALHO E ORTIGÃO, 2010).

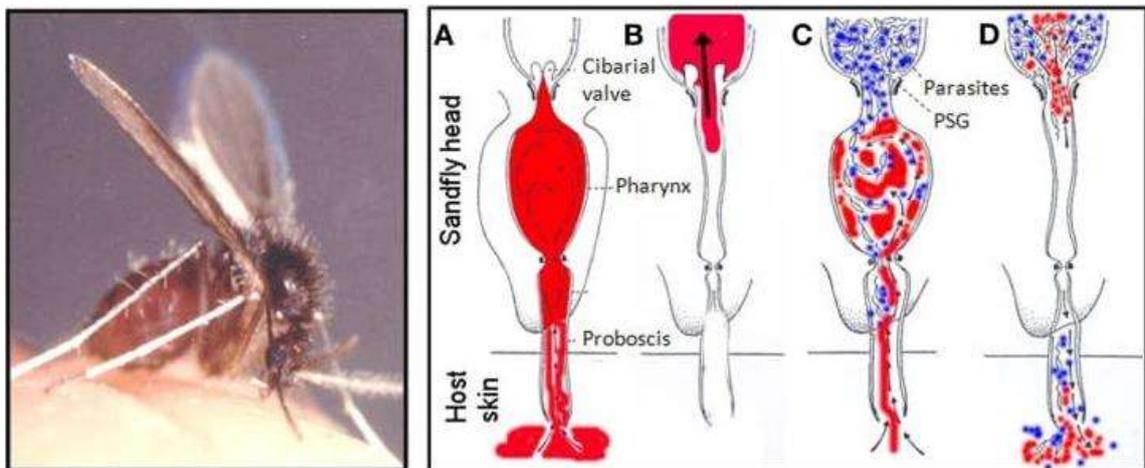
Figura 2 – Ciclo da leishmaniose no flebotomíneo e no hospedeiro vertebrado



Adaptado: Center for Disease Control and Prevention

Os mosquitos hematófagos possuem uma válvula que permite que o sangue não volte para o animal sugado durante o repasto, mas quando este flebotomíneo é infectado pelas leishmanias, estas secretam quitinases que degradam essa válvula, o que permite o refluxo de sangue para o animal parasitado e levando com este refluxo as formas de leishmanias que infectarão um novo hospedeiro vertebrado (Figura 3) (ROGERS, 2012).

Figura 3 – Repasto do flebotomíneo



Durante a alimentação, flebotomíneos não infectados (A, B) atraem sangue para a faringe, que é desviado para o intestino médio através da Válvula cibarial ou estomodeal onde é digerida. Em flebotomíneos altamente infectados (C, D) *Leishmania* parasitas se ligam à válvula e se multiplicam no intestino médio anterior. Ao mesmo tempo, os parasitas secretam proteofosfoglicano filamentoso (fPPG) que se condensa para formar o gel secretor promastigota (PSG – em azul) obstruindo o intestino médio e a faringe. O bloqueio do PSG força a abertura da válvula cibarial, permitindo que parasitas e gel alcancem a faringe e o intestino anterior, permitindo que o sangue se misture com o PSG quando é levado para a faringe (C). Uma vez que o PSG é altamente solúvel, quando o sangue é finalmente aspirado através da obstrução do gel do parasita, uma proporção de parasitas do intestino médio e PSG são regurgitados por refluxo na pele do hospedeiro vertebrado (D) (ROGERS, 2012).

AGENTE TRANSMISSOR

O vetor responsável pela manutenção do agente no ambiente são as fêmeas infectadas da família psychodidae, subfamília phlebotominae dos gêneros *phlebotomus* e *lutzomya*, sendo o gênero *lutzomya* o de maior importância na transmissão da

leishmaniose no Brasil e América do sul (MOREIRA, 2003). Acredita-se que mais de 90 espécies sejam capazes de transmitir a leishmania.

Os flebotomíneos são insetos pequenos que medem de dois a três milímetros de comprimento, e possuem um raio de voo para pastejo de aproximadamente 200 metros até 2km; apresentam um corpo de cor acastanhado e cobertos por filamentos de quitina; são popularmente conhecidos como mosquito-palha, birigui, corcudinhas ou asa-dura (TAYLLOR et al.,2017).

Esses insetos possuem um ciclo de vida holometábolo, ou seja, possuem um ciclo de metamorfose completo. Sendo que todo este ciclo acontece em meio terrestre, sua reprodução acontece em locais úmidos e ricos em matéria orgânica (WIJERATHNA E GUNATHILAKA, 2020). Geralmente, vivem em florestas úmidas e com baixa luminosidade. Em ambientes domésticos, multiplicam-se principalmente em abrigos para animais, galinheiros e outros locais ricos em matéria orgânica, uma temperatura mínima de 15°C é necessária para o desenvolvimento dos ovos e, sob condições ótimas, os ovos podem eclodir em 1 a 2 semanas, mas esse tempo pode ser mais longo em clima frio. No Brasil, esses vetores podem ser encontrados durante todo o ano, tendo uma predileção por épocas mais quentes como o verão (TAYLLOR et al., 2017). Apresentam hábitos crepusculares e somente as fêmeas se alimentam de sangue devido às suas necessidades proteicas necessárias à reprodução. Os machos dessas espécies possuem como principal diferencial uma genitália externa bem visível (WIJERATHNA e GUNATHILAKA, 2020).

Figura 4 – Fêmea de flebotomíneo realizando o repasto sanguíneo



Adaptado: Ministério da Saúde

SINAIS CLÍNICOS

O tipo de resposta imunológica (celular ou humoral), somada a outros fatores como a idade, nutrição, sexo, outras enfermidades associadas, fatores imunossupressivos, genética, presença de endo e ou ectoparasitas e a virulência do parasito (*Leishmania*) são determinantes na resistência ou vulnerabilidade á doença, como também ao grau de agressividade dos sinais clínicos (JERICÓ *et al.*, 2015). Na medida em que a infecção se estabelece, o parasito se prolifera e coloniza tanto órgãos linfoides quanto não linfoides, causando reações inflamatórias por todo o corpo do animal, caracterizando-se por lesões cutâneas, emagrecimento progressivo, aumento de volume dos órgãos linfoides, lesões oculares, atrofia muscular, hepatomegalia, dor nas articulações, mucosas hipocoradas e dificuldade para caminhar, sendo os três primeiros os sintomas mais comuns da doença (JERICÓ , 2015; SANTOS; ALESSI, 2016; MORAILLON *et al.*, 2013).

As lesões cutâneas podem se apresentar de diversas formas diante das reações que a infecção por *Leishmania spp.* causam no hospedeiro (CRMV-MG, 2012). Na maioria dos casos a doença se manifesta na forma de dermatite esfoliativa não pruriginosa, associada ou não com a queda dos pelos, que pode ocorrer por todo corpo ou localizada (ao redor dos olhos, orelhas e membros); na forma de inflamação ulcerativa, localizada principalmente no focinho, junções mucocutâneas, na margem interna do ouvido externo, proeminências ósseas e entre os dígitos; como também na forma de dermatite nodular generalizada; necrose isquêmica; despigmentação da pele e pelos e hiperqueratose (JERICÓ *et al.*, 2015; CRMV-MG, 2012).

A linfadenomegalia também é de grande importância clínica na Leishmaniose Visceral, pois é considerada por muitos autores como um dos principais sinais clínicos (CRMV-MG, 2012). Os linfonodos mais frequentemente afetados são os linfonodos cervicais, poplíteos e mesentéricos (CRMV-MG, 2012).

Outro sinal clínico muito associado à leishmaniose visceral com o patognomônico é o crescimento exacerbado das unhas, também chamado de onicogribose). Entretanto, somente cerca de 30% dos animais diagnosticados apresentam essa sintomatologia, que pode sim estar associada à ação do parasito na matriz ungueal, como também à diminuição da atividade do animal pela doença (SANTOS; ALESSI, 2016).

Figura 5 – Dermatite esfoliativa periocular



Fonte: Imagem do autor (2023)

Figura 6 – Dermatite ulcerativa no focinho



Fonte: Imagem do autor (2023)

Os olhos também são alvos comuns das reações causadas pela leishmaniose visceral. Durante a instalação da doença nos olhos, as primeiras estruturas prejudicadas são a úvea e a conjuntiva por serem mais vascularizadas (JERICÓ *et al.*, 2015). Quando os parasitos chegam à glândula lacrimal eles podem promover a compressão dos ductos secretores, diminuindo ou comprometendo a secreção da lágrima que lubrifica os olhos, em consequência disso, o animal desenvolve ceratoconjuntivite seca, que quando não tratada pode levar o animal a perder o olho comprometido (JERICÓ *et al.*, 2015).

Figura 7 – Uveíte



Fonte: Livro Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ *et al.*, 2015)

Figura 8 – Onicogrifose



Fonte: Livro Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ et al., 2015)

Figura 9 – Dermatite nodular multifocal



Fonte: Livro Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ et al., 2015)

Figura 10 – Atrofia muscular em músculos mastigatórios e temporais



Fonte: Livro Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ et al., 2015)

Figura 11 – Blefarite



Fonte: Livro Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ et al., 2015)

FISIOPATOLOGIA

A transmissão da leishmaniose ocorre geralmente, mas não somente, através da picada de mosquitos flebótomos que possuem a forma promastigota infeccioso não replicativo na sua cavidade oral (SANTOS; ALESSI, 2016). Quando inoculado no hospedeiro vertebrado a infecção inicia no local da picada provocando resposta inflamatória e imune, com a presença de formas parasitárias, linfócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, provocando subseqüentemente uma lesão nodular primária que pode ter até três centímetros de diâmetro (JERICÓ *et al.*, 2015).

Figura 12 – Lesão nodular primária em cão diagnosticado com *Leishmania*



Fonte: Imagem do autor (2023)

As formas promastigotas inoculadas são então fagocitadas por células dendríticas e macrófagos. Quando estiverem internalizadas nas células dendríticas, elas serão drenadas pelo sistema linfático até os linfonodos de drenagem, no qual as partículas antigênicas do parasito serão apresentadas para as células de defesa do organismo, que modularão uma resposta inflamatória para o local da picada, onde se encontram os parasitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os macrófagos, diferentemente das células dendríticas, irão fagocitar o parasito para que ele seja eliminado no seu interior (fagolisossoma), e para que o parasito obtenha sucesso na infecção ele precisa sobreviver ao ambiente com pH ácido do interior do macrófago (JERICÓ *et al.*, 2015). A fim de garantir sua sobrevivência, o parasito internalizado inibe a síntese de substâncias oxidativas, tais como o óxido nítrico e superóxido, porém estimulando a produção de citocinas, a morte do macrófago, e conseqüentemente a produção de células T (JERICÓ *et al.*, 2015). As células T se subdividem em duas linhagens, a Th1 e Th2, que promovem imunidade celular e humoral, respectivamente (JERICÓ *et al.*, 2015). Cães habitualmente desenvolvem leishmaniose visceral (NELSON *et al.*, 2015). Entretanto, a denominação “VISCERAL” não limita as manifestações clínicas da doença, podendo se manifestar na pele, nas mucosas e nas vísceras, sequencialmente ou ao mesmo tempo (SANTOS; ALESSI, 2016).

Por possuir uma característica replicativa no interior do macrófago, que ironicamente teria a função de destruir agentes invasores, nos indivíduos susceptíveis as formas amastigotas da *Leishmania spp.* acabam driblando seu sistema imune, possibilitando que elas se espalhem por todo o corpo do animal (TAYLOR *et al.*, 2017). Com o objetivo de esclarecer as modificações que o parasito proporciona no corpo do animal, dividimos a fisiopatologia da doença em 3 (três) formas: cutânea, mucocutânea e visceral.

Forma cutânea

Através da via hematogena, as formas amastigotas podem chegar a todos os compartimentos do corpo, e na pele do animal, sua presença aciona pela via exógena a resposta imunológica inata (CRMV-MG, 2012).

Como a pele é um local que possui maior chance de entrar em contato com microrganismos invasores, ela se torna um compartimento preparado com muitas células sentinelas (células responsáveis por reconhecer e responder a microrganismos invasores), como os macrófagos, células dendríticas e mastócitos (TIZARD, 2014). A morte das células promove a inflamação e a migração de leucócitos do sangue para o local da inflamação por diapedese, principalmente os neutrófilos.

A persistência da inflamação e da morte celular induz a produção de novas células de renovação tecidual e resposta imune específica (TIZARD, 2014).

Figura 13 – Forma amastigota da leishmaniose em esfregaço sanguíneo

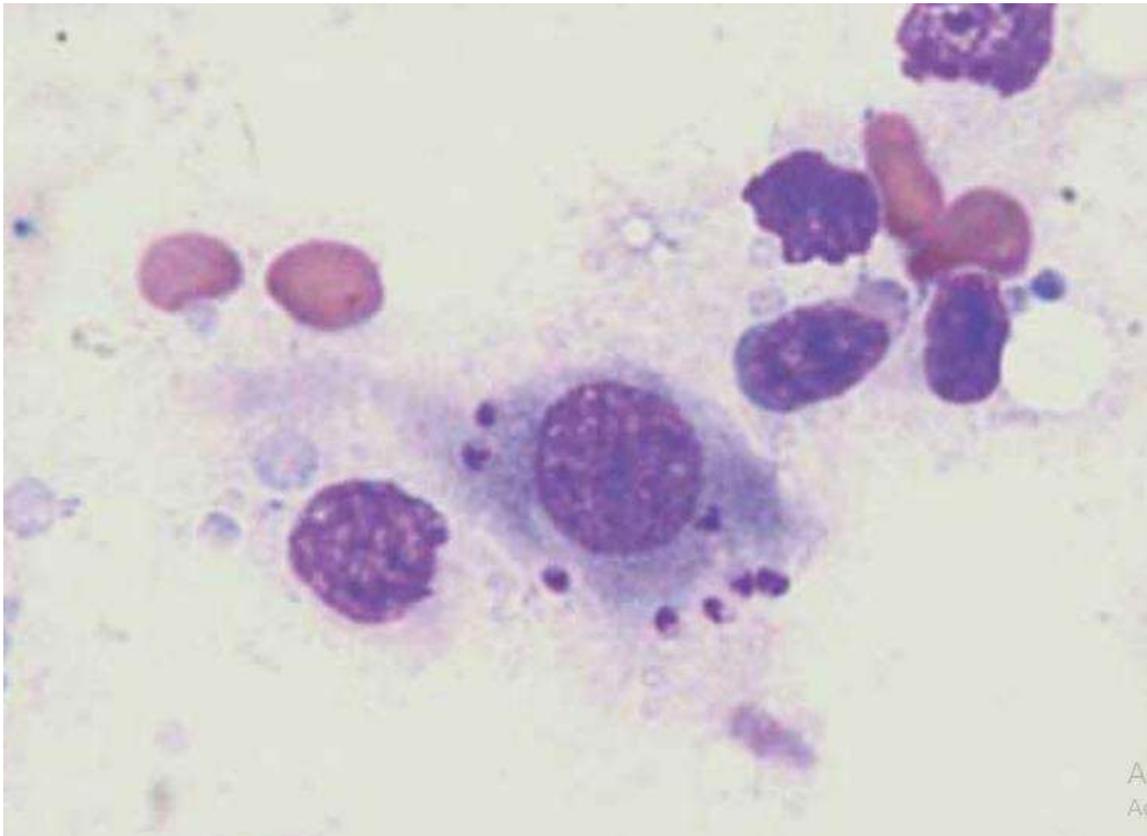


Fonte: Imagem de ANTUNES et al. (2016)

Microscopicamente, a presença de infiltrado inflamatório difuso em derme, com macrófagos repletos de formas amastigotas, linfócitos e plasmócitos são característicos da dermatite esfoliativa da leishmaniose (CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 2012). Quando esses mesmos componentes estão presentes ao redor de folículos pilosos o animal também pode apresentar alopecia e hiperqueratose (JERICÓ *et al.*, 2015). As dermatites ulcerativas, normalmente são fruto de reação inflamatória intensa, que diminui a carga parasitária no local da lesão, com elevada carga de células sentinelas, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. A migração de macrófagos repletos de formas amastigotas para regiões específicas da pele, como pontos de pressão articular justificam o aparecimento de úlceras (CRMV-MG, 2012).

A resposta imunológica, quando não é modulada de forma correta para combater os parasitos ou quando o animal apresenta uma deficiência na resposta imune, normalmente ela é caracterizada pelo acúmulo desordenado de várias células de defesa, principalmente os macrófagos, no local da infecção, provocando macroscopicamente as lesões nodulares que podem variar de milímetros até 10 centímetros de diâmetro (CRMV-MG, 2012).

Figura 14 – Macrófago com formas amastigotas da leishmaniose em esfregaço



Fonte: Livro Patologia Veterinária (SANTOS; ALESSI, 2016)

Forma mucocutânea

As alterações mucocutâneas normalmente ocorrem como consequência secundária da resposta imune em outros focos de infecção, como ocorre na pele e nas vísceras. A produção exacerbada de imunocomplexos pode provocar em todo o corpo do animal a vasculite, rompimento de vasos e necroses focais. Na mucosa nasal, o rompimento de vasos sanguíneos pela presença de imunocomplexos circulantes provoca o quadro de sangramento nasal (epistaxe) (CRMV-MG, 2012).

Figura 15 – Epistaxe em cão



Fonte: Livro Semiologia Veterinária (FEITOSA, 2020)

Figura 16 – Ulcera em cavidade oral de cão, causada pelo quadro de azotemia



Fonte: Livro Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos (JERICÓ et al., 2015)

Como consequência das alterações renais, temos a insuficiência renal crônica, que aumenta as concentrações de ureia e creatinina sérica (azotemia). Nas mucosas a ureia pode causar alterações agressivas como ulceração e necrose, principalmente da mucosa oral (JERICÓ *et al.*, 2015).

Forma visceral

Semelhantemente a forma cutânea, as vísceras também serão infectadas através da via hematogênica. O baço é um dos principais órgãos afetados e a proliferação do parasita provoca desorganização da sua estrutura celular (JERICÓ *et al.*, 2015). A presença do parasita no órgão forma granulomas, compostos por neutrófilos e linfócitos, além de hiperplasia de polpa branca pelo intenso parasitismo das células macrofágicas e congestão da polpa vermelha, com dilatação dos vasos, que podem se justificar pela presença de imunocomplexos circulantes, autoantígenos e pela resposta perivascular (CRMV-MG, 2012).

Os imunocomplexos e autoantígenos são responsáveis pela característica mais patogênica da doença, pois eles são capazes de induzir respostas inflamatórias degenerativas e necróticas por todo o corpo do animal (JERICÓ *et al.*, 2015).

Figura 17 – Baço de cão apresentando espessamento capsular com presença de tecido fibroso



Fonte: Livro Patologia Veterinária (SANTOS; ALESSI, 2016)

No fígado, a resposta mediante a presença do parasito se comporta da mesma forma que no baço, ou seja, formando granulomas que podem ser encontradas no parênquima e nos espaços portais (CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, 2012). A multiplicação das formas amastigotas no interior das células de Kupffer pode causar hepatomegalia e conseqüentemente apresentar quadro de vômito, icterícia e perda de peso (JERICÓ *et al.*, 2015).

A fisiopatologia renal está diretamente relacionada com os imunocomplexos circulantes, principalmente IgG e IgM, e da ativação do sistema do complemento, que é um mecanismo de resposta tanto inata, quanto específica (JERICÓ *et al.*, 2015; TIZARD, 2014). A deposição crônica das imunoglobulinas e das proteínas do sistema do complemento na membrana basal do glomérulo provoca lesão renal crônica e por fim, falência renal, que é a principal causa de morte das infecções por leishmaniose visceral (JERICÓ *et al.*, 2015).

Figura 18 – Glomerulonefrite imunomediada em cão causada por *Leishmania*



Fonte: Livro Patologia Veterinária (SANTOS; ALESSI, 2016)

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LVC tem sido desafiador para muitos médicos-veterinários e profissionais da saúde pública, em virtude de muitos animais se apresentarem assintomáticos ou com grande variabilidade de manifestações clínicas, que, muitas vezes mimetizam outras enfermidades, e também pela dificuldade em se obter uma prova diagnóstica com 100% de sensibilidade e especificidade. Assim, o diagnóstico deve seguir etapas sucessivas com base nos seguintes critérios:

- Epidemiológico: procedência, faixa etária, presença do vetor e de animais infectados na região de origem;
- Clínico: pesquisa de sinais sugestivos da enfermidade, como hepatomegalia e/ou esplenomegalia, linfadenomegalia, onicogrifose;
- Laboratorial: provas específicas, além de achados sugestivos no hemograma e na eletroforese de proteínas.

Achados clínico-patológicos

A leishmaniose canina é uma doença crônica sistêmica que tem o potencial de afetar qualquer órgão, tecido e fluido biológico. Ela se manifesta por meio de uma variedade de sinais clínicos. “As principais anomalias clínico-patológicas são hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, proteinúria, aumento da atividade das enzimas hepáticas, anemia, trombocitopenia, azotemia, linfopenia e leucocitose com desvio à esquerda.”

Segundo GREENE, C. E. 2015, a tabela apresenta um resumo dos achados clínico-patológicos de três estudos de série de casos de grande porte sobre a leishmaniose canina. Os achados bioquímicos mais consistentes no soro de cães com leishmaniose clínica baseiam-se em hiperproteinemia com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, em consequência da proporção albumina/globulina diminuída. A hiperglobulinemia beta e a hipergamaglobulinemia policlonais em cães de regiões endêmicas com *L. infantum*, sem causa aparente, ou em cães que viajaram para essas áreas devem ser investigadas como possível indicação de leishmaniose. As proteínas de fase aguda estão elevadas no soro de cães enfermos. Frequentemente ocorre elevação discreta da atividade das enzimas hepáticas; entretanto, a elevação pronunciada da atividade das enzimas hepáticas, a azotemia grave ou ambas são encontradas apenas na minoria de cães com leishmaniose. Verificam-se proteinúria e algumas

anormalidades renais na maioria dos cães com essa doença, e a doença renal subsequente causada por glomerulonefrite por imunocomplexos acaba se desenvolvendo em cães com disfunção renal patológica progressiva. A proporção proteína/creatinina urinária e a enzimúria foram propostas como testes para avaliar a lesão renal em animais acometidos.

Figura 19 - Percentual de cães com alterações fisiológicas

Anormalidade	Porcentagem de cães
Hiperproteinemia	63,3 a 72,8 ^{69,193}
Hiperglobulinemia	76 a 100 ^{69,370}
Hipoalbuminemia	68 a 94 ^{69,370}
Diminuição da proporção albumina/globulina	76 ⁶⁹
Azotemia	16 a 45 ^{69,370}
Atividade aumentada da fosfatase alcalina sérica	16 a 51 ^{69,370}
Atividade aumentada da alanina aminotransferase	16 a 61 ^{69,370}
Proteinúria	71,5 a 85 ^{193,370}
Anemia	60 a 73,4 ^{193,370}
Leucocitose	24 ⁶⁹
Leucopenia	22 ³⁷⁰
Trombocitopenia	29,3 a 50 ^{69,370}
Resultado positivo para anticorpo antinuclear	31 a 53 ^{69,370}
Teste de Coombs positivo	21 a 84 ^{69,370}

Com frequência, observa-se anemia arregenerativa leve a moderada. A leucocitose discreta, a leucopenia e a pancitopenia são achados inconsistentes. Todavia, a linfopenia é frequentemente relatada em cães com leishmaniose. Além disso, é possível detectar hiperviscosidade do soro, trombocitopatia, trombocitopenia imunomediada secundária, comprometimento da hemostasia secundária e fibrinólise. É possível que os resultados de testes para anticorpos antinucleares sejam positivos em cães com infecção por *L. infantum*, particularmente nas infecções copatogênicas. Os parasitos raramente são detectados em esfregaços de sangue periférico. Observa-se a ocorrência de inflamação linfocitária e neutrofílica com amastigotas de *Leishmania* no líquido sinovial de cães com poliartrite tanto erosiva quanto não erosiva. Os cães com sinais neurológicos apresentam mais comumente pleocitose linfocitária. Foi relatada

redução da qualidade do sêmen de cães com leishmaniose, com pouca motilidade progressiva e alto escore de defeitos dos espermatozoides e cabeças normais separadas. A redução da qualidade do sêmen é parcialmente revertida após tratamento prolongado.

Métodos indiretos

Sorologia

O teste sorológico é baseado na detecção de anticorpos específicos contra o parasita *Leishmania*. Na LVC observa-se uma estimulação policlonal de linfócitos B, resultando em uma grande produção de imunoglobulinas, facilitando assim a detecção de anticorpos por meio de métodos sorológicos já que são menos invasivos e mais práticos.

Os testes mais comuns são o teste de Reação de imunofluorescência indireta (I.F.I), o ensaio imunoenzimático (ELISA do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) e o DPP (*Dual Path Platform*). Esses testes emitem o teste positivo ou negativo e não detectam a presença do protozoário, ou seja, são testes indiretos qualitativos. Títulos elevados de anticorpos (principalmente IgG) são encontrados em 80 a 100% dos cães com a doença clínica e podem ser conclusivos para um diagnóstico. Todavia, é necessário ter cautela na interpretação desses métodos, uma vez que não apresentam sensibilidade e especificidade de 100%.

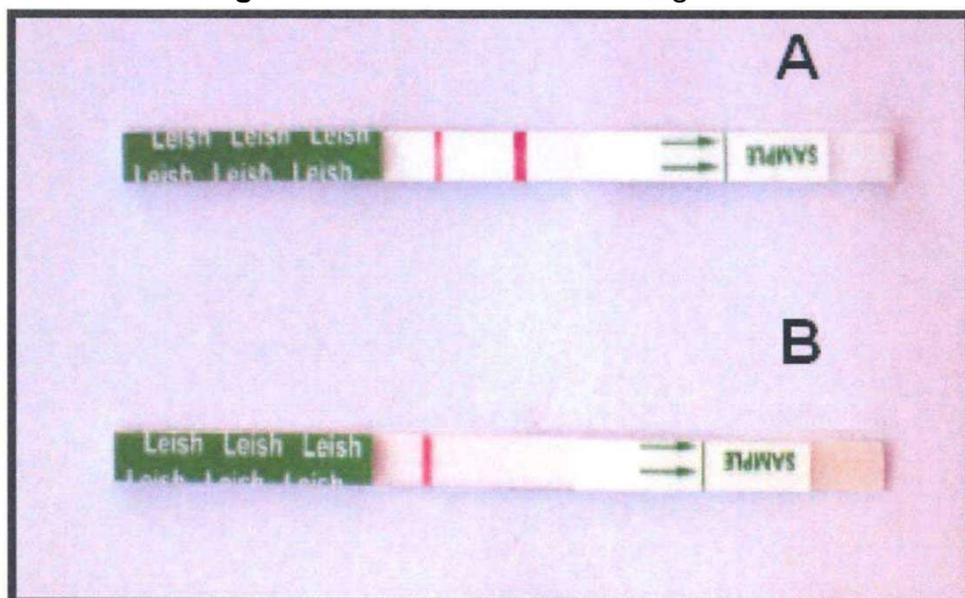
O Ministério da Saúde (MS) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pensando em um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade, preconizaram testes sorológicos para o diagnóstico de LC. Em 2006 o Brasil optou por trabalhar com os testes Elisa e R.I.F.I. O teste de Elisa era recomendado para triagem e o teste R.I.F.I usado como comprobatório aos resultados reagentes do Elisa. Em 2011, por meio de uma nota Técnica conjunta 01/2011, a secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde substituiu o protocolo de diagnóstico do LVC, sendo que, a partir de então, seria usado o DPP como triagem e Elisa como comprobatório nos casos de positivos da triagem (MOLLA; FILHO, 2021, p.21).

Apesar destes testes apresentarem boa especificidade e sensibilidade, estas podem emitir um resultado falso-positivo ou falso negativo. Foi relatada a ocorrência de reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*. (GREENE, Craig E., 2015, p.776), além dessas foram descritas por diversos autores reações com babesiose, neosporose e erliquiose monocítica canina (EMC), correndo-se o risco de eutanasiar um cão falso-positivo. (HELENA DOMINGOS, 2012, p.40).

As vacinas contra *Leishmania* spp., em alguns países, complicou o diagnóstico sorológico da doença em cães imunizados (Solano-Gallego et al., 2017). Como é improvável que os cães eliminem a infecção de maneira espontânea, a maioria dos animais com resultados verdadeiro-positivos à sorologia está atualmente infectada.

O teste imunocromatográfico é um teste qualitativo, de fácil execução e resultado rápido, que tem como objetivo detectar anticorpos para leishmaniose visceral em soros de cães, sendo o teste utilizado nesta pesquisa o “Kalazar Detect”™ fabricado por InBios International (Seattle, WA) que em seu “kit é dotado, além do teste propriamente dito, de solução tampão usada durante a execução.

Figura 20– Teste Imunocromatográfico



A) Reação positiva. B) Reação negativa

Imunofluorescência indireta

O IFI-LVC consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com os parasitos, sob forma promastigota (*Leishmania* sp.), fixados em lâminas de microscopia. Em uma etapa subsequente, é utilizado um conjugado de anti-imunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com produto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) para evidenciação da reação (Bio-Manguinhos/Fiocruz, 2008).

No estudo de BADARÓ ET AL., 1993 determinou-se que antígeno de promastigotas fazendo uso de *L. chagasi* foi sensível e específico com relação aos outros antígenos, sendo recomendado pelos autores para o diagnóstico da LV pela I.F.I.

DPP

O teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina utiliza a avançada tecnologia de imunoenensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP®), esse teste oferece uma sensibilidade e velocidade significativamente superior em comparação a outras metodologias disponíveis. Isso permite a detecção mais rápida da doença (Bio-Manguinhos/Fiocruz, 2020).

Trata-se de um ensaio imunocromatográfico de triagem que emprega de um lado, a combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal, e de outro, antígenos recombinantes rk28 (fusão da rk9, rk26 e rk39) específicos de *Leishmania* ligados a uma membrana de nitrocelulose. Se houver a presença de anticorpos anti-*Leishmania* na amostra testada, estes reagirão com os antígenos recombinantes, e em sequência se ligarão à combinação de proteína A e ouro coloidal, fornecendo o resultado positivo por meio de reação de cor (HELENA DOMINGOS, 2012, p.40).

As proteínas recombinantes consideradas altamente sensíveis para a detecção de infecção em cães são K39, K26, KMP11, SMT, cisteína protease, e a proteína quimérica Q. Outro estudo demonstrou a alta sensibilidade e especificidade de um extrato proteico ribossômico (GREENE, Craig E., 2015).

O TR DPP® pode ser utilizado com amostras de soro, plasma ou sangue total venoso, conferindo flexibilidade ao procedimento diagnóstico (Fiocruz, 2020).

De acordo com um estudo feito por GRIMALDI ET AL. (2012) o TR-DPP®, tem a sensibilidade de 98% no diagnóstico de cães sintomáticos e 47% nos assintomáticos, sugerindo a necessidade de testes mais sensíveis na detecção de animais recém infectados.

ELISA

A utilização de um ELISA de alta especificidade é fundamental, uma vez que este representa o diagnóstico confirmatório da LVC e trata-se de uma informação decisiva para a eutanásia do animal. A utilização de antígenos brutos solúveis do parasita no ELISA apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade devido à proximidade antigênica de *Leishmania* sp. a outros agentes patogênicos que compartilham epítomos antigênicos semelhantes, em especial com os tripanossomatídeos (FERREIRA et al., 2007).

Reações cruzadas no diagnóstico sorológico de LVC já foram reportadas por Ferreira et al. (2007), os quais observaram valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 96%, respectivamente, ao utilizar o teste ELISA (EIE-LVC) (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marca da com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (cut-off) do resultado do controle negativo.

Atualmente, não existe um antígeno padronizado para o diagnóstico sorológico da LT, sendo muitas vezes utilizados extratos solúveis do parasito, o que torna variável a especificidade do teste, principalmente, devido a ocorrência de reatividade cruzada. Dessa forma, os testes de detecção baseados em antígenos ou anticorpos, como o imunoenensaio enzimático (ELISA), apresentam vantagens, no entanto, quando

os 20 extratos antigênicos do parasito são empregados, os testes sorológicos apresentam problemas em sua sensibilidade e/ou especificidade. Esses testes apresentam vantagens por serem menos invasivos e com menos risco para os pacientes quando comparada às outras metodologias, além de ser uma técnica de fácil execução, menor tempo, além da possibilidade de padronização (REZENDE R., 2018, p.45).

Dessa forma, os testes de detecção baseados em antígenos ou anticorpos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), apresentam vantagens significativas. No entanto, quando são utilizados extratos antigênicos do parasito, os testes sorológicos podem apresentar problemas de sensibilidade e/ou especificidade. Apesar disso, esses testes são vantajosos por serem menos invasivos e oferecerem menor risco para os pacientes, se comparados a outras metodologias. Além disso, eles são de fácil execução, requerem menos tempo e permitem a padronização dos resultados.

Em um estudo feito por (REZENDE RODRIGUES, 2018,) foi analisado o desempenho de proibitina e de seu peptídeo sintético no diagnóstico de LVC, o qual se concluiu que, em relação ao diagnóstico sorológico da LVC por de ELISA, a proibitina e seu peptídeo sintético apresentaram melhores valores de sensibilidade e especificidade quando comparado ao SLA *L. infantum* (SLALI).

Estudos demonstraram que a proibitina é expressa na superfície do parasito, ancorada por GPI, particularmente concentrada no polo aflagelar, sendo o polo aflagelar uma região através da qual ocorrem interações hospedeiro-parasito (JAIN et al., 2010, p.56).

Métodos diretos

Parasitológico

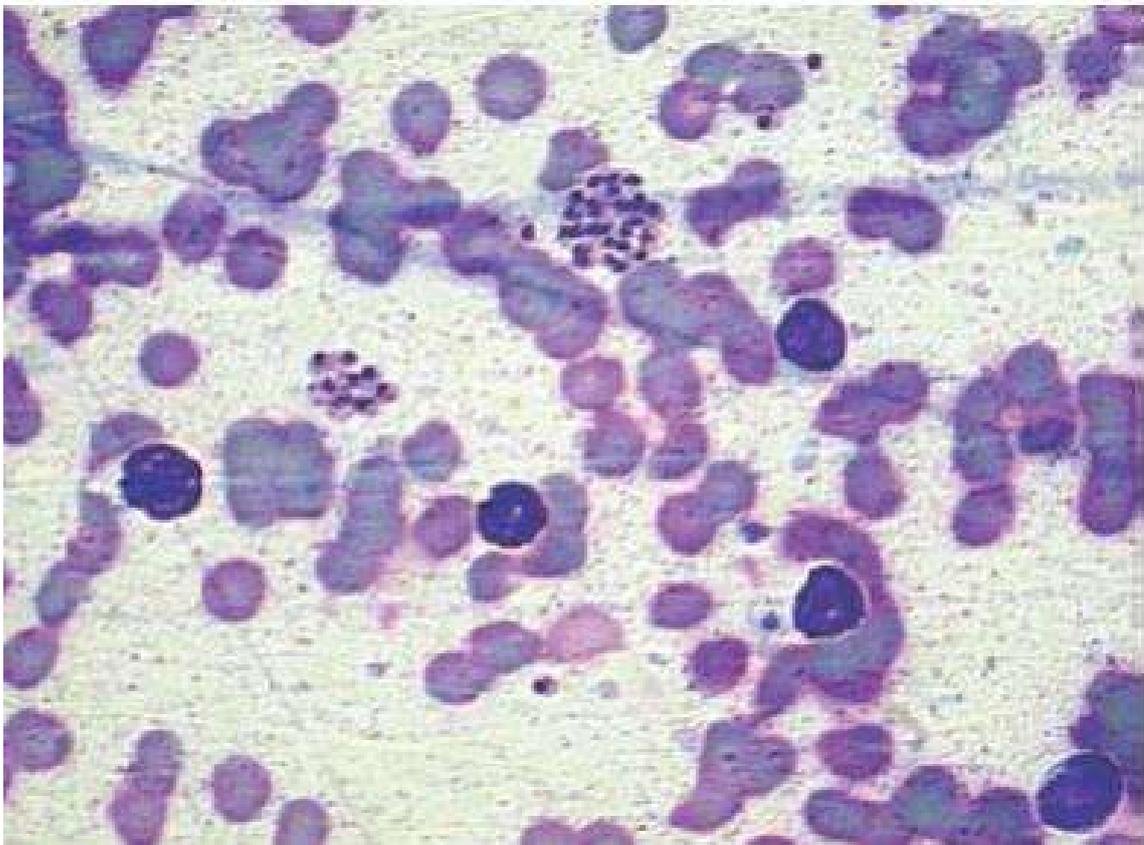
O método parasitológico é considerado padrão-ouro para diagnóstico da LVC. É baseado na visualização microscópica direta de formas amastigotas de *Leishmania* em lâminas coradas, confeccionadas com esfregaço de material colhido por punção aspirativa nos órgãos-alvo (baço, fígado, linfonodos e medula óssea) ou em fragmentos de biópsia dos mesmos. Ocasionalmente os parasitas também podem ser

encontrados em esfregaços sanguíneos, em impressões citológicas obtidas abaixo de crostas e escamas cutâneas, ou por meio de aspirado de nódulos cutâneos.

A identificação de formas amastigotas em esfregaços de aspirado de linfonodo ou medula óssea é considerada o método preferencial para o diagnóstico de infecção estabelecida e disseminada na Leishmaniose Visceral (LV). Esse método é rápido, de fácil execução, de baixo custo, não invasivo e possui 100% de especificidade. No entanto, a sensibilidade do exame microscópico pode variar, dependendo da coleta e qualidade da amostra, do tempo dedicado à análise, da habilidade do profissional e da intensidade do parasitismo.

As formas amastigotas são facilmente identificadas devido ao seu formato esférico a oval, medindo entre 2 a 5 μm . Elas apresentam um núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado.

Figura 21 - Forma amastigota do parasito em esfregaço de linfonodo



CULTURA

Além do exame direto, também é possível detectar o protozoário por meio de isolamento em meio de cultura (in vitro). As formas amastigotas obtidas nos aspirados ou fragmentos dos órgãos são inoculadas em meios de cultura especiais contendo Agar e sangue de coelho (NNN, LIT ou Schneider, por exemplo), e se transformam após três a cinco dias em promastigotas facilmente identificáveis. Porém o método tem baixa sensibilidade nos estágios iniciais da doença, nos quais a carga parasitária é pequena. Também possui limitações por ser laborioso, de alto custo, lento, e por demandar acompanhamento sistemático e pessoal altamente treinado para sua realização. Qualquer que seja a técnica de detecção/observação utilizada, o diagnóstico parasitológico pode dar resultados falso-negativos para pacientes assintomáticos, onde poucas formas amastigotas estão presentes. Além disso, esse método é realizado a partir de procedimentos invasivos (a depender do local de coleta), tornando inviável sua utilização em inquéritos censitários dos programas de vigilância e controle da doença (Gomes et al., 2008).

PCR

Testes que amplificam ácidos nucleicos de agentes biológicos representam a ferramenta diagnóstica mais recente e rápida para o veterinário clínico. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é mais utilizada para amplificar pequeníssimas quantidades de ácido desoxirribonucleico (DNA) presentes em amostras biológicas, em poucas horas. Do mesmo modo, o ácido ribonucleico (RNA) também pode ser amplificado, uma vez que é possível convertê-lo em cDNA por meio da transcriptase reversa (RT-PCR).

A aplicação da PCR na clínica de pequenos animais é maior para diagnóstico de agentes infecciosos e parasitários, particularmente para agentes de crescimento lento e difícil, porém também é utilizada em combinação com outras técnicas para a detecção de alterações genéticas como mutações e polimorfismos, avaliação da resistência microbiana a antibióticos, doenças neoplásicas, bem como avaliação da carga viral ou parasitária.

SELEÇÃO, COLETA E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA

Sucesso da aplicação de técnicas de manipulação de ácidos nucleicos para fins diagnósticos depende fundamentalmente da amostra. Ao optar por um teste que utiliza tecnologias de DNA ou RNA, o clínico deve sempre ter em mente as seguintes perguntas: Estou colhendo o material certo? O procedimento de coleta é apropriado? A quantidade de amostra é adequada? O acondicionamento e a remessa do material estão corretos? Essa etapa é a mais importante de todo o processo, pois é da amostra enviada que os ácidos nucleicos serão extraídos e posteriormente manipulados e analisados.

A amostra biológica a ser colhida para o diagnóstico molecular depende da disponibilidade e da facilidade de coleta, além do objetivo do diagnóstico. Como rotina, amostras frescas são mais interessantes. Nessa categoria, o sangue total apresenta maior facilidade de coleta. Amostras de sangue devem ser colhidas em tubos com anticoagulante não heparinizados, preferencialmente com citrato de sódio ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e devem ser mantidas congeladas, de -20 a -80°C , até o processamento.

Amostras de líquido ou de tecidos de biopsias e necropsias também podem ser utilizadas e devem, preferencialmente, ser mantidas congeladas a -20°C . Alternativamente, as amostras podem ser mantidas em etanol a 95%, em temperatura ambiente.

Sempre que possível, devem-se colher amostras em duplicata a fim de que se possa repetir a extração do DNA, caso seja necessário. De modo geral, utilizam-se de 500 a 700 μl de sangue total e de 10 a 30 mg de tecidos.

A extração de RNA, em geral, exige maiores cuidados para que não haja degradação do ácido nucleico, mais lábil que o DNA, e demanda que as amostras sejam imediatamente congeladas a -80°C , caso o objetivo da análise necessite, por exemplo, da avaliação da expressão de determinada proteína em tecidos, análise ainda não rotineira para os clínicos veterinários.

Os resultados de detecção de DNA de agentes nas amostras sofrem influência da fase de evolução da doença, condição essa difícil de avaliar para doenças de evolução longa como a leishmaniose visceral ou em pacientes previamente submetidos a tratamento antimicrobiano, por exemplo. Assim, as amostras devem ser preferencialmente colhidas antes do estabelecimento do tratamento, diminuindo a possibilidade de resultados falso-negativos.

Em cães com leishmaniose visceral, por exemplo, a medula óssea apresenta maior quantidade de parasitos, seguida da pele, com ou sem lesão cutânea. O sangue periférico apresenta a menor quantidade de parasitos e sofre influência maior do tempo de evolução da doença. Uma das desvantagens é a dificuldade na coleta de medula óssea.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A aplicação de técnicas de biologia molecular é cada vez mais frequente para o diagnóstico de enfermidades de cães e gatos. Entretanto, a interpretação do resultado deve levar em consideração que nenhum teste diagnóstico apresenta 100% de confiabilidade, ou seja, apresenta variações de sensibilidade e de especificidade. Essas características dependem de fatores, como a técnica diagnóstica propriamente dita, e da prevalência da doença, particularmente quando se aplica um teste em nível populacional.

Assim, utiliza-se o termo sensibilidade analítica ao se referir ao menor número de cópias de DNA-alvo que se pode detectar por determinada técnica, e especificidade analítica diz respeito à reatividade específica dentro de um espectro de organismos relacionados.⁵ Já a sensibilidade (S) epidemiológica do teste diz respeito à capacidade que este tem de identificar corretamente os animais infectados, e a especificidade (E) epidemiológica, à capacidade que o teste tem em identificar corretamente os animais não infectados. Assim sendo, um teste com alta sensibilidade resulta em pequeno número de resultados falso-positivos e um com alta especificidade, em poucos falso-negativos.

O valor preditivo positivo (VPP) de um teste mede a probabilidade de que um resultado positivo seja realmente um infectado ou doente, e o valor preditivo negativo (VPN) mede a probabilidade de que um resultado negativo seja realmente de um animal não infectado ou doente.⁶ Um teste pode não ser capaz de diferenciar um animal exposto de um já doente. Nesse caso, seu valor preditivo é baixo.

Conhecer essas características dos testes (S, E, VPP e VPN) e saber que estas variam para cada teste e agente infeccioso ou parasitário ajuda o clínico na interpretação dos resultados e na decisão da melhor conduta para seu paciente. No Quadro 25.1, são apresentadas as variáveis para que se calculem essas características dos testes diagnósticos.

SOBRE A PCR

A PCR foi originalmente descrita por Saiki et al. e aperfeiçoada por Mullis et al. na década de 1980,⁷ sendo um método *in vitro* de amplificação específica de ácidos nucleicos, no qual um segmento particular de DNA pode ser replicado. Essa técnica emprega dois oligonucleotídeos iniciadores, e cada um se liga à região complementar da fita oposta do DNA a ser amplificado (Figura 25.1). Estes estão orientados de tal maneira que a síntese de DNA feita pela polimerase é realizada na região entre os dois iniciadores. O requerimento para reação é simples: alíquota das amostras de DNA, oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers), DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*, quatro desoxirribonucleotídeos e um tampão apropriado. A amplificação ocorre por ciclos repetidos de aquecimento das amostras, iniciando pela desnaturação do DNA a 95°C, seguido do pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores, em geral, a temperaturas que podem variar de 37 a 55°C (anelamento). Em seguida, a 72°C, a DNA polimerase termoestável estende as fitas duplas de DNA dos primers anelados, usando DNA de fita simples como molde. O resultado é o acúmulo exponencial do fragmento-alvo, específico, na proporção de aproximadamente 2^n , em que “n” é o número de ciclos a serem realizados. As reações são realizadas em um ciclador automático de temperatura programável (termociclador).

De modo geral, a PCR é mais sensível que técnicas citológicas ou histopatológicas, sendo comparável a cultivo e inoculação em animais de laboratório, com a vantagem de identificar agentes de difícil cultivo *in vitro*, como *Mycoplasma sp.*, *Chlamydia sp.*, *Rickettsia* e vírus. A especificidade varia bastante e depende, principalmente, dos oligonucleotídeos iniciadores escolhidos que devem resultar na amplificação de fragmento de DNA que codifica apenas para determinada proteína. Assim, a escolha dos oligonucleotídeos pode resultar em amplificação de um fragmento gênero-específico (p. ex., *Ehrlichia spp.*) ou espécie-específico (*E. canis*).

Por ser um teste bastante sensível, a PCR pode revelar resultados falso-positivos decorrentes de contaminação das amostras na coleta e/ou no processamento ou da escolha inadequada dos primers e das condições inadequadas da reação. Por outro lado, resultados falso-negativos também podem ocorrer, principalmente pela presença de inibidores na amostra de DNA, bastante comum em amostras de fezes ou pela baixa representatividade do DNA-alvo na amostra a ser testada. Falso-negativos também podem ser observados quando da detecção de vírus RNA, por RT-PCR, em animais em tratamento específico para o agente em questão, ou quando da conservação inadequada da amostra biológica.

Embora bastante sensíveis, técnicas de PCR apresentam, em geral, baixo valor preditivo positivo, ou seja, não necessariamente um resultado positivo significa que o animal está doente, uma vez que o DNA amplificado pode ser decorrente de agente já morto na hora da coleta da amostra. No caso de animais poderem ser portadores da doença, ou seja, albergarem o agente, mas não manifestarem sintomas, um resultado positivo também não significará a ocorrência de doença. Além disso, testes de PCR podem não diferenciar cepas vacinais daquelas de campo para alguns agentes cuja vacinação é feita com vacina viva modificada (VVM), dificultando a interpretação dos resultados, a exemplo das infecções por herpes-vírus felino¹ e pelo vírus da cinomose canina.

Além desses problemas, há que se observar que os resultados podem variar de acordo com as condições laboratoriais, sendo importante existir o mínimo de controle de qualidade entre laboratórios que oferecem diagnóstico baseado em manipulação de ácidos nucleicos, a fim de dar confiabilidade aos clínicos.

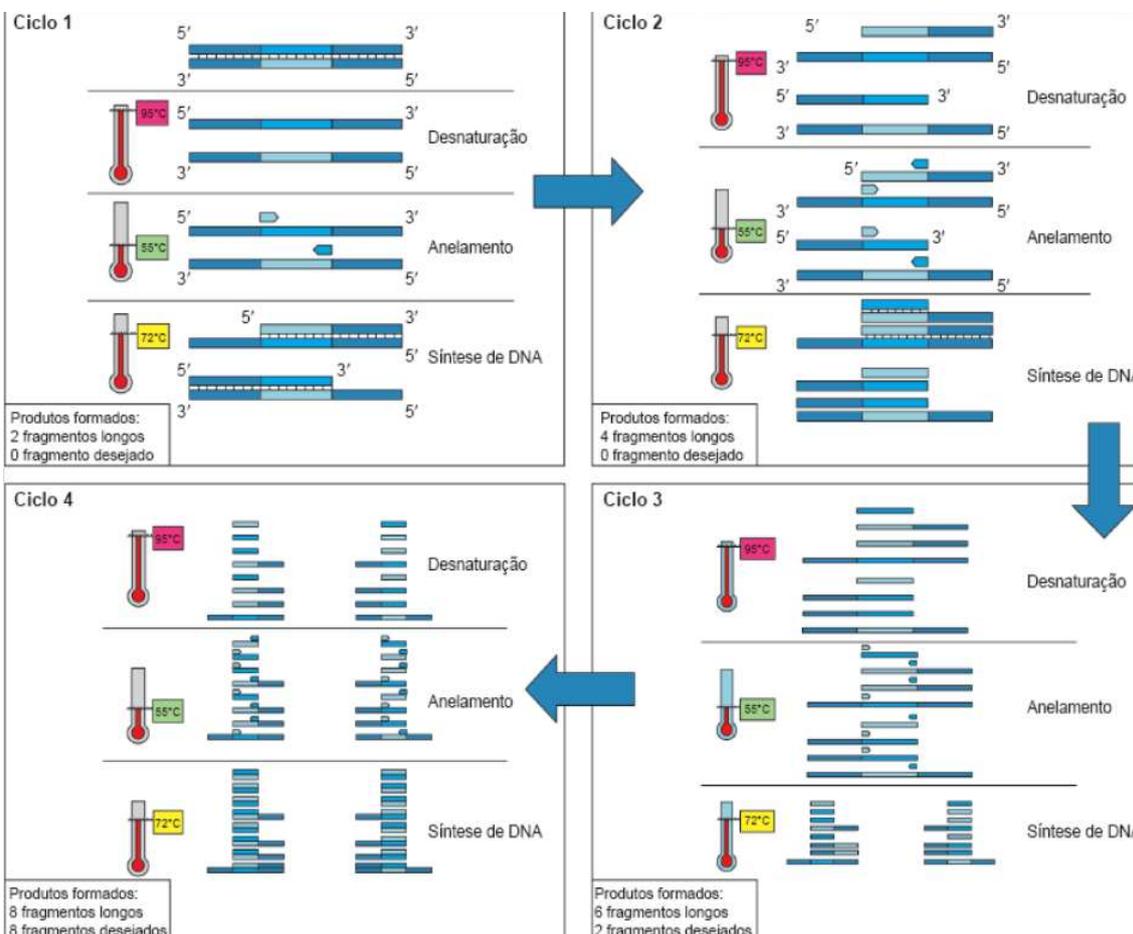
EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração é o procedimento de retirada dos ácidos nucleicos do interior das células. Existem diversos métodos e kits comerciais de extração, específicos para cada tipo de tecido ou fluido biológico e de custo variado. Entretanto, todos eles compartilham os seguintes fundamentos:

- Lise celular;
- Remoção de membranas e proteínas, principalmente nucleases;
- Desnaturação de complexos nucleoprotéicos;
- Precipitação dos ácidos nucleicos.

A análise da existência de ácidos nucleicos efetivamente extraídos pode ser feita por eletroforese em gel de agarose, revelado por brometo de etídio em luz ultravioleta, ou espectrofotometria. Esse controle de qualidade fornece informações importantes para se avaliar a viabilidade da aplicação de técnicas sobre aquele grupo de amostras.

Figura 22 - Representação esquemática de amplificação de fragmento de DNA



IMUNOSENSORES PIÉZOELÉTRICOS

A utilização da nanotecnologia no diagnóstico com a aplicação de biossensores como ferramenta analítica tem sido uma nova alternativa que vem ganhando atenção no diagnóstico diferencial da doença com o desenvolvimento de um imunossensor piezoelétrico para detecção qualitativa de anticorpos anti-antígeno A2 de *Leishmania infantum* em sorológico. usado como antígeno a proteína recombinante A2 de *L. infantum*. (MONTEIRO, 2021)

Onde pode-se observar a reatividade dos imunossensores devido a adsorção simples quanto por SAM mediada por CS₂, demonstraram padrão de resposta indicativo de detecção de anticorpos anti-antígeno A2 presente em sorologia a partir da imobilização de antígeno recombinante A2 de *L. infantum*, para detecção em triagens de amostras sorológicas (MONTEIRO, 2021)

PREVENÇÃO

O plano brasileiro de combate às leishmanioses, busca soluções que visam a redução da incidência desta enfermidade em seres humanos. As estratégias se baseiam, principalmente, no combate ao mosquito-palha (flebotomíneos), os quais são os vetores responsáveis pela manutenção das leishmanias no ambiente (DANTAS e Brandão, 2006). Além disso, a identificação e eutanásia de cães soropositivos ainda é prática que, apesar dos avanços nas legislações pertinentes, é rotineiramente utilizada como forma de eliminar reservatórios da doença no ambiente (COSTA, 2001).

Apesar da eliminação de cães soropositivos ser utilizada e até recomendada pela organização mundial da saúde, estudos mostram que esta prática não reduz a infecção de humanos e cães em níveis aceitáveis; além disso, sabe-se que nos dias atuais, os animais de companhia passaram a ocupar papel de grande afetividade com seus tutores, sendo essa uma das principais razões que levam à reflexão sobre essa prática (OMS, 2010). Assim, países com maiores níveis de tecnologias em saúde veterinária, a eutanásia se reserva a animais severamente acometidos pela doença.

Os avanços nas pesquisas entomológicas, levaram ao conhecimento pormenorizado dos flebotomíneos, identificando seus hábitos e facilitando sua identificação pelos órgãos de controle, logo, com essas informações, deve-se evitar o contato do vetor com os cães domésticos e com os seres humanos (ALVAR et al., 1994). Atualmente, existe uma série de medidas recomendadas para o controle dos flebotomíneos, sendo as principais a utilização de inseticidas que tenham ação efetiva contra o vetor, evitar o passeio com cães nos períodos de maior atividade do mosquito, a eliminação de material orgânico, bem como a construção de abrigos para animais e galinheiros afastados da residência e, principalmente, a vacinação e uso de repelentes para os cães que vivem em áreas endêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Além disso, recomenda-se proteger os animais da exposição em horários de maior atividade do inseto e também o uso de telas protetoras em portas e janelas.

Como outra forma de prevenção, tem-se utilizado coleiras impregnadas com repelentes, geralmente à base de deltametrina a 4%, estas coleiras se mostram efetivas na prevenção à infecção de animais em áreas endêmicas, sendo altamente

recomendadas pelo seu efeito inseticida e repelente ao vetor da leishmaniose canina (MAGNO, 2007). Além disso, existem vários produtos que podem ajudar os animais a se livrarem das picadas dos vetores. Alguns são inseticidas que se aplicam na pele dos animais, como spray de permetrina ou spot-on de imidacloprida com ou sem permetrina (SOLANO, 2009).

A vacinação contra a leishmanioses surge como uma alternativa que apresenta efetiva eficácia no controle da doença, pois esta reduz o número de animais suscetíveis a se tornarem reservatórios do agente, trazendo com isso benefícios para a saúde pública no que tange às infecções em seres humanos e outros cães (FARINELLO, 2010).

Com o avanço das pesquisas, tem-se atualmente diversas vacinas disponíveis no mercado para este fim. No Brasil, a opção para a realização da imunoprofilaxia é uma vacina por nome comercial Leishmune®, sendo essa a única aprovada pelo MAPA atualmente. Pesquisas mostraram que o uso da vacina garantiu significativa proteção aos cães que receberam a imunoprofilaxia, todavia pesquisas ainda são necessárias para aumentar esta eficácia, visto que a vacina não se mostrou tão eficiente nas infecções em áreas altamente endêmicas (KANOMATA, 2022).

As ações devem ser priorizadas e integradas no controle do vetor, seguidas pela busca da redução da suscetibilidade na população humana, por meio da proteção e/ou tratamento dos possíveis reservatórios domésticos.

TRATAMENTO

No Brasil, Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento vedam, por meio da portaria nº. 1.426/2008, o tratamento da LVC com drogas utilizadas na terapia da leishmaniose humana, bem como fármacos não registrados junto ao MAPA. Ademais, como política de saúde pública, as autoridades do país, assim como a OMS, desaconselham o tratamento em cães e preconizam a eutanásia dos animais soropositivos, haja vista que esses animais representam o principal reservatório da doença, além de existir o risco de seleção de patógenos resistentes devido ao uso indiscriminado de drogas terapêuticas no tratamento. Entretanto, desde 2016, o MAPA permite o tratamento de cães com o uso de Miltefosina.

No contexto mundial, as opções de protocolos distintos conferem aos pacientes grandes possibilidades de melhora clínica e menores índices de recidivas (TECSA, 2016). Como amostra, em alguns países do Norte da África, do Oriente Médio, vacinas, quimioterapia e terapia imunológica são disponíveis para reduzir o risco de aparecimento de sinais clínicos, a progressão da doença e a infecciosidade dos cães tratados (DANTAS-TORRES, 2019).

De certa forma, o tratamento da forma canina mostra-se mais desafiador do que a terapia humana. O custo do tratamento pode ser elevado, e a melhora clínica não é assegurada, uma vez que recidivas são frequentes e alguns indivíduos podem progredir para o óbito. Conquanto, segundo a Sociedade Mundial de Proteção Animal (WSAP), o tratamento contínuo pode resultar em remissão dos sinais clínicos, manutenção da qualidade de vida do animal e redução da carga parasitária. Isso, por sua vez, leva à diminuição ou supressão da capacidade de transmissão e à não detecção do antígeno em testes rápidos. Todavia, assim como em outras protozooses, a cura parasitológica da LVC é ausente. O tratamento para a doença é bem variado e envolvem a combinação de leishmanicidas e leishmanióstáticos. Ainda, devido à necessidade de resposta imune, estudos demonstram o papel importante dos imunomoduladores no controle da doença. O uso de drogas como levamizol, domperidona, cimetidina, metronidazol, enrofloxacina, cetoconazol, fluconazol, levamizol e marbofloxacina revelam resultados excelentes no controle desta doença.

É necessário que o diagnóstico da leishmaniose seja confirmado por meio de exames de triagem, como imunocromatografia, RIFI, ELISA e PCR, citologia e histologia. Esses procedimentos reforçam a necessidade de iniciar o tratamento adequado. Além disso, é essencial avaliar a intensidade do quadro clínico, realizar exames hematológicos, verificar a função hepatorrenal e investigar possíveis doenças concomitantes, como babesiose, erliquiose, demodicose, escabiose, hepatozoonose, criptococose, dirofilariose, antes de iniciar o tratamento. Durante o tratamento, é importante monitorar regularmente os parâmetros bioquímicos para identificar quaisquer efeitos colaterais decorrentes da medicação. Exames quantitativos, como a PCR-RT (PCR em tempo real), podem ser utilizados para avaliar a redução da carga parasitária ao longo do tratamento.

O principal protocolo de tratamento consiste na administração de uma dose diária de miltefosina a dois miligramas por quilograma de peso vivo por dia, durante vinte e oito dias consecutivos. O uso de alopurinol (Zyloric) deve ser administrado na dose de dez a quinze miligramas por quilograma de peso vivo, duas vezes ao dia, durante seis meses a um ano. O uso de domperidona na dose de meio a um miligrama por quilograma de peso vivo, duas vezes ao dia, durante trinta dias, pode ser empregado com o intuito de promover ação imunomoduladora (Gómez-Ochoa et al., 2009). Conforme Dietze (2005), Langoni (2015), e Queiroz (2010) também é recomendável que o paciente seja vermifugado, e imunizado contra outras doenças infecciosas.

Além disso, todos os animais em tratamento devem utilizar inseticidas tópicos com propriedade repelente, a fim de minimizar o risco de transmissão (CFMV, 2017; OMS, 2010; OPAS, 2006; Ribeiro et al., 2013).

Conforme Ribeiro (2007) e Azevedo Pereira (2021), a eutanásia deve ser realizada por um médico veterinário, seguindo princípios éticos e recomendações para evitar o sofrimento do animal. Antes do procedimento, devem ser realizados dois testes laboratoriais para confirmar a ausência de infecção no cão: R.I.F.I. ou DPP® e Elisa.

O estadiamento clínico abaixo foi proposto pela Brasileish, adaptado a realidade do clínica da América do Sul, a partir do modelo da Leishvet (2018).

Figura 23 – Estadiamento clínico e terapia

Estádios clínicos	Sorologia ¹	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia ²	Prognóstico
ESTÁDIO I Sem doença	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico negativo	Ausentes	Sem alterações	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴	Bom
ESTÁDIO II Sem Doença / Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular, emagrecimento discreto	Geralmente sem alterações. Peril renal normal	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina	Bom
ESTÁDIO III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio II, além de outros como lesões cutâneas difusas ou simétricas, onicogribose, ulcerações, anorexia e emagrecimento	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios a) Peril renal normal (Creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0,5-1	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado
ESTÁDIO IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio inal.	Alterações do Estádio III, além de DRC no Estádio 1 (RPC >1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
ESTÁDIO V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais dos Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio inal	Alterações do Estádio IV, além de DRC no estágio III (creatinina 2,1-5 mg/dl) e IV (creatinina > 5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5)	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Pobre

Abreviações: RIFI (reação fluorescência indireta); DRC (doença renal crônica); IRIS (International Renal Interest Society); PSS (pressão sistêmica sanguínea); RPC (razão proteína-creatinina urinárias)

¹Em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios. a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica elou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte ou cut-of pré-estabelecido de um laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da LCan (Solano-Gallego et al., 2011; Ribeiro et al., 2013).

²Monitorar a cada 4 a 6 meses com exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, exames gerais para estadiamento e revisão de tratamento (Ribeiro, 2016; Leishvet, 2018).

³Imunoterapia com a vacina LeishTec: um frasco aos 0, 14 e 28 dias em animais infectados (Toepp et al., 2018) ou dois frascos nos dias 0. 21 e 42, em monoterapia ou associada ao alopurinol, com reforços semestrais (Ribeiro et al., Zu13, ZU17).

⁴Imunomodulação com domperidona: 0,5-1 mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias (Gómez-Ochoa et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ALVES DE LIMA, Denise. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na ilha de marambaia, mangaratiba-rio de janeiro. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 18, 2019.

ANTUNES, Tamires Ramborger *et al.* Detecção de *Leishmania infantum* em esfregaço de sangue periférico e linfonodo de um felino doméstico. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], 2016. Disponível em: https://www.ufrgs.br/actavet/44-suple-1/CR_162.pdf. Acesso em: 23 maio 2023.

ASSIS, J. de, Queiroz, N. M. G. P., Silveira, R. de C. V., Nunes, C. M., Oliveira, T. M. F. S., Noronha Junior, A. C. F., Neves, M. F., Machado, R. Z., & Buzetti, W. A. S. (2010). Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(1), 17–25.

ATAYDE, V. *et al.* **Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut**. *Cell Reports*. 2015; 13(5): 957-67.

AZEVEDO PEREIRA *et al.* Avaliação diagnóstica de Leishmaniose visceral canina em animais provenientes da zona sul de São Paulo/ SP. **Atena Editora**, p. 73, 2021.

BENCHIMOL, Jaime Larry *et al.* Leishmanioses: sua configuração histórica no Brasil com ênfase na doença visceral nos anos 1930 a 1960. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, n. 2, p. 611-626, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981.81222019000200017>. Acesso em: 18 maio 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas Técnicas**. Brasília; 2006.

BRASILEISH. **Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção do leishmaniose canina**. [S. l.]: Brasileish, 2018. 16 p.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia: leishmaniose visceral**. 65. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2012. 138 p.

COSTA CHN. **Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil**. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(2):223-8

CRMV-SC; CRMV-PR; CRMV-RS. **Manual de zoonoses**. 2. ed. [S. l.]: Abissal Design & Comunicação, 2010. v. 1: Manual de zoonoses.

DANTAS-Torres F, Brandão-Filho SP. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control**. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006;48(3):151-6

DEVENS, Bruna Alves. Leishmaniose: histórico, etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. **Pubvet**, v. 2, n. 3, p. 1-8, mar. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v02n03a0186.1-8>. Acesso em: 18 maio 2023.

FARINELLO FG. **Avaliação da resposta imunológica de cães vacinados com a vacina FML (Leishmune) e cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina por meio de dois métodos sorológicos: ELISA e RIFI**. [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; 2010.

FEITOSA, Francisco Leydson F. **Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico**. 4. ed., 2020. ISBN 9788527736329.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford. 2004; 18: 7061-1067.

FERREIRA E de C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES da, et al. (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146 (3-4): 235– 1508 241.

FREITAS, Adriana Lopes de *et al.* Leishmaniose visceral canina: revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 10, p. 1-20, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n10a1245.1-20>. Acesso em: 20 maio 2023;

GOMES, Y. M., Cavalcanti, M. P., Lira, R. A., Abath, F. G. C., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175(1), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>.

GREENE, Craig E. *Doenças Infeciosas em Cães e Gatos*. Grupo GEN, 2015. E-book. ISBN 978-85-277-2725-9.

GRIMALDI JR, Gabriel; et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.106, n.1, p.54-59, jan. 2012.

HELENA DOMINGOS, Iara. **Teste rápido tr-dpp® no contexto do diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina**. 2012. 86 p. Dissertação de pós graduação — UFMS, CAMPO GRANDE, 2012.

JAIN, Rohit et al. Leishmania cell surface prohibitin: role in host–parasite interaction. *Cellular microbiology*, v. 12, n. 4, p. 432-452, 2010.

JERICÓ, M. M.; NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2015. ISBN 9788527726436;

KAMHAWI S. **Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?** *Trends Parasitol.* 2006 Sep;22(9):439-45. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.012. Epub 2006 Jul 14. PMID: 16843727;

KANOMATA, Patricia Yukari. **Avaliação da potência/eficácia das vacinas LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® contra leishmaniose visceral canina após o desafio experimental com Leishmania infantum**. Universidade Federal De Ouro Preto, ouro Preto/MG- 2022;

KHAN, Cynthia M. Manual Merck de Veterinária, 10ª edição. DPP® leishmaniose canina. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/en-us/produtos/reativos/testes-rapidos/dppr-leishmaniose-canina>.

LUZ, Z.M.P.; PIMENTA, D.N.; RABELLO, A. et al. Evaluation of informative materials on leishmaniasis distributed in Brazil: criteria and basis for the production and improvement of health education materials. *Cad. Saúde Pública*, v.19, p.561-569, 2003;

M. A. Taylor, R. L. Coop, R. L. Wall; tradução José Jurandir Fagliari, Thaís Gomes Rocha. **Parasitologia veterinária – 4. ed.** – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017;

MAGNO SS. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi submetidos a um protocolo terapêutico em uma Clínica Veterinária de Belo Horizonte**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2007;

MINISTÉRIO DE SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p. ed. 2, 2010. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_america.pdf. Acesso em: 23 maio 2023;

MINISTÉRIO DE SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério de Saúde, 2014. 122 p;

MONTEIRO, Joseane Rodrigues . **Aplicação de imunossensor piezoelétrico para identificação de anticorpos contra Leishmania infantum em soro felino.** 2021. 62f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, Araguaína, 2021.

MORAILLON, Robert et al. **MANUAL ELSEVIER DE VETERINÁRIA: Diagnóstico e tratamento de CÃES, GATOS e ANIMAIS EXÓTICOS.** 7. ed., 2013. Disponível em: https://www.ufrb.edu.br/ccaab/images/AEPE/Divulga%C3%A7%C3%A3o/LIVROS/Manual_Elsevier_de_Veterin%C3%A1ria_Diagn%C3%B3stico_e_Tratamento_de_C%C3%A3es_Gatos_e_Animaais_Ex%C3%B3ticos_-_7%C2%AA_Edi%C3%A7%C3%A3o_-_Robert_Moraillon_-_2013-compactado.pdf. Acesso em: 16 maio 2023;

MOREIRA MAB. **Leishmaniose visceral canina em Araçatuba (SP): diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular e alterações histopatológicas de órgãos linfoides e fígado.** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003;

MORENO, Javier. Assessment of vaccine-induced immunity against canine visceral leishmaniasis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 4 jun. 2019;

NELSON; COUTO. **Medicina interna de pequenos animais - Tradução.** 5. ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2015. 4442 p.;

ORTIGÃO, Marcelo Ramalho; SARAIVA. Elvira M.; TRAUB-CSEKÖ, Yara M. **Interações mosca-da-areia-Leishmania: relacionamentos longos não são necessariamente fáceis.** The Open Parasitology Journal, v. 4, p. 195-204, janeiro de 2010;

PANTALEÃO, Sandra Medeiros da Silva *et al.* Análise dos indicadores de leishmaniose em Sergipe. **RAHIS**, v. 15, n. 4, p. 1-15, 23 out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21450/rahis.v15i4.5397>. Acesso em: 19 maio 2023;

ROGERS ME. **The role of leishmania proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host.** Front Microbiol. 2012 Jun 28;3:223. PMID: 22754550; PMCID: PMC3384971.

SANTOS, Renato de Lima; ALESSI, Antonio Carlos. **Patologia Veterinária.** 2. ed., 2016;

SAPATEIRO. **Vinte anos de leishmaniose visceral na região de araçatuba: histórico e desafios atuais para o controle da doença.** 2020. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso — CEFOR/SUS-SP, Araçatuba, 2020;

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclo-genesis augmenting vector infectivity. Nature microbiology, v. 3, n. 5, p. 548-555, 2018;

SILVA, Raizza Barros Sousa *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with canine visceral leishmaniasis in the State of Paraíba, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 683-688, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0429-2017>. Acesso em: 20 maio 2023;

SILVA. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007;

SOARES LEOTE, Diego. **Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no sul do estado de Santa Catarina.** 2018. 58 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde — Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2018. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/15179/4/Dissertação%20Mestrado%20-%20Diego%20Leote%20RIUNI.pdf>;

SOLANO-GALLEGO L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L et al. **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis.** Vet Parasitol. 2009;

SOLANO-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>;

SUNTER J, Gull K. Shape, **form, function and Leishmania pathogenicity**: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* 2017 Sep;7(9):170165. doi: 10.1098/rsob.170165. Erratum in: *Open Biol.* 2018 Aug;8(8): PMID: 28903998; PMCID: PMC5627057;

TAYLOR, M. A. *et al.* **Parasitologia Veterinária**. 4. ed., 2017. Disponível em: https://drive.google.com/file/d/1T6gI3QzbBGB1YN_uLJbF7I3ZBJKNFxFu/view?usp=drivesdk;

TECSA. Leishmaniose visceral: o papel do laboratório veterinário no diagnóstico. **VetScience**, n. 12, 2016;

TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed., 2014;

WIJERATHNA T, Gunathilaka N. **Diurnal adult resting sites and breeding habitats of phlebotomine sand flies in cutaneous leishmaniasis endemic areas of Kurunegala District**, Sri Lanka. *Parasit Vectors*. 2020 Jun 5;13(1):284. doi: 10.1186/s13071-020-04154-7. PMID: 32503610; PMCID: PMC7275303;

World Health Organization. **Control of the leishmaniases**. WHO Technical Report Series 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniases. Geneva, 22-26 march; 2010. p. 76-7;

WSPA. **Leishmaniose Visceral Canina: um manual para o clínico veterinário**. Rio de Janeiro: WSPA. 20 p.



UNIVERSIDADE DE
vassouras