

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade
Lídia Roedel Hinkelmann Berbert

**Estudo da infecção por *Leishmania* sp em cães na Macrorregião
de Teófilo Otoni - MG**

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra de Paula Carli

Coorientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Colaboradora: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Teófilo Otoni

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade

Lídia Roedel Hinkelmann Berbert

**Estudo da infecção por *Leishmania* sp em cães na Macrorregião
de Teófilo Otoni - MG**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra de Paula Carli

Coorientador: Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Colaboradora: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Teófilo Otoni

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

B484 Berbert, Lídia Roedel Hinkelmann
2021 Estudo da infecção por Leishmania sp em cães na Macrorregião de Teófilo Otoni - MG [manuscrito] / Lídia Roedel Hinkelmann Berbert. -- Teófilo Otoni, 2021.
123 p. : il.

Orientador: Prof. Dra. Alessandra de Paula Carli .
Coorientador: Prof. Dr.Caio César de Souza Alves .
Coorientador: Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo.

Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia, Ambiente e Sociedade) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Teófilo Otoni, 2021.

1. Leishmaniose. 2. Cães. 3. Diagnóstico. 4. Leishmania sp. 5. Teófilo Otoni-MG. I. Carli , Dra. Alessandra de Paula . II. Alves , Dr.Caio César de Souza . III. Gontijo, Dra. Célia Maria Ferreira . IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

LÍDIA ROEDEL HINKELMANN BERBERT

Estudo de Infecção por Leishmania em cães na Macrorregião de Teófilo Otoni, MG

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em **TECNOLOGIA, AMBIENTE E SOCIEDADE** da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, **nível de Mestrado Profissional** como requisito para obtenção do título de **Mestre em Tecnologia, Ambiente e Sociedade na linha de Recursos Naturais e Ambiente**.

Orientadora: Profa. Dra. **Alessandra de Paula Carli**

Coorientador: Prof. Dr. **Caio César de Souza Alves**

Colaboradora: Profa. Dra. **Célia Maria Ferreira Gontijo** (FIOCRUZ)

Data de aprovação 18 de agosto de 2021.

Prof. Dr. **Alexandre Sylvio Vieira da Costa** (UFVJM)

Prof. Dr. **Fernando Leitão Rocha Junior** (UFVJM)

Profa. Dra. **Lízia Colares Vilela** (UFVJM)



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra de Paula Carli, Servidor**, em 19/08/2021, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Cesar de Souza Alves, Servidor**, em 19/08/2021, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Sylvio Vieira da Costa, Servidor**, em 19/08/2021, às 23:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Fernando Leitão Rocha Junior, Servidor**, em 24/09/2021, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

file:///C:/Users/LÍDIA/roaming/Downloads/SEI_UFVJM - 0440257 - Pós-graduação_ Folha de aprovação.html

1/2

09/10/2021 09:38

SEI/UFVJM - 0440257 - Pós-graduação: Folha de aprovação



[de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lízia Colares Vilela, Servidor**, em 24/09/2021, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0440257** e o código CRC **8D6C8FEF**.

O presente trabalho é dedicado a todos os Médicos Veterinários que atuam na área de pequenos animais e que lidam no dia a dia com a Leishmaniose Visceral Canina. Ainda temos muito o que descobrir sobre essa doença.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Instituto René Rachou/Fiocruz na pessoa da Dra Célia Maria Ferreira Gontijo, pesquisadora e então Coordenadora do GEL quando comecei minhas atividades na Fiocruz. Imaginem um anjo, que sem me conhecer, abriu as portas do laboratório de pesquisa em Leishmaniose da Fiocruz e me deu todo apoio para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, paciência e pelo acolhimento constante. Você sabe o tanto que sou grata por tudo que você fez por mim. Melhor que fazer mestrado é ganhar uma amiga como você.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador da vida e a todos os seres de luz que nos ajudam a suportar as provações diárias desta vida!

Aos meus pais, Franz e Hildegard! Obrigada! Vocês foram veículos para eu estar aqui nesse momento e poder dar continuidade à minha evolução espiritual!

A minha orientadora Profa. Dra. Alessandra de Paula Carli, e ao meu coorientador Prof. Dr. Caio César de Souza Alves, muito obrigada! Obrigada por tolerarem com tanta paciência minhas franquezas, minhas chatices e teimosias. Acho que nunca passaram por uma experiência dessas antes (e nem vão querer mais passar rrsrrsrs). Orientar um acadêmico recém formado é bem mais fácil que orientar uma sexagenária com 34 anos de formada. Obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação e apoio! Sou grata por tudo que fizeram por mim.

Às técnicas de laboratório da UFVJM, Náthale Rodrigues Pinheiro e Layde Dyana Sierau, pela valiosa colaboração. Vocês muitas vezes facilitaram minha vida prorrogando o tempo de vocês no laboratório, quando meus horários eram estreitos e apertados para encontrar vocês lá. Obrigada pelo carinho e compreensão!

À Professora Sarah Alves Auharek pelo interesse em me ajudar sempre de alguma forma. O seu carinho e amizade foram bálsamo para momentos de aflição e desânimo. Gratidão por tudo!

A todos os professores da UFVJM, especialmente aqueles com os quais tive a honra e oportunidade de ter aulas. O conhecimento e saber ensinado por vocês foi muito importante para o desenrolar das minhas atividades acadêmicas e a construção desta dissertação. Jamais esquecerei esse tempo que estivemos juntos. Vocês são muito importantes para essa instituição que muito tem contribuído para favorecer o progresso da nossa região e ajudar alunos que jamais poderiam concluir um curso superior se não fosse a UFVJM.

Ao meu esposo Luiz Eduardo, meu eterno companheiro de vida. Obrigada pela renúncia do tempo e presença de que muitas vezes você abriu mão e que foram gastos com a realização deste trabalho. Prometo que vou compensar toda ausência com muito amor e carinho e muitas taças de vinho juntos. Te amo!

Aos meus filhos Gabriela, Matheus e Luiza, amores de minha vida! Vocês são incentivo constante para meus projetos e ideais de vida! Amo vocês infinito!

A todos os funcionários do Setor de Vigilância Sanitária e do Canil Municipal da PMTO, na pessoa da Médica Veterinária Dra Marla Oliveira D'Esquivel. Vocês foram fundamentais na minha coleta de amostras e coleta de dados. Muito obrigada por tudo!

Aos funcionários da Clínica Veterinária São Francisco, Rubiana, Daniel, Rodrigo, Dra Victoria Sibiem e Dra Virna Schapper Barrancos Antunes pela valiosa ajuda em todos os momentos. Vocês aliviaram o peso do trabalho que muitas vezes requisitava dias de trinta horas. Ufffaaa! Foi cansativo, mas valeu a pena principalmente porque tive vocês para me auxiliarem. Jamais esquecerei os momentos que passamos juntos. Vocês moram no meu coração.

A ONG Lar de São Francisco, representada por esse tesouro com que Deus me presenteou, Isvanova Reinaldo Guimarães. Você sabe que tem um lugar especial do lado esquerdo do meu peito. Nem tenho palavras para te agradecer pelo amor que dedica aos animais, especialmente aos portadores de Leishmaniose. Você sempre foi anjo na vida deles e salvou a vida de muitos. Obrigada pela amizade, respeito e carinho que sempre norteou nossa

relação profissional e de amizade. Continuaremos na luta por esses bichinhos indefesos e que nem sempre têm alguém para gritar por eles. Minha eterna gratidão!

À minha amiga Erica Moutinho, a quem recorri tantas vezes quando me desesperei face a dificuldades com a informática. Muito obrigada pela valiosa ajuda, pelo carinho e amizade!

A todos os tutores dos cães que fizeram parte da minha pesquisa. Sem a confiança e colaboração de vocês nada poderia ser feito. Obrigada por colocarem em minhas mãos esses “anjos de quatro patas” que são verdadeiros companheiros e enxergam vocês como amigos fiéis.

A todos os funcionários do Instituto René Rachou/Fiocruz, em especial, Tina (Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima), Lara Saraiva, Camila Binder Soares de Souza e Felipe Dutra Rêgo pela boa vontade, pelo auxílio em várias tarefas e, acima de tudo, pelo carinho e pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Deise, Alicia, Eliza, Julia, Mary, Raissa, Sharon, Graziela e Giovani que foram sempre tão solícitos e me auxiliaram na coleta de material e formatação de dados como gráficos e tabelas. Vocês foram anjos em minha vida! Muito obrigada!

Aos meus colegas de mestrado. Conviver com vocês foi muito bom! Ganhei amigos e vivi momentos inesquecíveis. Como foi prazeroso resgatar na memória meu tempo da vida acadêmica e as farras que fazíamos. Mesmo sendo uma aluna Sex(agenária) rrsrsrs, me dei o direito de ser uma jovem estudante cheia de sonhos e planos e isso me trouxe muita alegria de viver. Obrigada por tudo!

A Heberson, pela disposição em me ajudar em tudo que eu precisasse. Obrigada por aliviar minhas aflições, pela amizade sincera e incondicional, pela presença constante, pela paciência em todos os momentos e pelo incentivo. Ganhei um filho que me dá muito orgulho por ser quem você é! A distância e o tempo não irão desfazer essa amizade sólida que conquistamos.

Aos cães, que muitas vezes me olhavam com humildade e resignação, e mesmo entre o medo e a incerteza, permitiram que eu trabalhasse tranquilamente na coleta de minhas amostras. Eu amo tanto vocês que desconfio que em minhas veias corre também sangue de cachorro...

Obrigada aquelas pessoas anônimas que indiretamente contribuíram para essa realização. Posso ter esquecido de agradecer a alguém. Se aconteceu, me perdoem. Todos os dias, sempre, ao final de cada dia, agradeço e peço a proteção divina para todos aqueles que contribuíram nos meus trabalhos diários e me proporcionaram a oportunidade de evoluir.

Essa vitória não é só minha. Ela é de todos nós. Ela é da UFVJM. Ela é da nossa cidade e região. Eu acredito que nada acontece por acaso. Que os laços que unem as pessoas nesta vida são muito mais fortes do que podemos imaginar. Depois desse mestrado eu tenho certeza absoluta que não sou mais a mesma Lidia de três anos atrás! Namastê!

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, o qual é transmitido pela picada do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* infectado. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a LVC está presente em 88 países, sendo o cão doméstico o principal reservatório para o agente etiológico da doença humana. O Brasil registrou entre 2010 a 2018 um crescimento exponencial no número de casos humanos e caninos de Leishmaniose Visceral. O diagnóstico da LVC é realizado rotineiramente nas clínicas veterinárias por meio de exame clínico associado a métodos sorológicos, conforme recomendação do Ministério da Saúde. O objetivo deste trabalho foi estudar a LVC na Macrorregião de Teófilo Otoni através do diagnóstico molecular, isolamento e identificação de espécies de *Leishmania sp* nos cães. No presente estudo, foram utilizados cães provenientes da Clínica Veterinária São Francisco e do Canil Municipal de Teófilo Otoni, MG, para coleta das amostras com aprovação da CEUA-Mucuri da UFVJM. Foram selecionados 132 cães com resultado DPP positivo. Posteriormente, os animais foram avaliados quanto à sintomatologia, sexo e tratamento. Foi realizado o Teste Rápido e feita a coleta de pele de orelha esquerda e aspirado de medula óssea. O aspirado de medula foi enviado para a Fiocruz para visualização, identificação do protozoário e confirmação do diagnóstico. Pelo menos um sinal clínico, possivelmente associado à LVC foi observado em 77,27% dos animais e 83% dos animais apresentavam pelagem curta. Os animais com mais de 6(seis) anos de idade apresentaram um percentual de positividade menor em relação a faixa de animais adultos-jovens. Os locais de maior incidência da LVC aconteceram em áreas da região Norte da Cidade de Teófilo Otoni. Ao se avaliar os resultados das culturas realizadas com as amostras de aspirado de medula óssea, observou-se que 86 animais (65,15%) apresentaram cultura de *Leishmania sp* negativa e a leitura de lâminas prévias à cultura, verificou-se presença de formas amastigotas de *Leishmania sp* em 26,52% das lâminas de medula e em 18,18% das lâminas de pele de orelha. Ao se avaliar os resultados de PCR e RFLP observou-se que dos 132 animais avaliados, 56 amostras apresentaram resultado positivo para PCR (42,42%) e 69 amostras (52,27%) apresentaram resultado positivo para RFLP (identificação da espécie de *Leishmania sp*), sendo 56 amostras de sangue de medula e 13 amostras de macerado de cultura positiva que tiveram resultado negativo na PCR. A *L. infantum* foi a única espécie encontrada nas amostras analisadas. No resultado final, 88 cães (66,67%) deste estudo tiveram o diagnóstico confirmado com positividade em pelo menos um dos testes realizados (parasitológico e/ou molecular). Este estudo demonstrou que, o

diagnóstico da LVC ainda enfrenta sérios desafios e requer o uso de vários testes diagnósticos. Especialmente na Macrorregião de Teófilo Otoni, MG, existem poucos dados epidemiológicos sobre a LVC, portanto, a detecção precoce de cães infectados é essencial para o direcionamento e melhoria das ações estratégicas no controle da LV.

Palavras chave: Leishmaniose, LVC, Cães, Diagnóstico, *Leishmania sp*

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is an infectious disease caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which is transmitted by the bite of the infected sand fly *Lutzomyia longipalpis*. According to the World Health Organization, LVC is present in 88 countries, with the domestic dog being the main reservoir for human disease. Between 2010 and 2018 Brazil registered an exponential growth in the number of human and canine cases of Visceral Leishmaniasis. The diagnosis of CVL is routinely performed in veterinary clinics through clinical examination associated with serological methods, as recommended by the Ministry of Health. The objective of this work was to study the situation of CVL in the Macroregion of Teófilo Otoni through molecular diagnosis, isolation and identification of species of *Leishmania* sp in dogs. In the present study, dogs from the São Francisco Veterinary Clinic and the Municipal Kennel of Teófilo Otoni, MG, were used to collect samples with approval from CEUA-Mucuri of UFVJM. Dogs with a positive PPD result were selected. Subsequently, the animals were evaluated for symptomatology, sex and treatment. The Rapid Test was performed and the skin from the left ear and bone marrow aspirate were collected. The marrow blood was sent to Fiocruz for visualization, identification of the protozoan and confirmation of the diagnosis. At least one clinical sign, possibly associated with CVL, was observed in 77.27% of the animals and 83% of the animals had short fur. Animals over 6(six) years of age had a lower percentage of positivity in relation to the range of young-adult animals. The places with the highest incidence of LVC were in areas in the northern region of the city of Teófilo Otoni. When evaluating the results of cultures performed with the samples of bone marrow aspirate, it was observed that from the samples of 132 animals, 86 (65,15%) had negative *Leishmania* culture and the reading of slides prior to the culture, there was the presence of amastigote forms of *Leishmania* spp in 26.52% of marrow lamina and in 18.18% of ear skin lamina. When evaluating the results of PCR and RFLP, it was observed that of the 132 animals evaluated, 56 samples were positive for PCR (42.42%) and 76 samples were negative for PCR (57.58%) and 69 samples had a result positive for RFLP (*Leishmania* Species Identification), 56 marrow blood samples and 13 culture macerate positive samples were PCR negative. The species of *Leishmania infantum* was the only species found in the analyzed samples. In the final result, 88 dogs (66.67%) in this study had the diagnosis confirmed with positivity in at least one of the tests performed (parasitological and/or molecular). This study demonstrated that the diagnosis of CVL still faces serious challenges and requires the use of various diagnostic tests. Especially in the Macroregion of Teófilo

Otoni, MG, there are few epidemiological data on CVL, therefore, the early detection of infected dogs is essential for targeting and improving strategic actions to control VL.

Keywords: Leishmaniasis, CVL, Dogs, Diagnosis, *Leishmania sp*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-UTR - REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA

DNA - ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DESOXYRIBONUCLEIC ACID)

DPP - PLATAFORMA DE CAMINHO DUPLO (DUAL PATH PLATFORM)

DTN – DOENÇA TROPICAL NEGLIGENCIADA

DTN'S - DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

EDTA - ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO

ELISA - ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

IFN- γ - INTERFERON-GAMA

IL - INTERLEUCINA

IL-10 - INTERLEUCINA 10

IL-12 - INTERLEUCINA 12

IL-2 - INTERLEUCINA 2

IL-4 - INTERLEUCINA 4

ITS1 - INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 1

KDNA - DNA DO CINETOPLASTO

LC - LEISHMANIOSE CUTÂNEA

LCM - LEISHMANIOSE CUTÂNEO MUCOSA

LCD - LEISHMANIOSE CUTÂNEO DIFUSA

LIT - LIVER INFUSION TRIPTOSE

LTA - LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

LV - LEISHMANIOSE VISCERAL

LVC - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

LVH - LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

MO - MICROSCÓPIO ÓTICO

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE

NK - CÉLULAS *NATURAL-KILLER*

NNN - NOVY NEL NICOLLE

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

PAAF - PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA

PBS - PHOSPHATE BUFFER SOLUTION (SALINA TAMPONADA COM FOSFATO)
PCR - REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (DO INGLÊS POLYMERASE CHAIN REACTION)
PMTO – PREFEITURA MUNICIPAL DE TEÓFILO OTONI
PO – PELE DE ORELHA
POE – PELE DE ORELHA ESQUERDA
PVCLV- PROGRAMA DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL
RFLP - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM
RIFI - REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA
RNA - ÁCIDO RIBONUCLÉICO (RIBONUCLEIC ACID)
SINAN: SISTEMA NACIONAL DE AGRAVOS NOTIFICADOS
SNAP - TESTE RÁPIDO PARA ANTICORPO CANINO LEISHMANIA - IDEXX
T CD4+ - Linfócito T CD4+
T CD8+ - Linfócito T CD8+
TH1 - LINFÓCITOS T AUXILIARES TIPO 1 (T HELPER-1)
TH2 - LINFÓCITOS T AUXILIARES TIPO 2 (T HELPER-2)
TNF- α – FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
TR - TESTE RÁPIDO
UFs – UNIDADES FEDERATIVAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fêmea de flebotomíneo <i>Lutzomyia</i> sp	22
FIGURA 2 - Leishmaniose Visceral no Mundo, 2018	25
FIGURA 3 - Mapa de estratificação dos municípios segundo Índice Composto do Triênio para Leishmaniose Visceral, Brasil, 2016-2018	26
FIGURA 4 - Casos de Leishmaniose Visceral Humana em Minas Gerais nos anos 2015 a 2020	28
FIGURA 5 - Casos de Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020 ..	29
FIGURA 6 - Representação por cores de casos de LVH e LVC em Teófilo Otoni nos anos 2016 a 2019	31
FIGURA 7 - Ciclo de transmissão da LVC em ambiente urbano	32
FIGURA 8 - Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> sp.....	34
FIGURA 9 - Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	34
FIGURA 10 – Manifestações clínicas de LVC em cães.....	37
Figura 11 – Estado de Minas Gerais com Destaque para a Região do Vale do Mucuri	49
Figura 12 – Esquema representativo de ações integradas de Políticas Públicas ao combate à Leishmaniose Visceral	51
FIGURA 13 – Esquema representativo da Estratégia Experimental.....	54
FIGURA 14 - Mapa de Minas Gerais com destaque para a Região do Vale do Mucuri de onde originaram as amostras da pesquisa	55
FIGURA 15 – Dispositivo de TR DPP positivo A (Amostra positiva) e negativo B (Amostra negativa)	55
FIGURA 16 - Dispositivo de TR SNAP/IDEX positivo A (Amostra positiva) e negativa B (Amostra negativa)	56
FIGURA 17 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados de acordo com os sinais clínicos	61
FIGURA 18 – Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por sexo	62
FIGURA 19 - Representação gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por sexo e sinais clínicos da doença	62
FIGURA 20 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por tipo de pelagem.....	63

FIGURA 21 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por idade	64
FIGURA 22 – Representação Gráfica da distribuição por bairros dos casos de LVC coletados de agosto/2019 a fevereiro/2020 na Clínica Veterinária São Francisco e no Canil Municipal de Teófilo Otoni/MG	65
FIGURA 23 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados de acordo com a procedência dos animais	67
FIGURA 24 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados de acordo com a procedência dos animais e que apresentaram sinais clínicos da doença.....	67
FIGURA 25 - Representação Gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultado positivo para o Teste Rápido de SNAP-IDEXX	71
FIGURA 26 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de animais positivos sintomáticos no teste SNAP em relação ao grupo de animais positivos assintomáticos no teste SNAP	71
FIGURA 27 - Representação Gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultados positivo ou negativo na cultura	72
FIGURA 28 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães sintomáticos com cultura de <i>Leishmania</i> sp positiva, cães sintomáticos com cultura de <i>Leishmania</i> sp negativa, cães assintomáticos com cultura de <i>Leishmania</i> sp positiva e cães assintomáticos com cultura de <i>Leishmania</i> sp negativa	73
FIGURA 29 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães com lâmina de Medula e lâmina de Pele de Orelha (PO) com visualização de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp (Positivas) e lâmina de Medula e lâmina de Pele de Orelha (PO) sem visualização de formas amastigotas (Negativas)	74
FIGURA 30 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães sintomáticos com lâmina de Medula Positiva e Negativa e cães assintomáticos com lâmina de Medula Positiva e Negativa para <i>Leishmania</i> sp	75
FIGURA 31 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães sintomáticos com lâmina de Pele de Orelha Positiva e Negativa e cães assintomáticos com lâmina de Pele de Orelha Positiva e Negativa para <i>Leishmania</i> sp	75
FIGURA 32 - Representação gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultados positivo e negativo para o Teste de PCR	77
FIGURA 33 – Foto resultado Teste PCR Amostras 1 a 67	78
FIGURA 34 – Foto resultado Teste PCR Amostras 68 a 132	78

FIGURA 35 - Representação Gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultados positivo para <i>L. infantum</i> (RFLP)	79
FIGURA 36 - Representação Gráfica do percentual de 69 cães avaliados que tiveram resultados positivo para <i>L. infantum</i> (RFLP) considerando o tipo de amostra	79
FIGURA 37 – Foto resultado PCR controles positivos e RFLP controles positivos para as espécies de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. guyanensis</i>	80
FIGURA 38 – Fotos resultado Teste RFLP Amostras positivas no PCR de medula óssea ...	80
FIGURA 39 – Fotos resultado Teste RFLP (Amostras Sangue de Medula e Cultura)	81
FIGURA 40 - Representação Gráfica do percentual de 132 cães avaliados que, no resultado final, tiveram diagnóstico positivo para Leishmaniose Visceral	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos de Leishmaniose Visceral Humana em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020	27
Tabela 2: Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020	29
Tabela 3: Frequência de casos Humanos confirmados de LV e LTA na macrorregião de Teófilo Otoni, nos anos de 2016-2020	30
Tabela 4: Resultados de Exames para detecção de LVC e eutanásias realizadas pelo Canil da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni – MG, no período de 2015 a 2020	30
Tabela 5: Comparação percentual de animais tratados e/ou vacinados com presença de sinais clínicos	68
Tabela 6: Diagnóstico comparativo com percentual de animais com sinais clínicos presentes ou ausentes nos testes sorológicos e parasitológicos	76
Tabela 7: Positividade nos testes diagnósticos sorológico SNAP, parasitológicos (Cultura e Lâminas) e moleculares PCR e RFLP	82

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO	18
2.0 - REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 – Leishmaniose Visceral.....	22
2.2 – Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina.....	24
2.3 – Ciclo de transmissão da LVC em ambiente urbano	31
2.4 – Ciclo Biológico da <i>Leishmania infantum</i> nas diversas espécies	33
2.5 – Resposta Imune e Patogênese na Leishmaniose Visceral	35
2.6 – Sintomas e Manifestações Clínicas.....	36
2.7 – Diagnóstico	38
2.7.1 – Métodos Sorológicos	40
2.7.1.1 – Método Sorológico Quantitativo (Teste rápido DPP Biomanguinhos)	41
2.7.1.2 – Método Sorológico Qualitativo – SNAP – ELISA (Teste rápido)	41
2.7.2 – Métodos Parasitológicos.....	42
2.7.3 – Método Molecular.....	43
2.8 – Tratamento.....	43
2.9 – Políticas Públicas no controle da Leishmaniose Visceral	49
3.0 – OBJETIVOS	52
3.1 – Objetivo Geral	52
3.2 - Objetivos Específicos.....	52
4.0 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 – Estratégia Experimental	53
4.2 – Local de Estudo	54
4.3 - Avaliação clínica dos animais e ficha epidemiológica	55
4.4 - Diagnóstico sorológico	55
4.5 – Diagnóstico parasitológico	56
4.6– Isolamento do parasito em meio de cultura	57
4.7 – Diagnóstico Molecular.....	58
4.8 – Análise estatística.....	59
5.0 – RESULTADO E DISCUSSÃO	60
5.1 – Características dos animais	60
5.2 – Diagnóstico sorológico	70
5.3 – Diagnóstico parasitológico	71

5.4 – Diagnóstico molecular	76
6.0 – CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
APENDICE – ANEXOS.....	100

1 - INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam, na atualidade, uma das mais importantes zoonoses do mundo e são causadas por espécies variadas de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* spp. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das doenças infecciosas de grande importância e a segunda principal doença causada por protozoário ficando atrás apenas da malária (BRASIL, 2009; OLEAGA et al 2018). É capaz de infectar diferentes espécies de mamíferos e dentre eles o homem, cão, raposas, marsupiais (TEIXEIRA NETO 2014; RIBEIRO et al 2019) e há relatos de casos em felinos (FERREIRA 2010; SANTOS et al 2018). A dificuldade no controle das infecções leishmanióticas explica-se pela grande diversidade de agentes etiológicos, grande número de espécies vetoras, e pela diversidade de animais que podem ser reservatórios destas doenças (TEIXEIRA NETO 2014). Cada área de transmissão possui características únicas que tornam necessários estudos epidemiológicos locais para investigar a(s) espécie(s) de *Leishmania*(s) circulante(s), bem como os vetores e reservatórios. Somente através desta avaliação é possível propor medidas de controle mais específicas e eficientes para a realidade de cada localidade estudada (TEIXEIRA NETO 2014). A doença pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania sp* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro, e pode ser dividida em dois tipos: a Leishmaniose Tegumentar (LT) a Leishmaniose Visceral (LV) (BRASIL 2017).

A LT tem ampla distribuição mundial e no Continente Americano, denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. A LTA é popularmente conhecida como “Úlcera de Bauru” e o principal agente causador é a *L. braziliensis*, mas possui outras espécies que fazem parte da cadeia epidemiológica da LT (BRASIL 2017). Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmanias* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (LANA 2014). Os agentes etiológicos causam lesões de pele e mucosa com sinais clínicos que variam conforme a espécie do agente causador e a resposta imunológica do hospedeiro (BRASIL, 2017; GAMA et al, 2009; JESUS et al, 2006; LANA 2014). A LTA é

considerada um sério problema na saúde pública, causando a leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e cutânea difusa (LCD) (DIAS et al 2018; GAMA et al, 2009). Alguns animais podem ser assintomáticos e por isso possuem um importante papel no ciclo da doença (JESUS et al, 2006).

A LV é uma doença infecciosa sistêmica grave, zoonótica, popularmente conhecida como “Calazar” causada por parasitos do complexo Donovanii, sendo a espécie *L. (L.) donovani* na África e na Ásia, e *L. (L.) infantum* no Mediterrâneo, China, norte da África, no Brasil e no restante da América Latina. (ALVARENGA 2013; BRASIL 2006; CORTEGIANO e CHUCRI 2020; SILVA 2007). Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida na época da colonização europeia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi* (GONTIJO e MELO 2004). Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone. Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (GONTIJO e MELO 2004). A *L. donovani* é responsável pela infecção em humanos, enquanto que a *L. infantum* e *L. chagasi* causam LV tanto em humanos quanto em cães (SILVA 2007). Atualmente *L. infantum* e *L. chagasi* são consideradas por muitos autores como espécies indistintas, portanto, trataremos do assunto da LV no continente americano como *L. infantum*, acatando a maioria dos trabalhos concernente a este tema (SILVA 2007).

As *Leishmania* spp são protozoários que parasitam as células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados. Os cães, quando infectados, podem não apresentar nenhuma sintomatologia clínica ou podem apresentar sintomas clássicos como lesões e descamação cutâneas, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, hepatomegalia, alopecia, dermatites, ceratoconjuntivite, edemas de patas e eventualmente vômitos que possivelmente estão relacionados à insuficiência renal (BRASILEISH 2015; CONTRERAS et al, 2019; FARIA 2012). Nos hospedeiros vertebrados, quando infectados, predomina a forma amastigota do parasito e nos flebotomíneos vetores, a forma promastigota. A transmissão do parasito para seres humanos e animais ocorre primariamente por meio da picada da fêmea de flebotomíneos infectados, popularmente conhecidos por “mosquito palha” (BRASIL 2014; BRASILEISH 2015; LANA 2014; NEVES 2005). Embora a principal forma de transmissão seja por intermédio da picada do flebotomíneo existem relatos de literatura de transmissão por transfusão sanguínea se um cão infectado for usado como doador (BRASILEISH 2015; FRANÇA A. O, 2018; FREITAS et al, 2006), transmissão venérea (BRASILEISH 2015;

SILVA et al., 2009a) e transplacentária (BRASILEISH 2015; SILVA et al., 2009b).

As Leishmanioses fazem parte do grupo das 17 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's) segundo a OMS, causadas por agentes infecciosos e parasitários (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) para as quais há um desinteresse comercial por parte dos grandes laboratórios, devido ao fato dessas doenças afetarem principalmente populações pobres (ALMEIDA et al, 2017; INCT – IDN 2013; SILVA; FIGUEIREDO e CARVALHO 2016), e se disseminam em meios em que há precária estrutura sanitária, condições de moradia e alimentação deficientes, além da dificuldade de acesso ao sistema de saúde pelas pessoas (ALMEIDA et al, 2017; SILVA; FIGUEIREDO e CARVALHO 2016). São doenças negligenciadas pelo capital por sua irrelevância enquanto nicho econômico rentável, não atraindo o interesse de investimentos por instituições financeiras internacionais, ou mesmo da indústria de medicamentos, embora, estudos recentes mostram a necessidade de investir em prevenção, pois certamente irá minimizar o impacto econômico causado por essa endemia que acomete um terço da população mundial, conferindo elevada morbidade às populações acometidas (VASCONCELOS et al, 2016).

O estudo epidemiológico desta doença torna-se importante, pois nosso país apresenta quadros graves de epidemias e endemias (GONTIJO e MELO, 2004; ROEDER-FERRARI et al 2020; SOUZA et al 2013). Considerando o potencial zoonótico da doença, o controle de infecções nos reservatórios é vital para restringir a transmissão da leishmaniose visceral para humanos (NOLI e SARADOMICHELAKIS 2014; ROEDER-FERRARI et al 2020). A complexidade do controle é mais evidente quando consideramos que existem lacunas no conhecimento sobre cada aspecto estudado, incluindo a distribuição geográfica do parasito, insetos vetores, fontes de infecção, fatores históricos e socioeconômicos, integração dos serviços de saúde, técnicas utilizadas para o diagnóstico, tratamento e imunoprofilaxia (DANTAS-TORRES et al 2012; GONTIJO e MELO 2004).

No programa de controle da leishmaniose visceral no Brasil, a ação direcionada ao reservatório canino é restrita ao abate animais soropositivos, que são identificados pela condução da pesquisa de amostras ou censos. Nas recomendações do Ministério da Saúde, não há atividades diretamente relacionadas à investigação de potenciais fatores de risco associados à infecção em cães examinados (BRASIL, 2014). Dada a relevância de tais atividades para melhor compreensão da dinâmica da doença e para definir melhores medidas de controle de alvo (COURA-VITAL et al, 2011), é importante esse tipo de investigação através de pesquisas e na rotina do Serviço de Saúde e Vigilância Sanitária dos municípios (ROEDER-FERRARI et al 2020).

A aquisição de conhecimento e medida de controle sobre os fatores envolvidos na dinâmica de transmissão da LV em áreas urbanas e periurbanas é ainda um grande desafio para a saúde pública e pouco ainda se sabe sobre as variáveis que determinam a distribuição da doença nestes ambientes, particularmente sobre infecção canina (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; COURA-VITAL 2011; ROEDER-FERRARI et al 2020; SILVA et al, 2012; SOUZA et al 2013). Além disso, há um desconhecimento e lacunas conceituais nos profissionais de saúde acerca das causas para surgimento da doença e fatores relacionados o que dificulta um trabalho eficaz para a vigilância sanitária dos municípios no intuito de controlar essa doença (ARAUJO et al, 2020; BELO et al., 2013; OMS, 2015)

Dessa forma, estudar e identificar as espécies de *Leishmania* spp presentes na infecção canina na macrorregião de Teófilo Otoni, MG, é de interesse para estabelecer medidas eficientes de controle, já que a qualificação e a quantificação parasitária em diferentes amostras caninas podem ser úteis na indicação do grau de participação do mesmo como fonte de infecção para humanos.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - Leishmaniose Visceral

É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das doenças infecciosas de grande importância e a segunda principal doença causada por protozoário ficando atrás apenas da malária (OMS, 2010). Cerca de 200.000 a 400.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) ocorrem no mundo todos os anos. No Brasil, a LV está presente em praticamente todos os estados, com uma média de 3000 novos casos por ano, com prevalência variando de 1,9% a 35% em áreas endêmicas e com alta taxa de letalidade (OMS, 2019).

A LV é uma zoonose, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). No Brasil, a transmissão desse parasita ocorre essencialmente através da picada do mosquito palha fêmea *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (Figura 1) previamente infectado com *Leishmania infantum*. A fêmea flebótoma ao fazer o repasto sanguíneo – pois necessita de sangue para maturar o aparelho reprodutor e fazer a oviposição – é infectada ao ingerir formas amastigotas do hospedeiro contaminado (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; ROSYPAL, ZAJAC e LINDSAY 2003; VAZ et al, 2020). Os cães são os principais reservatórios domésticos desse agente etiológico (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; ROCHA et al, 2020) e podem apresentar amplos sintomas dependendo das interações entre a resposta imune do hospedeiro e o parasita (MARCELINO et al, 2020).

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo *Lutzomyia* sp



Fonte: Collins 2011

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa sistêmica. É

uma importante questão veterinária e também um desafio à saúde pública, devido ser uma potencial zoonose (COURA-VITAL et al, 2011). Hoje, ao tratarmos de questões de saúde, é preciso pensar de uma maneira mais global e entender que a saúde deve ser tratada como saúde única já que existe uma relação direta entre humanos, animais e meio ambiente (SOUZA et al 2013).

A Leishmaniose Visceral Humana (LVH) está em franca expansão e distribuída nas cinco regiões geográficas do Brasil, sendo o Nordeste a região em que há o maior número de casos registrados. O principal reservatório urbano do agente etiológico da LVH é o cão doméstico e sabe-se que casos caninos antecedem o aparecimento de casos humanos (ALVAR et al, 2004; DIAS et al 2018; OLEAGA et al 2018; RIBEIRO et al 2019; VAZ et al, 2020). Devido ao desequilíbrio ecológico ocasionado pela invasão das cidades para áreas rurais, cada vez aumenta mais o número de casos de LVC e conseqüentemente o número de casos humanos. A presença de mata nas proximidades das residências, cães errantes e outros animais silvestres circulando pelas cidades, a falta de saneamento básico e destino inadequado de resíduos são fatores que podem estar associados à manutenção da *L. infantum* nos centros urbanos (LIMA et al, 2019; RIBEIRO et al 2019). Uma vez que a soro prevalência de LVC em áreas urbanas aumente, é preciso reforçar o monitoramento de cães soro reagentes e outras medidas de controle que sejam eficientes para impedir a transmissão do parasito de cães para humanos.

Uma das medidas de controle usadas para controlar a LVC é a eutanásia de cães soro positivos baseada no DECRETO Nº 51.838, DE 14 DE MARÇO DE 1963 (BRASIL 2020) (Anexo 6). A identificação e sacrifício do cão são atividades preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LVH. Esta recomendação está respaldada, dentre outras, na consideração de que, sendo o cão importante reservatório da doença para o ser humano, a doença canina precede a doença humana, sendo a primeira um dos responsáveis pelo avanço tanto espacial como temporal da segunda (ALVES e BEVILACQUA, 2004; RIBEIRO et al 2019).

O método de eutanásia de cães infectados é questionável, devido às dificuldades na realização de pesquisas nas áreas silenciosas, a eficácia das medidas de controle para prevenção da LVC, posicionamento favorável do tratamento para cães infectados pela maioria dos médicos veterinários e falta de consenso na literatura (MARCELINO et al, 2020; PALATNIK de SOUSA et al, 2001; RIBEIRO et al 2019; SOUSA-PAULA et al, 2019). Existe controvérsia relativa a esta estratégia incluindo a correta identificação dos cães positivos e a variação temporal da relação hospedeiro-parasita, o que torna esta medida ainda mais desafiadora (NUNES et al, 2015).

Contrapondo a afirmação acima, OLIVEIRA e ARAÚJO (2003) afirmam que: “a

observação da curva de casos humanos e dos índices da sorologia em cães no país revela que na última década foi constatado aumento dos casos humanos apesar da redução das taxas de soropositividade canina”. Portanto, somente a eutanásia de cães soro positivos é ineficiente para controlar a LVC e frear o aumento de casos humanos (MARCELINO et al, 2020). O diagnóstico da LVC tem por objetivo confirmar a presença do parasito e aliar ao histórico, sinais clínicos e anormalidades compatíveis com a doença e sua manifestação. Isso permite investigar a presença da infecção, seja para fins epidemiológicos ou clínicos em regiões endêmicas, para prevenir a transmissão do parasito e para monitorar resposta ao tratamento (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Ações de controle integradas devem ser implementadas como medidas de controle do vetor, ampliação de programas de saneamento básico com investimentos em infraestrutura sanitária e investimento maciço em educação da população para se obter êxito no controle desta Zoonose (VAZ et al, 2020). Um ponto importante a ser considerado é a diferenciação entre animais não infectados sadios, expostos, infectados sadios e infectados doentes (BRASILEISH 2015). O Diagnóstico em cães infectados é uma prioridade para permitir medidas apropriadas de contenção da doença (VAZ et al, 2020).

Torna-se assim, importante estabelecer medidas eficientes de diagnóstico e controle, já que a qualificação e a quantificação parasitária em diferentes amostras clínicas nos cães podem ser úteis na indicação do grau de participação do mesmo como fonte de infecção (GAMA et al, 2009).

2.2 – Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

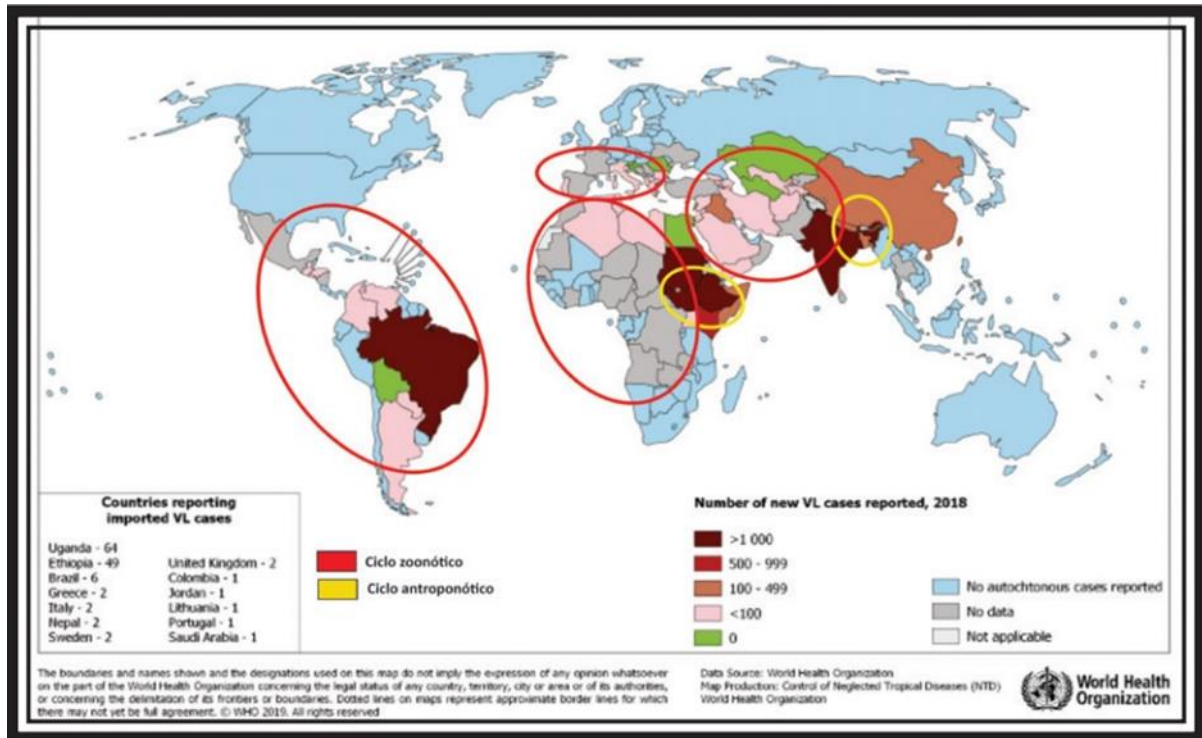
Existem dois principais ciclos de transmissão da doença no mundo: o antroponótico e o zoonótico. O ciclo antroponótico ocorre principalmente na Ásia e África, em países como Índia, Nepal, Bangladesh, Etiópia e Sudão. Nesse ciclo, o ser humano é o principal reservatório do parasita *Leishmania donovani* e a transmissão ocorre de homem para homem através de vetores que são flebotomíneos de espécies diferentes das que estão envolvidas no ciclo que ocorre nos países da Europa e das Américas (BRASIL, 2020; SILVA et al, 2013).

Na Europa e nas Américas, o ciclo de transmissão é zoonótico, no qual o protozoário da espécie *Leishmania infantum* é transmitido por meio da picada de um flebotomíneo infectado que fez o repasto sanguíneo em reservatório animal (SILVA et al, 2013). As espécies de flebotomíneos vetores nas Américas e na Europa são diferentes. Na Europa, a principal espécie é a *Phlebotomus perniciosus*. No Brasil, a *L. longipalpis* ou *L. cruzi* são as espécies incriminadas, enquanto que, em outros países da Américas (Colômbia, Venezuela, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Nicarágua e México), além da *L. longipalpis*,

a *L. evansi* é considerada um vetor da doença (BRASIL 2020; RIBEIRO et al 2019).

A LV tem ampla distribuição mundial sendo endêmica em 75 países, no entanto, 90% dos casos são reportados em sete países: Brasil, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia, Quênia e Somália (Figura 2) (BRASIL, 2020).

Figura 2 - Leishmaniose Visceral no Mundo, 2018.



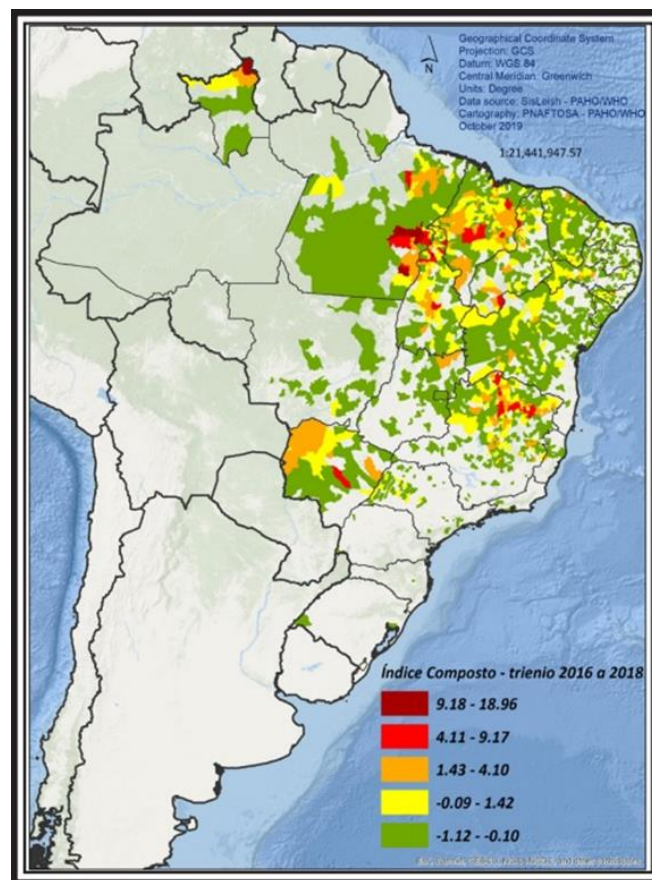
Fonte OMS (BRASIL 2020)

Nas Américas, a LV é uma zoonose de ampla distribuição, endêmica em 12 países e anualmente são reportados a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS/OMS) cerca de 3.500 casos. No período de 2014 a 2018 foram registrados 18.085 casos na Argentina, Brasil, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Uruguai e Venezuela, no entanto, o Brasil é responsável por 96% (17.372) dos casos, seguidos por Paraguai (327), Venezuela (162) e Colômbia (134) (SisLeish-OPS/OMS – Dados disponíveis pelos países endêmicos) (Brasil, 2020).

No Brasil desde a década de 1980 a doença deixou de ser considerada tipicamente rural e passou a ser diagnosticada em grandes centros urbanos (ROEDER-FERRARI et al 2020). Em 2018 foram registrados 3.466 casos distribuídos em 920 municípios de 23 UFs, com incidência de 1,66 casos/100.000 hab., segundo a população geral do País. Aproximadamente 3.500 casos humanos de LV são notificados anualmente no Brasil, sendo que aproximadamente 70% estão concentrados na região Nordeste (BRASIL 2015). Nos

últimos três anos, dentre as regiões com a tendência crescente na taxa de letalidade, destacamos os estados com as maiores e menores taxas: a) região Nordeste: Sergipe (15,3%), Piauí (9,6%), Pernambuco (6,83%) e Alagoas (6,96%); b) região Norte: Pará (5,76%), Roraima (5,36%) e Tocantins (4,50%); c) região Sudeste: Rio de Janeiro (15,33%); Minas Gerais (11%) e Espírito Santo (2,23%) (Brasil, 2020) (Figura 3).

Figura 3 - Mapa de estratificação dos municípios segundo Índice Composto do Triênio para Leishmaniose Visceral, Brasil, 2016-2018.



Fonte: SisLeish – OPS/OMS – Dados disponíveis pelos países

Quanto aos casos de leishmaniose visceral canina, os números divulgados restringem-se a determinados estados ou municípios, e não são encontrados dados oficiais quantificando os casos totais no Brasil ou na América do Sul. Sabe-se que o número de cães infectados é muito maior que o número de casos clínicos confirmados, dificultando, do ponto de vista epidemiológico, o controle da doença (GHARBI et al 2015; ROEDER-FERRARI et al 2020).

Na região sudeste, Minas Gerais é um dos estados com maior prevalência da doença (Brasil 2020). Além disso, nos últimos anos, as estatísticas da Secretaria Municipal de

Saúde de Teófilo Otoni apontam um aumento significativo no número de casos de LTA e LVH neste Município. (Figura 6)

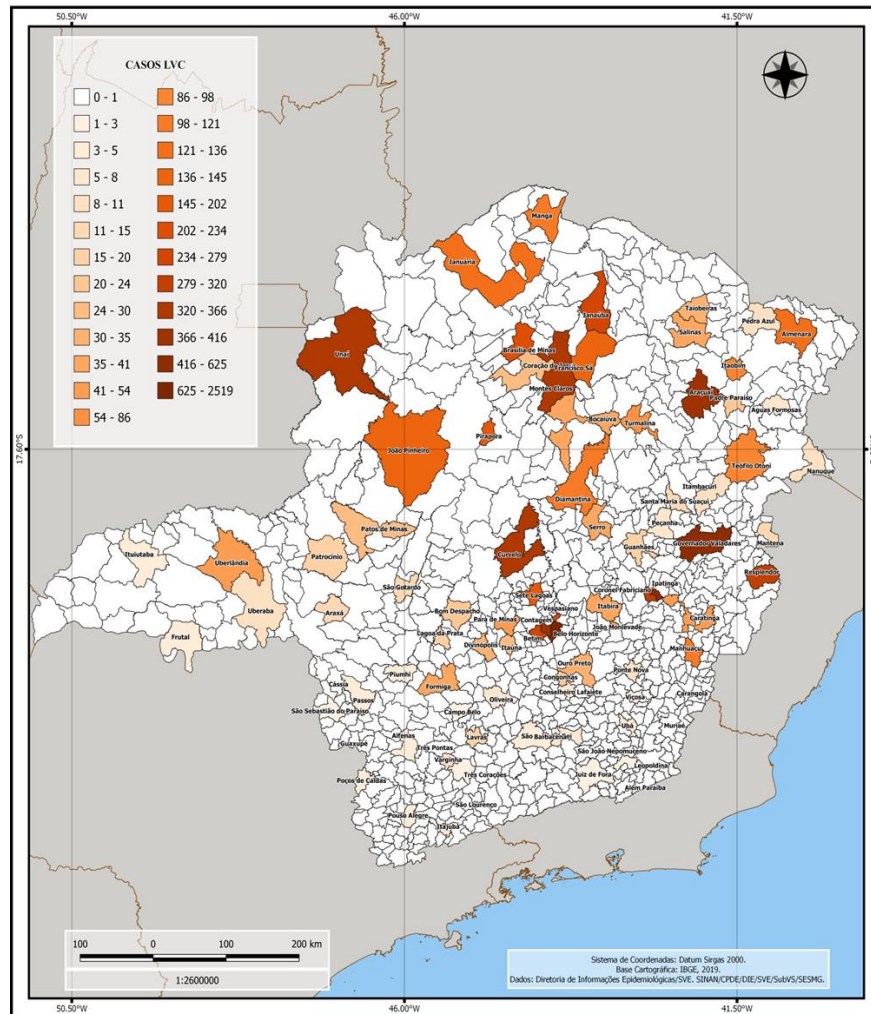
Tabela 1: Casos de Leishmaniose Visceral Humana em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020

Casos notificados (suspeitos/confirmados) de LVH por local de residência - Minas Gerais

Ano da notificação	Notificações
2016	1742
2017	2151
2018	1690
2019	1512
2020	939
Total (n)	8034

Fonte: SINAN/CPDE/DIE/SVE/SubVS/SESMG - Acesso: 12/01/2021

Figura 4 - Casos de Leishmaniose Visceral Humana em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020.



Fonte: SINAN/CPDE/DIE/SVE/SubVS/SESMG

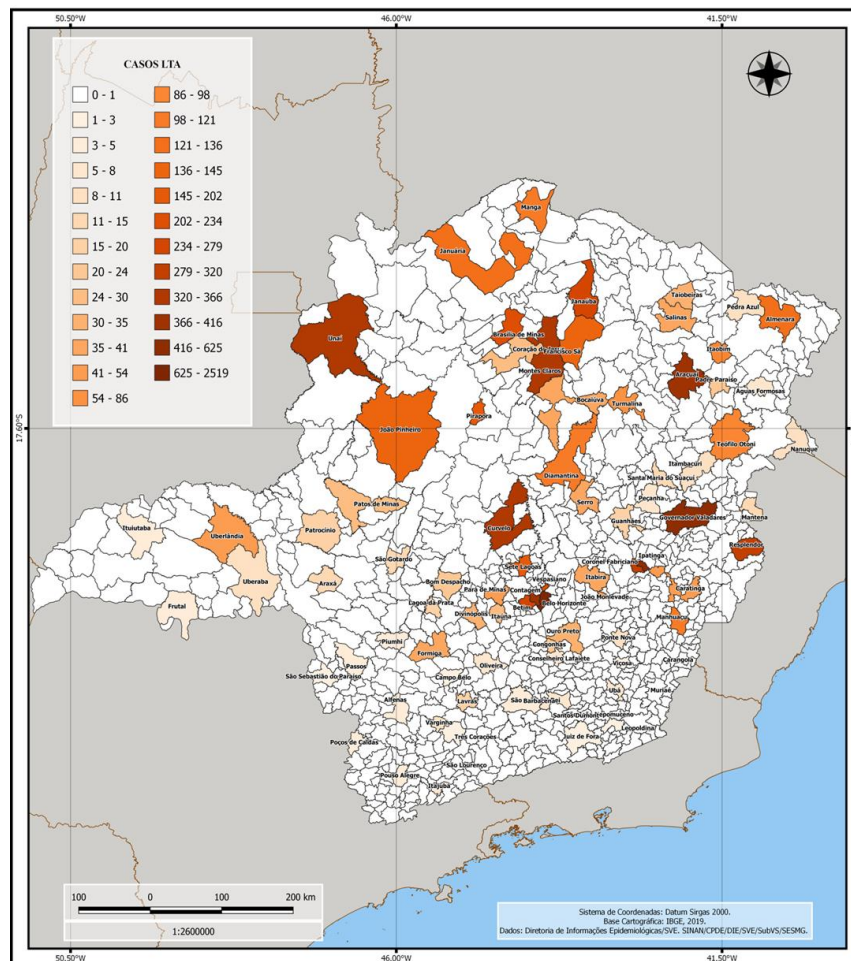
Tabela 2: Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020

Casos confirmados de LTA Humana por local de residência - Minas Gerais

Ano do diagnóstico	Notificações
2016	1191
2017	1725
2018	1892
2019	2089
2020	1706
Total (n)	8703

Fonte: SINAN/CPDE/DIE/SVE/SubVS/SESMG - Acesso: 12/01/2021

Figura 5 - Casos de Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais nos anos 2016 a 2020



Fonte: SINAN/CPDE/DIE/SVE/SubVS/SESMG

De acordo com os dados da Secretaria de Saúde de Minas Gerais, verificamos que a maior prevalência tanto da LVC como da LTA está concentrada nas regiões Norte e Nordeste do Estado.

Tabela 3: Frequência de casos Humanos confirmados de LTA e LVH na macrorregião de Teófilo Otoni, nos anos de 2016-2020

	Frequência de notificação por ano				
	2016	2017	2018	2019	2020
LTA	21	28	58	112	93
LVH	14	25	10	3	3

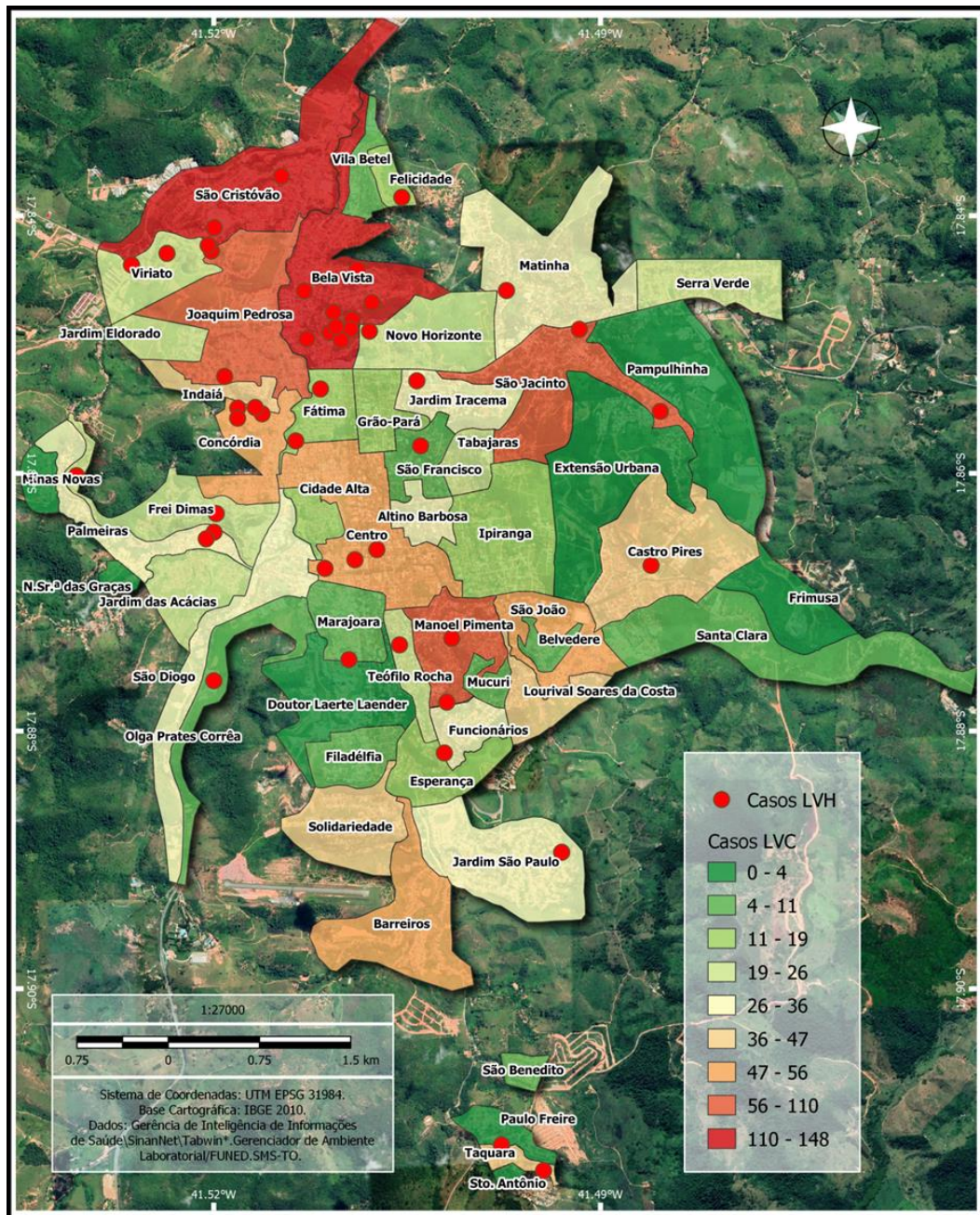
Dados coletados no SINAN NET.

Segundo dados atualizados da Vigilância Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde de Teófilo Otoni estes foram os números de animais eutanasiados no período de 2015 a 2020. Estes números estão relacionados com a frequência de realização de testes nos diversos bairros pelo setor de vigilância sanitária do município (Tabela 2)

Tabela 4 - Resultados de Exames para detecção de LVC e eutanásias realizadas pelo Canil da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni – MG, no período de 2015 a 2020.

Resultados de Exames para detecção de LVC e Eutanásias realizadas pelo Canil da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni – MG, no período de 2015 a 2020							
Ano	DPP Realizados	DPP +	DPP + %	ELISA Realizados	ELISA +	ELISA + %	Eutanásias
2015	1274	139	10,91%	105	88	83,81%	245
2016	1926	682	35,41%	59	42	71,19%	-
2017	2588	377	14,57%	422	291	68,96%	293
2018	2361	318	13,46%	318	254	80,00%	277
2019	1733	205	11,83%	166	102	61,14%	160
2020	601	114	18,97%	148	90	60,81%	113
Total	10.483	1835	17,50%	1218	867	71,19%	1088

Figura 6 - Representação por cores de casos de LVH e LVC em Teófilo Otoni nos anos 2015 a 2019



2.3 - Ciclo de transmissão da LVC em ambiente urbano

No ciclo epidemiológico da LV, os cães (*Canis familiaris*) são os animais domésticos mais importantes reservatórios de *L. infantum* (Figura 7) (ALVES 2006; CORTEGIANO e CHUCRI 2020; COURA-VITAL et al 2014; DANTAS-TORRES et al 2012; ROEDER-FERRARI et al 2020; ROCHA et al, 2020). A alta prevalência de infecção

canina em áreas endêmicas, o parasitismo cutâneo intenso apresentado por animais infectados e sua estreita relação de convivência com os humanos reforçam a importância dos cães no ciclo de transmissão da doença (COURA-VITAL 2011; ROEDER-FERRARI et al 2020; SCHIMMING e PINTO, 2012).

Figura 7 – Ciclo de transmissão da LVC em ambiente urbano: Infecção ocorre através da picada do flebótomo *L. longipalpis* em cães infectados que infectam outros cães e os seres humanos.



Fonte: DIVE 2018 - Guia de Orientação para a Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) - Santa Catarina - 2018

Com o objetivo de impedir a disseminação da LV no país, o Ministério da Saúde no Brasil adotou ações integradas, por meio do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) (ROCHA et al, 2020) sendo seu enfoque centrado não apenas nos estados e municípios com transmissão, mas também o de incorporar nas ações de vigilância e controle da mesma, os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em novas áreas (BRASIL 2006).

O PVCLV possui diretrizes focadas em vigilância epidemiológica (caso humano, entomológica e de reservatório), ações preventivas e ações de controle. Os objetivos do Programa são o de reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, bem como diminuir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e do agente transmissor. A análise da

situação epidemiológica indicará as ações de prevenção e controle a serem adotadas (ALVES 2006; COURA-VITAL 2014; PEDRASSANI et al, 2019).

Uma das medidas de controle da leishmaniose visceral (LV) no Brasil se baseia na identificação e eliminação do reservatório canino (ALVES 2006; COURA-VITAL et al 2014; NUNES et al, 2015). A partir de 2011, o Ministério da Saúde Brasileiro implementou a eutanásia de cães soropositivos para LV como uma medida para impedir a expansão da doença no país, usando o sistema imunocromatográfico da Plataforma de Caminho Duplo Teste Rápido (TR-DPP) como método de rastreamento e imunoenensaio enzimático (ELISA) como teste confirmatório para o diagnóstico. Cães assintomáticos e sintomáticos com resultados positivos em ambos os testes são considerados soropositivos e recomendados para a eutanásia (ALMEIDA et al, 2017; ROCHA et al, 2020). Cães com divergência na sorologia entre esses testes permanecem na casa de seus proprietários e parte deles, mesmo não apresentando resultado positivo no teste inicial podem se tornar positivos num segundo teste que deverá ser realizado dentro de trinta dias (ALMEIDA et al, 2017). Portanto, mesmo adotando a eutanásia de cães soropositivos, parte da população canina continuará a servir como fonte de infecção por *Leishmania* spp para o flebótomo *L. longipalpis*, causando novos casos caninos e/ou humanos da doença (ALMEIDA et al, 2017; ROCHA et al, 2020). Com o objetivo de impedir a expansão da LVH e LVC no município de Teófilo Otoni, ações de controle integradas devem ser implementadas por meio de Programas de Vigilância e Controle de Leishmanioses.

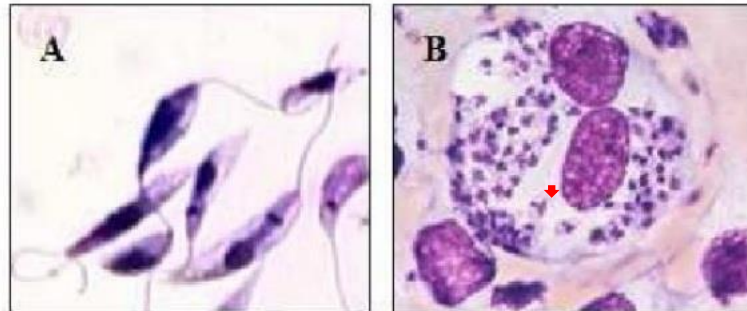
2.4 - Ciclo Biológico da *Leishmania infantum*

A leishmaniose canina ocasiona impacto na medicina veterinária e também na saúde humana (BRASIL, 2006). É importante conhecermos bem o ciclo de vida do parasito para melhor evitar a transmissão da doença.

A *L. infantum* é um parasita difásico heteroxênico que completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um inseto díptero flebotomíneo hematófago da subfamília Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), onde somente as fêmeas são hematófagas, que alberga a forma flagelada chamada promastigota, e um mamífero no qual se desenvolve a forma intracelular não flagelada chamada amastigota. As formas promastigotas (Figura 8A) ao serem inoculadas pelo mosquito na pele dos mamíferos são fagocitadas por macrófagos e se diferenciam em formas amastigotas (Figura 8B) que se multiplicam por divisão simples e infectam novos macrófagos. Esses macrófagos se rompem e as formas amastigotas caem na corrente sanguínea, geralmente são ingeridas pelo flebótomo *L. longipalpis* e são liberadas no seu intestino onde se diferenciam em promastigotas procíclicas que se multiplicam e se

diferenciam em promastigotas metacíclicas. As formas promastigotas metacíclicas migram para a válvula faríngea e assim, durante o repasto, recomeça o ciclo com a picada do flebotomo em mamíferos (ALVARENGA 2013) (Figura 9). Os flebotomíneos vivem em biótopos abundantes em matéria orgânica e umidade. A sua atividade é fundamentalmente crepuscular e só as fêmeas são hematófagas (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; SILVA, 2015).

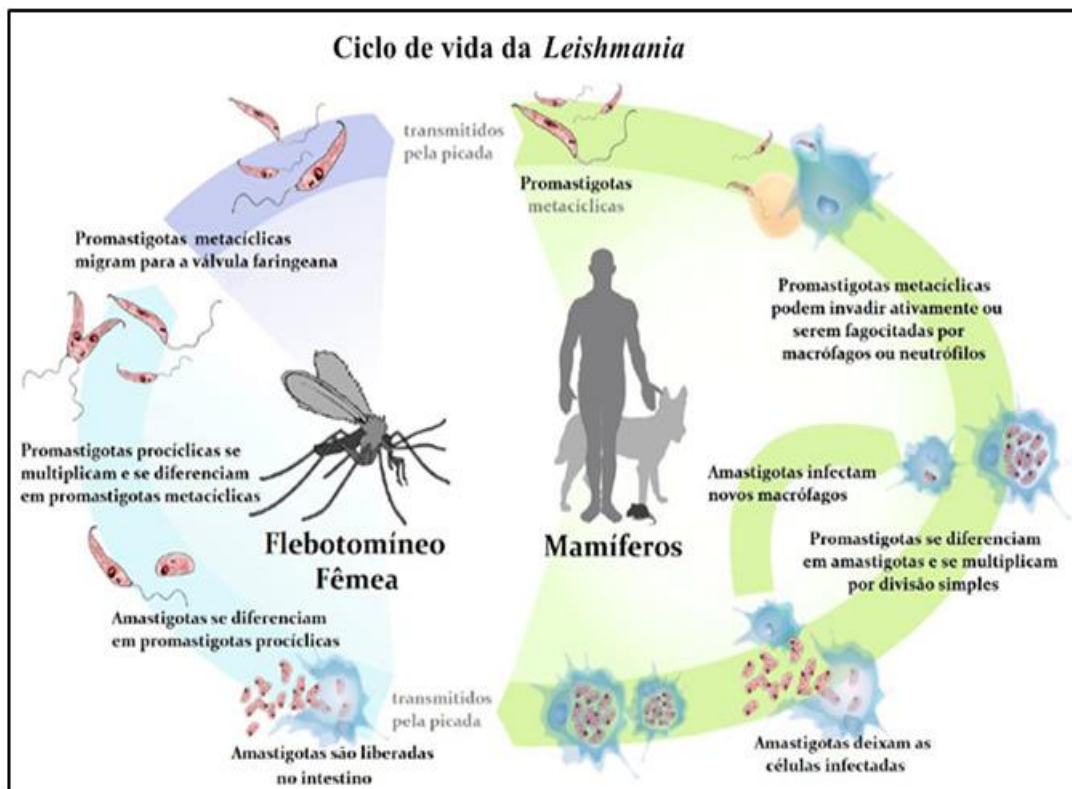
Figura 8 - Formas evolutivas da *Leishmania* sp.



Fontes: Science Photo, 2008; Leish Domus, 2008.

Formas promastigotas encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (A) e Formas amastigotas (seta) encontradas parasitando os macrófagos do hospedeiro vertebrado (B).

Figura 9 – Ciclo de vida da *Leishmania infantum*



Fonte: <http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295>

Transmissão pela picada do flebótomo *L. longipalpis* em mamíferos; Formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos; Formas promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão simples; Amastigotas infectam novos macrófagos; Amastigotas saem das células infectadas e caem na corrente sanguínea; Formas amastigotas (livres na corrente sanguínea ou dentro de macrófagos) são ingeridas pelo flebótomo *L. longipalpis*; Amastigotas são liberadas no intestino dos flebótomos; Formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas; Formas promastigotas procíclicas se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicas; Formas promastigotas metacíclicas migram para a válvula faríngea; e recomeça o ciclo com a picada do flebótomo em mamíferos.

Assim que *L. infantum* se localiza na derme do hospedeiro a progressão da infecção depende principalmente da eficácia da resposta imunitária do hospedeiro (ALVAR et al, 2004; PAPADOGIANNAKIS & KOUTINAS, 2015; TEIXEIRA 2019). Se o cão for capaz de desenvolver uma resposta imunitária eficaz, a infecção é controlada e o cão permanece infectado, mas sem desenvolver sinais clínicos nem lesões (infecção subclínica e animal é assintomático). Pelo contrário, quando o cão desenvolve uma resposta imunitária que não é eficaz, a infecção evolui e o cão desenvolve os sinais clínicos clássicos da doença. Deste modo, a leishmaniose canina é uma doença em que a infecção não é sinônimo de doença clínica (SOLANO-GALLEGO et al, 2001; BANETH et al, 2008).

2.5 - Resposta Imune na Leishmaniose Visceral

O processo de instalação da Leishmaniose no hospedeiro é determinado por uma complexa associação de fatores como a espécie de *Leishmania* sp, sua virulência e tropismo, além da condição genética, imunológica e nutricional do hospedeiro. Em decorrência disso, é importante compreender os mecanismos da resposta imune contra o protozoário, os tipos celulares, as citocinas e o perfil da resposta imune envolvida nesse processo, uma vez que, esses fatores podem conferir resistência ao parasito (ESPIR 2013). Isso ocorre primariamente, devido aos genes que codificam proteínas de escape no "DNA" extranuclear do cinetoplasto (kDNA), presente nestes organismos, constituindo assim, uma característica marcante da ordem Kinetoplastida com peculiaridades únicas e um mecanismo ímpar de replicação (ALVARENGA 2013; FERREIRA 2010; LOPES 2010; SOARES 2007), aumentando a chance do hospedeiro sair ileso da infecção, ou favorecer o desenvolvimento da infecção, permitindo várias formas de manifestações clínicas.

Assim como as infecções parasitárias, as infecções por *Leishmania* spp levam a uma ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Quando ocorre a infecção o macrófago infectado é ativado e ocorre uma expansão de vários tipos de células, que pode ser caracterizada pelo aumento de células T CD4+, apresentando um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (HOLZMULLER, BRAS-GONÇALVES e LEMESRE 2006; REIS et

al., 2006). Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas, ativando os macrófagos e, conseqüentemente, levando a destruição dos parasitos (PAPADOGIANNAKIS & KOUTINAS, 2015). Mas, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação de macrófagos e, conseqüentemente, as formas clínicas aparecerão (ALMEIDA et al., 2017; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2006; TEIXEIRA 2019).

A IL-4 tem importante papel na resposta imune, pois leva a diminuição da expressão da subunidade β da IL-12 nas células Th1, levando ao desenvolvimento de Th2, proporcionando assim o aparecimento da doença. A IL-10 é outra citocina presente que abaixa a apresentação de antígenos e a produção de IFN- γ , inibindo a ativação do macrófago, levando a uma resposta humoral com favorecimento da instalação e permanência da infecção. Por sua vez, a IL-12 ativa as células NK e células T (CD4+ e CD8+) para produzirem IFN- γ que é uma citocina pró-inflamatória e mediadora da resistência inata contra o parasita (ESPIR 2013).

As *Leishmania* spp são capazes de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2 (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; REIS et al., 2006). O principal fator responsável pela patologia é o estado imunológico do hospedeiro. A predominância da Resposta Celular (Th1) leva à imunidade e cura, e a Resposta Humoral (Th2) leva às formas crônicas da doença (PAPADOGIANNAKIS & KOUTINAS, 2015; TEIXEIRA 2019). Há um consenso geral que as células T e a imunidade mediada por células contribuem para a patogênese da LVC. Embora altos títulos de anticorpos sejam observados em todas as manifestações clínicas, ainda não está completamente esclarecido o papel de anticorpos específicos na imunidade contra as *Leishmania* spp (SOUZA et al, 2005; TRUJILLO et al, 1999).

2.6 – Sintomas e Manifestações Clínicas na Leishmaniose Visceral Canina

A presença de sinais clínicos da doença varia dependendo das interações entre a resposta imune do hospedeiro e o parasita (DIVE 2018). Alguns fatores como a espécie de *Leishmania* e sua patogenicidade, além da condição genética, imunológica e nutricional do hospedeiro estão diretamente relacionados com o aparecimento de sintomas ou não (CONTRERAS et al 2019; ESPIR 2013). A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (SILVA 2007). Atualmente, a infecção por leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido mais prevalente em cães do que no homem, sendo fundamental estudar o perfil epidemiológico da enfermidade e suas características (CORTEGIANO e CHUCRI 2020).

A apresentação clínica da LVC é complexa e difícil de ser definida com exatidão, por ser extremamente variada devido aos fatores que podem influenciar o desenvolvimento dessa enfermidade. Dentre esses, a multiplicidade de órgãos que podem ser afetados, (baço, linfonodos, pele, medula óssea, sangue e epitélio conjuntival) as características patogênicas e a diversidade de sinais que a *Leishmania infantum* pode provocar, a resposta imunológica do animal, a variabilidade do período de incubação, e a presença de outras doenças com espectro clínico similar ou que se comportam como coinfeções (GHARBI et al. 2015; MARCELINO et al, 2020; SOLANO-GALLEGO et al. 2011; TEIXEIRA 2019).

Nos cães o período de incubação pode variar de 3 meses a 1 ano ou mais, mas na média fica entre 3 e 6 meses (BRASIL 2019; ROEDER-FERRARI et al 2020), podem estar infectados e não apresentarem sintomatologia alguma bem como podem apresentar sintomas clássicos como ceratoconjuntivite (Fig 110a), onicogribose (Fig 4b), edemas de patas, alopecia, lesões e descamação cutâneas (Fig 10c), dermatite generalizada com seborréia (Fig 10d), linfadenopatia (Fig 10e), perda de peso (Fig 10f), esplenomegalia, hepatomegalia, e eventualmente vômitos que possivelmente estão relacionados a insuficiência renal (FARIA e ANDRADE 2012; ROEDER-FERRARI et al 2020); SOLANO-GALLEGO et al, 2011; TEIXEIRA 2019).

Figura 10 – Manifestações clínicas mais comuns de LVC em cães; (a) ceratoconjuntivite purulenta e dermatite periocular, (b) Onicogribose, (c) lesões de pele, dermatite esfoliativa, (d) dermatite generalizada com seborreia, linfadenomegalia, (e) e caquexia (f).



Fonte: Arquivo próprio

Animais infectados podem ser assintomáticos, mesmo sendo sorologicamente positivos, não apresentam nenhum sintoma clínico, portanto não levantam qualquer suspeita clínica da doença, tendo um bom prognóstico (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012; SOLANO-GALLEGO et al, 2011). Alguns animais infectados apresentam sintomas quase imperceptíveis (Oligossintomáticos) como linfadenomegalia isolada e dermatite com localização definida e bem discreta com prognóstico bom a reservado. Temos animais com sintomatologia moderada que apresentam uma sintomatologia mais significativa com lesões cutâneas difusas ou simétricas, dermatite esfoliativa generalizada, onicogribose, hiperqueratose (Focinho e coxins), ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), linfadenomegalia generalizada, perda de apetite e perda de peso. Nestes casos já temos um prognóstico reservado a ruim e a recuperação clínica do animal é bastante comprometida. Além de toda a sintomatologia dos sintomáticos moderados alguns animais ainda apresentam lesões relacionadas a deposições de imunocomplexos (Uveíte, úlceras profundas em pontas de orelha e glomerulonefrite), que são considerados sintomas graves e o animal apresenta um prognóstico reservado a ruim (BRASIL 2015; BRASILEISH 2018; SOLANO GALLEGO et al, 2011; TEIXEIRA 2019). E por último, temos aqueles animais sintomáticos muito graves com prognóstico totalmente desfavorável, pois já se encontram num estado de saúde totalmente comprometido e, além do quadro clínico dos sintomáticos graves, o animal apresenta tromboembolismo pulmonar e Síndrome nefrótica/doença renal grave (BRASILEIH 2018; GHARBI et al. 2015; TEIXEIRA 2019).

2.7 – Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses pode ser realizado através de métodos clínicos, epidemiológicos, parasitológicos, imunológicos e moleculares. Em áreas endêmicas o diagnóstico clínico e epidemiológico dessas zoonoses é dificultado pela similaridade clínica com outras doenças, tornando a utilização de exames laboratoriais de suma importância para confirmação diagnóstica (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; MEDEIROS 2013). Além disso, o diagnóstico clínico da LVC é bastante difícil, principalmente devido à grande ocorrência de animais assintomáticos; pois esses animais podem passar despercebidos, mesmo quando examinados pelo mais experiente especialista. Podemos dizer que nenhum dos sinais da LVC é patognomônico, podendo ser confundidos com inúmeras outras patologias caninas, como hemoparasitoses, dermatopatias, desnutrição, entre outras (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; SILVA 2009). Em áreas rurais, diversos fatores podem estar associados, especialmente endo-

ectoparasitoses e desnutrição, o que pode modificar ou mascarar o quadro clínico da LVC (LANA 2014; SILVA 2009; SILVA et al. 2017).

Diversas técnicas têm sido avaliadas ou utilizadas na detecção de anticorpos no diagnóstico do calazar canino: imunoenzimáticas, testes de aglutinação direta (DAT) e testes imunocromatográficos e imunoenzimáticos que utilizam como antígenos, proteínas recombinantes derivadas de leishmanias (BISUGO et al, 2007; CONTRERAS et al, 2019). Antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido testados como ferramentas para melhorar o diagnóstico da LVC. A proteína K39, membro da família das cinesinas, que é bastante conservada entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, tem sido amplamente avaliada sob a forma recombinante (rK39) como antígeno em ELISA (ALVARENGA 2013; FARIA e ANDRADE 2012; FERREIRA 2010). O uso de antígenos recombinantes, de um modo geral, aumenta a especificidade de testes diagnósticos se comparado ao uso de antígenos brutos (FARIA e ANDRADE 2012). Recentemente uma nova versão do Teste Rápido de Anticorpo contra *Leishmania donovani* foi produzida que difere pelo acréscimo de um segundo antígeno, o K26 (também uma cinesina conservada no complexo *L. donovani*) (DANTAS TORRES et al 2017; HARALAMBOUS 2008), como forma de corrigir a sensibilidade do seu ensaio, haja visto que o K39 apenas identifica casos de LV ativa, deixando de reconhecer as formas assintomáticas da infecção (TAVARES 2012). Antígenos brutos fornecem especificidade de 87%, enquanto os antígenos recombinantes rK26 (especificidade de 96%) e rK39 (especificidade de 100%). A limitação do uso de antígenos brutos consiste na ocorrência de reações cruzadas com outras doenças que frequentemente ocorrem em áreas endêmicas para LVC, o que leva à sugestão de que a associação do uso de antígenos brutos e recombinantes e ELISA seja uma estratégia interessante a ser utilizada em programas de controle da doença (FARIA e ANDRADE 2012).

Os principais métodos de diagnóstico para a LVC são os sorológicos, parasitológicos e moleculares (PCR) (BRASIL 2015; PAPADOGIANNAKIS e KOUTINAS, 2015). O diagnóstico laboratorial da LVC ainda representa um desafio apesar dos progressos no desenvolvimento de vários métodos de diagnóstico. Além disso, o diagnóstico é uma importante ferramenta para o combate e controle dessa doença (TAVARES 2012). Um teste de diagnóstico eficaz, deve ser precoce (SOUZA et al 2013), além de ser capaz de confirmar uma suspeita clínica, deve detectar a infecção em cães assintomáticos, ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, deve ser simples, de fácil execução, de baixo custo, viável em laboratórios regionais ou adaptáveis para condições de campo. O ideal é que ele detecte todos os cães infectados por *Leishmania* sp, utilizando preferencialmente, métodos de coleta

de amostras biológicas não invasivas (MAIA e CAMPINO, 2008). Cabe ao Médico Veterinário conhecer todos os métodos de diagnóstico, suas limitações e indicações, para poder aplicá-los corretamente na rotina clínica (SOUZA et al 2013).

Nos últimos anos, o padrão referência para o diagnóstico de Leishmaniose foi a visualização do parasita por meio de microscopia óptica ou de uma cultura de nódulo linfático, baço ou aspirados de medula óssea (ANTUNES 2018; GONÇALVES 2010; SILVA 2009; SOUZA 2013). Contudo, sabemos que não existe priorização de teste e embora sempre se inicie um processo de diagnóstico a partir dos testes sorológicos, o uso de qualquer teste laboratorial único não tem sido eficaz e aumenta o potencial de erros de diagnóstico, juntamente com todos os riscos associados ao cão, bem como a saúde pública (GHARBI et al., 2015; SOLANO-GALLEGO et al, 2011; VULPIANI et al, 2011; PAPADOGIANNAKIS e KOUTINAS, 2015). Diversas formas de PCR foram desenvolvidas para o diagnóstico das Leishmanioses com diversas finalidades, porém para vigilância epidemiológica, é necessário não só a detecção do parasita, mas também a identificação de espécies, particularmente em áreas endêmicas com ocorrência simultânea de formas visceral e cutânea da doença (QUARESMA et al., 2009).

2.7.1 - Métodos Sorológicos

A detecção de animais infectados é uma prioridade para permitir medidas apropriadas de contenção da doença. Os métodos sorológicos permitem a sorologia quantitativa (na presença de imunoglobulina G específicos para *Leishmania*) e qualitativa, e são considerados essenciais ferramentas de diagnóstico quando usados juntamente com sinais clínicos compatíveis com LVC (BRASIL 2006; FARIA 2012; SANTARÉM et al, 2020). Além disso, sorologia quantitativa é importante não apenas para o diagnóstico da doença, mas também para estudos epidemiológicos que permitam a adoção de medidas de contenção e controle da LVC (SANTARÉM et al, 2020; TEIXEIRA 2019). A maioria dos testes sorológicos apresentam alta especificidade e sensibilidade permitindo um diagnóstico preciso da LVC (SANTARÉM et al, 2020; SOUZA et al 2013). Contudo, os testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado, pois podem falhar na identificação de animais no período pré-patente e antes da soroconversão (CORTEGIANO e CHUCRI 2020).

2.7.1.1 - Método Sorológico Quantitativo (Teste rápido DPP® Biomanguinhos)

O Ministério da Saúde do Brasil determinou em 2012 que o protocolo oficial para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) seria a plataforma de duplo caminho (DPP®) para triagem, seguida por Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para confirmação (ALMEIDA et al, 2017; BRASIL 2011; ROCHA et al, 2020). Até então, exames sorológicos eram realizados por ELISA e os resultados positivos eram confirmados pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI).

O TR DPP® Biomanguinhos Leishmaniose Visceral Canina é um Teste Rápido imunocromático quantitativo de triagem à base de ouro coloidal desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) concebido para detectar anticorpos específicos aos antígenos rK9, rK26 e rK39 reativos em soro de cães infectados com *L. infantum* (CORTEGIANO e CHUCRI 2020; GRIMALDI et al, 2012; PEDRASSANI et al, 2019). É de fácil execução, fundamental para as ações de campo dos serviços municipais da Secretaria de Vigilância em Saúde, especialmente em locais distantes ou impossibilitados de enviar material para laboratório de referência (ALMEIDA et al. 2017). Desde 2012, ele vem sendo usado como triagem para inquéritos caninos, sendo permitido o uso de sangue periférico total (“ponta de orelha”), venoso, soro ou plasma (RIBOLDI, 2015).

Por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, desonerando, desta forma, gastos com outros exames laboratoriais. É um teste com alta sensibilidade e especificidade sendo assim, muito útil no diagnóstico de cães assintomáticos, favorecendo um melhor controle da LVC (LAURENTI et al, 2014; GRIMALDI JR et al, 2012; RIBOLDI 2015).

2.7.1.2 – Método Sorológico Qualitativo – SNAP – ELISA (Teste rápido)

O Teste rápido SNAP é um ensaio imunológico qualitativo baseado na tecnologia imunoenzimática (ELISA) e desenvolvido pelo laboratório Idexx (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) com o intuito de diagnóstico rápido para detecção do antígeno de *L. infantum* em soro, plasma ou sangue total canino (RIBOLDI 2015).

O teste SNAP é um teste confirmatório e assim como o DPP, funciona com amostras de sangue, tornando o produto uma excelente ferramenta como um teste de triagem para diagnóstico de LVC em clínicas veterinárias e em estudos de vigilância de campo (MARCONDES et al, 2011).

É um “mini ELISA” com alta sensibilidade e especificidade semelhantes aos descritos pela técnica ELISA padrão (MARCONDES et al, 2011), que utiliza conjugado e substrato exclusivos que amplificam os resultados (FERROGLIO et al, 2007).

2.7.2 – Método Parasitológico

O diagnóstico parasitológico é o método de eleição, considerado padrão-ouro para diagnóstico da LVC. É baseado na visualização de formas amastigotas do parasito por punção aspirativa de órgãos-alvo (baço, fígado, linfonodos e pele por fragmentos de biópsia dos mesmos) e por punção aspirativa de medula óssea (ANTUNES 2018; BRASIL 2015; GONÇALVES 2010; SILVA 2009; SOUZA 2013). Do material aspirado ou do fragmento é realizado esfregaço ou impressão em lâminas, respectivamente, coradas por derivados de Giemsa ou Panótico Rápido. O diagnóstico microscópico de lâminas coradas pode se tornar difícil se o animal apresentar baixa carga parasitária; além disso, a leitura completa da lâmina exige tempo e treinamento adequados (ANTUNES 2018; FARIA e ANDRADE 2012; SILVA 2009).

Outro método de detecção de parasitos do gênero *Leishmania* em condições laboratoriais é através do isolamento e cultivo de formas promastigotas em meios de cultura axênicos, ou seja, fora das condições fisiológicas do vetor, utilizando meios de cultivo que se assemelham às propriedades e condições observadas no inseto (MOREIRA et al., 2012). Os principais meios de cultura utilizados são o NNN (Novy-McNeal-Nicole), LIT (Liver Infusion Triptose) e o Schneider (Schneider's Drosophila Medium), a partir dos aspirados ou fragmentos dos órgãos. Mesmo sendo uma técnica de certeza, pois a visualização do parasito não deixa dúvida sobre a infecção, ainda assim possui limitações, pois é um método laborioso, de alto custo, lento, além de necessitar de pessoal altamente treinado e acompanhamento sistemático (COSTA 2019; SILVA 2009).

Outros métodos parasitológicos são a inoculação experimental em mamíferos susceptíveis, como o hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*) e xenodiagnóstico, ambos extremamente laboriosos e demorados; estes devem ser realizados com extrema cautela e, portanto, ficam restritos à centros de referência (NERY et al 2017; SILVA 2009).

A análise histopatológica de órgãos infectados também pode ser utilizada para a detecção dos parasitos intracelulares. Esses métodos tem a desvantagem de apresentar baixa sensibilidade, são muito invasivos e requerem mão-de-obra altamente especializada (FARIA e ANDRADE 2012; SILVA 2009).

O diagnóstico por imunohistoquímica, seja pelo método de revelação pela imunoperoxidase ou pela imunofluorescência direta em tecidos, facilita a visualização de formas amastigotas nos tecidos, devido à utilização de anticorpos específicos marcados que se ligam aos antígenos presentes nos cortes histológicos (SILVA 2009).

2.7.3 – Métodos Moleculares

O Diagnóstico Molecular é realizado pela detecção do material genético do agente infeccioso, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (HAAS e TORRES 2016; ROSSETTI, SILVA e RODRIGUES 2006). A PCR pode ser bastante útil para a vigilância epidemiológica de áreas onde casos de LV canina ainda não tenham sido descritos e onde estratégias de controle podem ser implantadas para limitar a disseminação da doença. Apesar de todo o avanço nas ferramentas diagnósticas, ainda é um grande desafio estabelecer um diagnóstico preciso para a LVC (NUNES et al, 2015).

Métodos moleculares baseados em PCR que identificam espécies de *Leishmania* sp diretamente das amostras clínicas são ferramentas importantes que otimizam a investigação da LVC. PCR é o método mais sensível para detecção de LVC (PALTRINIERI et al. 2010) mas devido à falta de padronização, ainda é usado somente para pesquisa e diagnóstico individual. Diferentes alvos foram desenvolvidos para detecção de *Leishmania* sp por PCR. Os mais específicos são usados para identificação de espécies e os mais sensíveis para diagnóstico genérico. O diagnóstico etiológico (identificação da espécie) se torna essencial, uma vez que as medidas de controle e o tratamento são diferenciados para cada espécie (BRASILEISH 2018; DANTAS TORRES 2009; RIBEIRO et al, 2013; PAZ et al, 2018). Em geral, os laboratórios usam testes “internos” padronização individual, sem repetitividade e reprodutibilidade em outros laboratórios (MARCELINO et al, 2020; REITHINGER e DUJARDIN, 2007; VAN der AUWERA e DUJARDIN, 2015).

2.8 – Tratamento

A LVC não tem cura (RIBEIRO 2001), porém existe tratamento que somente reduz a carga parasitária do paciente, elimina os sinais clínicos e potencializa o desenvolvimento de uma forte resposta celular que é controladora da infecção (BRASILEISH 2018; FERRER 1997).

O tratamento da LVC deve ser feito baseado no estadiamento clínico da doença

em protocolos que produzam melhora clínica e redução da carga parasitária (BRASILEISH 2018; NOLI e SARADOMICHELALIS 2014). Mesmo em tratamento, todos os animais devem utilizar inseticidas tópicos com propriedade repelente a fim de minimizar o risco de transmissão (CONTRERAS et al 2019; BRASILEISH 2018). A decisão por parte dos Médicos Veterinários pelo tratamento de um cão com calazar deve considerar parâmetros ligados à condição clínica do paciente e a participação consciente do proprietário, os quais irão determinar os critérios de tratamento e sua viabilidade (LAMOTHE J, 1999). Primeiramente o paciente deve ser avaliado pelo médico veterinário através de detalhado exame clínico e laboratorial que permitirão ao clínico prognosticar e decidir sobre a indicação do tratamento (RIBEIRO, 2001). O esclarecimento detalhado sobre a doença, sua condição de enfermidade crônica e incurável, a necessidade de medida profilática concomitante ao tratamento e seus custos devem ser relatados ao proprietário (RIBEIRO, 2001).

A leishmaniose canina é mais resistente ao tratamento do que a leishmaniose humana, mesmo assim, as recidivas são frequentes (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012). Quando não tratada possui alta letalidade e vem apresentando perfis epidemiológicos distintos para cada região onde ocorre. (ALMEIDA et al., 2009; CORTEGIANO e CHUCRI 2020). Até a década de 1990 acreditava-se que o tratamento da LVC não era viável, devido à sua elevada toxicidade (RIBEIRO 2007). Dentre as drogas indicadas, destacam-se o antimoniato de n-metilglucamina, alopurinol, combinações dos dois, anfotericina B, pentamidina, aminosidina e miltefosina (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012). A maioria dos protocolos e associações de drogas tem mostrado bons resultados quanto à redução dos sinais clínicos e melhora clínica dos animais tratados (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012).

Antimoniais pentavalentes, são utilizados 2 compostos, n-metil glucamina (Glucantime) e estibogluconato de sódio (Pentostam). O metabolismo de ação dessas drogas ainda não é completamente elucidado. Entretanto, parece que se baseia no bloqueio do metabolismo do parasita por meio da inibição da enzima fosfofrutoquinase, enzima chave da gluconeogênese, levando a inibição da síntese de ATP e a replicação do seu DNA, determinando a sua morte (OLIVEIRA, ANTONIO e PICCININ 2008; RIBEIRO, 2007). As melhores vias de aplicação são a subcutânea e Intramuscular (OLIVEIRA, ANTONIO e PICCININ 2008), que alcança o maior nível sérico cinco horas após a administração, mantendo níveis terapêuticos durante doze horas (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012). No Brasil, a produção do antimoniato de n-metilglucamina é distribuída exclusivamente para o Ministério da Saúde (MS), não havendo, portanto, disponibilidade do produto para uso em cães. Dessa forma, é proibido o uso desse produto para o tratamento da LVC, quando o

mesmo for de distribuição do MS; diferentemente da Europa, onde o mesmo é distribuído para uso veterinário, como terapêutica da LVC. Na Espanha, o antimoniato de n-metilglucamina é o medicamento de eleição para o tratamento da LVC. Este é utilizado como solução injetável (Glucantime® Merial) (RIBEIRO, 2007), e a dosagem recomendada dessa droga para o tratamento canino é aproximadamente dez vezes maior que o recomendado para o tratamento humano. É contraindicado para animais com nefropatias, pois é nefrotóxico e possui excreção renal (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012).

O Alopurinol inibe o metabolismo das purinas, exercendo efeito inibitório no crescimento de *Leishmania* sp “in vitro”. A utilidade dessa droga tem sido demonstrada no controle das recidivas da leishmaniose canina e efeitos colaterais são incomuns (OLIVEIRA, ANTONIO e PICCININ 2008). O mecanismo de ação do Alopurinol consiste na incorporação ao RNA do parasita, alterando sua síntese proteica, inibindo sua multiplicação e, posteriormente, levando-o à morte. Tem baixa toxicidade, é utilizado por via oral e pode ser administrado isoladamente ou combinado a outros fármacos (CONTRERAS et al 2019). Embora de baixa toxicidade e com efeitos colaterais não muito frequentes, tem sido relatado febre, leucopenia, distúrbios cutâneos e elevações de enzimas de baixa intensidade. A dose recomendada é de 10 a 20 mg/kg BID, via oral, apresentando boa disponibilidade no cão (RIBEIRO e MICHALICK, 2001).

Anfotericina B, utilizada no tratamento das infecções micóticas, atua rompendo a membrana celular e provocando a morte dos parasitos. É altamente nefrotóxica quando utilizada necessita rigorosa monitoração do paciente. De acordo com a literatura, os casos tratados com anfotericina B tem alcançado 93% de cura clínica, queda da sorologia e normalização da fração albumina/ globulina (LAMO THE J. 1997; OLIVEIRA, ANTONIO e PICCININ 2008).

A Aminosidina também é um dos medicamentos indicados, é um antibiótico e seu metabolismo de ação é complexo, inclui a inibição da síntese protéica e alteração da permeabilidade da membrana plasmática dos parasitos. As vias de aplicação podem ser subcutânea e intramuscular. Os efeitos colaterais conhecidos são principalmente a nefrotoxicidade e surdez por lesão do VIII nervo craniano. O uso deste medicamento em nosso meio não tem sido freqüente, uma vez que o produto somente é comercializado na Itália (OLIVEIRA, ANTONIO e PICCININ 2008). Administrada uma vez ao dia em uma dosagem revisada mostra alguma promessa, mas são necessários estudos controlados adicionais (NOLI e SARADOMICHELALIS 2014).

A única droga leishmanicida aprovada para tratamento da LVC no Brasil é o

antimoniato de meglumina, ou Miltefosina, por algumas semanas isoladamente ou em combinação com Alopurinol por vários meses (BRASIL 2016; NOLI e SARADOMICHELALIS 2014). Em 2016 por meio da nota técnica nº 001/2016 foi registrado o Milteforan no MAPA, permitido, assim, o tratamento de cães com este fármaco (BRASIL 2016). A Miltefosina, além de ser tóxica para os amastigotas, também estimula a imunidade celular, aumentando os níveis sanguíneos de IFN- γ , o que potencializa o seu efeito leishmanicida. No entanto, mesmo com todos esses benefícios, a miltefosina não consegue alcançar a cura parasitológica nos cães. Esse medicamento apenas diminui a carga parasitária e consegue melhora clínica dos cães (NOGUEIRA et al. 2019). É necessário determinar o estágio clínico da doença em que o animal se encontra. O protocolo terapêutico à base da miltefosina pode ser associado ao tratamento como o alopurinol, antimoniato de meglumina, domperidona, corticosteroides, bem como uso de coleiras repelentes para evitar o vetor, e outra opção seria a imunoterapia (CONTRERAS et al 2019).

A evolução da doença e a resposta inadequada ao tratamento são atribuídas principalmente à imunossupressão induzida pelo parasita. As alterações do sistema imune se traduzem pelo estímulo da imunidade humoral e pela depressão da imunidade celular, que implicam conseqüências negativas para o enfermo. Algumas drogas imunomoduladoras, imunossupressoras ou imunoestimulantes, mesmo não exercendo ação direta sobre as *Leishmanias* spp, tem sido empregadas juntamente com os fármacos leishmanicidas e leishmaniostáticos. Os corticosteróides, mais freqüentemente a prednisona e a prednisolona, têm sido usados como drogas imunossupressoras com o objetivo de suprimir a imunidade humoral, diminuindo a produção de anticorpos evitando assim, a formação de imunocomplexos responsáveis por alterações em vários órgãos. As drogas imunoestimulantes são utilizadas com o intuito de ativar inicialmente os linfócitos T, que secundariamente ativam os macrófagos, contribuindo na resposta celular de eliminação das *Leishmanias*. A droga mais utilizada é o levamisol, na dose de 0,5 a 2mg/kg, em dias alternados, pela via oral. A domperidona também tem sido usada na dose de 1mg/kg bid, durante trinta dias. São também citadas como imunoestimulantes a interleucina 12, o Interferon α (RIBEIRO 2013).

A imunoterapia é uma opção de protocolo de tratamento e geralmente é associada ao uso concomitante com drogas leishmaniostáticas. O objetivo do tratamento é a reposição da resposta imunitária, melhora clínica do paciente e redução da carga parasitária, retirando-o assim da cadeia epidemiológica de transmissão (ARAÚJO e GONDIM 2020; BRASILEISH 2017; ROATT et al, 2017).

Uma Portaria Interministerial baixada pelo Governo Federal, de número 1.426, de

11 de julho de 2008, proíbe os médicos veterinários de realizarem tratamento da LVC em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mesmo proibidos e sujeitos às infrações e penalidades previstas em lei, há médicos veterinários que tratam a LVC com medicamentos de uso humano (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012; CARNEIRO, 2016). Esta conduta interministerial está na contramão das constatações científicas, pois é de conhecimento da comunidade científica de que os cães em tratamento apresentam, pela prova de imunohistoquímica de pele, sucessivos resultados negativos, não oferecendo riscos para a saúde pública. É com base em conhecimentos como este que a leishmaniose visceral canina é tratada em diversos países (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012). Outro fato que chama a atenção é que não há correlação entre o tratamento dos cães e o aumento do número de casos humanos, visto que os países que permitem o tratamento da LVC há muito tempo não figuram entre os que apresentam maior incidência de casos humanos confirmados (OMS 2019; ROEDER-FERRARI et al 2020). Apesar da Nota Técnica nº 001/2016, permitindo o uso do Milteforan, o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), continua a declarar, até o momento, que não há nenhuma droga autorizada para o tratamento da LVC (CFMV 2016; NERY 2017). Desta forma, ainda há necessidade de desenvolvimento de protocolos para o tratamento de cães que não incluam drogas utilizadas para o tratamento de casos de LVH (NERY et al, 2017).

Devido ao fato de haver várias espécies de *Leishmania* se torna quase impossível a obtenção de uma única maneira capaz de controlar e combater a leishmaniose em todas as suas variações clínicas (CORTEGIANO e CHUCRI 2020). Na rotina diária da clínica médica no controle da LVC percebemos que é importante aliar medidas de prevenção de novos casos de cães infectados para evitar sua disseminação. Segundo Ribeiro (2007), um princípio básico para a prevenção da LVC é evitar o contato entre o vetor infectado e o cão. Dessa forma, medidas contra o vetor devem ser adotadas no ambiente e centradas no cão. As medidas direcionadas aos cães parecem ser as mais adequadas nos grandes centros urbanos. Algumas medidas tem sido recomendadas aos proprietários dos cães livres da infecção ou em tratamento, como o uso do colar impregnado com deltametrina 4%, o qual deve ser substituído conforme orientações do fabricante, e em cães alérgicos ao colar, uso de inseticidas de aplicação tópica à base de permetrina; cuidados de limpeza do ambiente, como retirada de matéria orgânica excessiva; aplicação de inseticidas ambientais centrados nos canis (ambientes em que o animal permanece por mais tempo), como aqueles à base de deltametrina e cipermetrina, em aplicações semestrais; uso de plantas repelentes de insetos,

como a citronela; não realização de passeios crepusculares ou noturnos, horários de maior atividade dos flebotômíneos, privilegiando os passeios diurnos (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012) ou manutenção do animal em ambiente telado, especialmente em momentos de alta circulação do vetor (REGUERA et al. 2016).

Algumas dessas drogas disponíveis no mercado têm mostrado uma relativa toxicidade e contraindicação em animais muito debilitados (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012; OLIVEIRA, ANTONIO e PICCININ 2008), e em alguns casos, tem ocorrido resistência por parte do parasito. Diante disso, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de encontrar novas alternativas para o tratamento da LVC (HELLMANN; MARCHESAN; VELASQUEZ, 2018; SILVA; FIGUEIREDO e CARVALHO 2016). Por isso, o interesse por fitoterápicos e produtos naturais vem crescendo muito nos últimos anos no Brasil e no mundo (OLIVEIRA; GILBERT; VILLAS BÔAS, 2013; ESSIR et al, 2015).

Tratamentos naturais alternativos têm surgido especialmente para humanos, e a OMS tem considerado uma prioridade a investigação farmacológica de plantas (OLIVEIRA; GILBERT; VILLAS BÔAS, 2013). As vantagens da utilização da fitoterapia incluem o baixo custo, baixa incidência de efeitos colaterais e sua efetividade (HELLMANN; MARCHESAN; VELASQUEZ, 2018; SILVA; FIGUEIREDO e CARVALHO 2016). Os produtos naturais são potenciais fontes de grande variedade de substâncias de atividade biológica (OMS, 2011; BAPELA; KAISER; MEYER, 2017; ESSID et al, 2015). Já tem sido demonstrado que a atividade biológica antileishmania, com efeito leishmaniostático, de extratos de várias plantas se associa a substâncias pertencentes a diversos grupos químicos que incluem alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, chalconas e naftoquinonas (KLEIN et al., 2009). Muitos tutores têm lançado mão de tratamentos naturais alternativos para controlar a LVC nos seus animais (HELLMANN; MARCHESAN; VELASQUEZ, 2018).

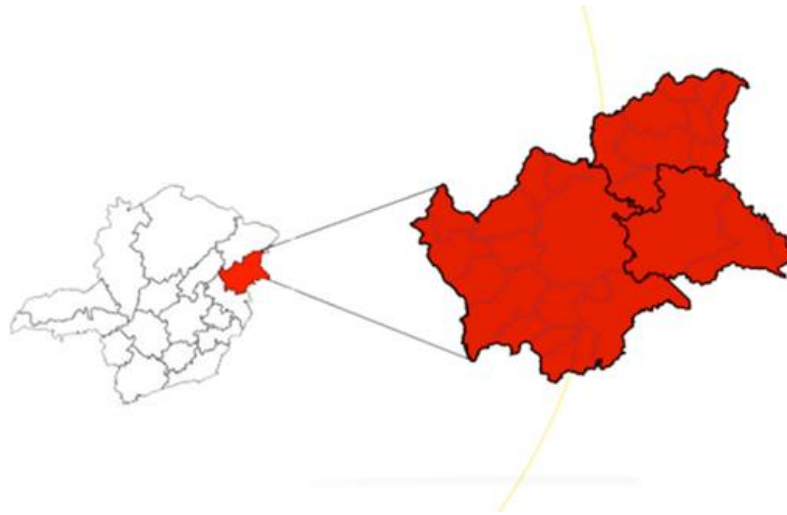
É necessária muita atenção às diretrizes publicadas sobre tratamento e acompanhamento para alcançar o melhor resultado terapêutico possível (NOLI et ali, 2014). A recomendação do Ministério da Saúde é clara e objetiva e diz que os tutores que optarem por não tratar o seu cão deverão autorizar a eutanásia do animal. Tutores que não optarem pelo tratamento e nem pela eutanásia do seu animal podem ser responsabilizados pela vigilância sanitária, pois aquele animal que apresenta resultado positivo e não é tratado se torna um risco de saúde pública (BRASIL 2020).

A inexistência de tratamento efetivo para a cura da LVC, e a polêmica sobre a eliminação indiscriminada dos cães infectados, tornam urgente a adoção de novas estratégias de prevenção e controle, como por exemplo, o uso de vacina contra a LVC (SCHIMMING e PINTO E SILVA 2012).

2.9 – Políticas Públicas no controle da Leishmaniose Visceral

O Território do Vale do Mucuri é composto por 29 municípios distribuídos em 3 Microterritórios e os municípios mais populosos são Teófilo Otoni (134.745 hab.), Nanuque (40.834 hab.) e Itambacuri (22.809 hab.) (Governo de Minas Gerais 2015) (Figura 11).

Figura 11 – Estado de Minas Gerais com Destaque para a Região do Vale do Mucuri



Fonte: Governo de Minas Gerais - Plano Mineiro de Desenvolvimento Integrado - 2016 a 2027 – Perfis Territoriais. Belo Horizonte 2015 – Vol. 3

Essa região foi uma das últimas do território mineiro a ser desbravada, devido à sua vegetação original, a Mata Atlântica, que dificultava o acesso e a viabilidade à agricultura. (Apolinário 2011). Atualmente, ela ocupa a posição de uma das mais pobres regiões do território mineiro com indicadores como PIB, IDH e renda per capita bem abaixo das médias, tanto estadual quanto federal (Apolinário 2011).

A População Rural do Vale do Mucuri corresponde a aproximadamente 3,25% da população total sendo que esta proporção é a quarta maior em comparação com os demais Territórios do Estado. A proporção de pobres no Vale do Mucuri é de 53,91% e a de pessoas consideradas “extremamente pobres” é 25,82%. Já a Renda per capita observada no Território Mucuri é de R\$ 432,95, correspondendo ao quarto pior do Estado, conforme dados do Censo Geográfico de 2010 (Governo de Minas Gerais 2015). O IDHM (Índice de Desenvolvimento Humano Municipal) do Vale do Mucuri, que avalia as dimensões Renda, Educação e Expectativa de vida, é de 0,611 e estatisticamente é o segundo pior do Estado (Governo de Minas Gerais 2015).

Teófilo Otoni é uma importante cidade média do estado de Minas Gerais (Batella 2013) localizada na Região Nordeste do Estado e a principal cidade do Vale do Mucuri, porém é uma cidade marcada pelas desigualdades sociais, o que favorece a prevalência de DTN's (Batella 2018).

As DTN's, como a Leishmaniose Visceral, sacrificam especialmente as populações mais pobres e a Região Norte e Nordeste de Minas Gerais são as regiões com maior registro de casos de Leishmaniose, conforme dados do SINAN/CPDE/DIE/SVE - SubVS/SESMG.

O governo é o principal responsável no controle de forma efetiva para a prevenção das DTN's (VASCONCELOS et al., 2016) e por meio das políticas públicas, poderia combater e controlar tais doenças e condições sociais, com planos econômicos para a diminuição da desigualdade social, com investimento em saneamento, políticas preventivas para garantir o acesso ao tratamento adequado, incentivo a instituições de pesquisa e às indústrias farmacêuticas para favorecer o desenvolvimento de medicamentos que colaborem com a prevenção, controle e tratamento das DTN's (REIS et al, 2016).

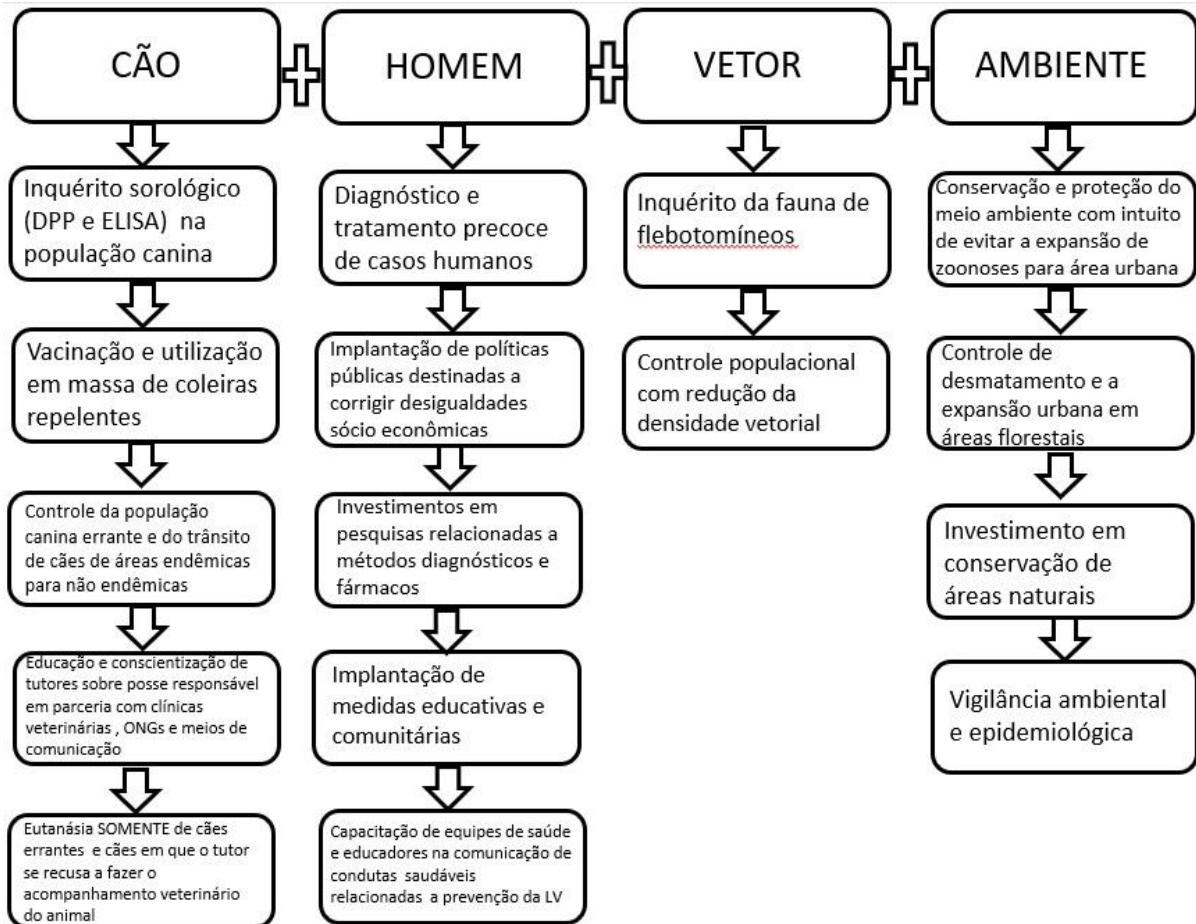
Grisotti em 2010, destacou que desigualdade social, baixo índice de desenvolvimento humano, baixo grau de escolaridade, são de fato condições ideais para incidência de doenças, principalmente as negligenciadas, como a Leishmaniose Visceral. As baixas condições sanitárias, saneamento básico, descaso governamental e escasso orçamento para o investimento em novas tecnologias, pesquisa e desenvolvimento científico corroboram para o quadro crítico da persistência e avanço da Leishmaniose no Brasil e no mundo.

Para o efetivo controle da Leishmaniose são necessárias uma vontade política e ações efetivas com investimentos em educação, políticas públicas de conscientização da população, investimentos em tecnologias e fármacos para uma quimioprofilaxia adequada, controle do vetor, água potável apropriada para consumo e saneamento básico, para que se consiga controlar esta e outras zoonoses. A população também precisa estar envolvida e contribuir com a disseminação de informações sobre as políticas públicas voltadas ao combate e extinção dessa doença, para que possamos ter uma diminuição do número de contaminados. (GRISOTTI, 2010) (Figura 12).

Se faz urgentemente necessário que o poder público construa políticas públicas pertinentes que contemplem as deficiências da nossa região e que favoreçam o desenvolvimento sócio econômico das comunidades locais, e conseqüentemente diminua a incidência da Leishmaniose Visceral na Macrorregião de Teófilo Otoni, MG.

Ações integradas de Políticas Públicas no combate à Leishmaniose Visceral

Figura 12 – Esquema representativo de ações integradas de Políticas Públicas ao combate à Leishmaniose Visceral



3.0 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar a infecção por *Leishmania* sp em cães provenientes da Macrorregião de Teófilo Otoni, Minas Gerais.

3.2 – Objetivos Específicos

- Realizar o diagnóstico sorológico (DPP®/Biomanguinhos e SNAP/ELISA) em cães provenientes de clínica particular e do canil da PMTO;
- Avaliar clinicamente os cães soro reagentes;
- Realizar o diagnóstico parasitológico (isolamento em meio de cultura, leitura de lâminas);
- Realizar o Teste Molecular de PCR para confirmação de diagnóstico da LVC nas amostras pesquisadas;
- Identificar as espécies de *Leishmania* sp dos isolados e das amostras de aspirado de medula óssea;
- Estabelecer a relação dos diversos parâmetros analisados com a presença ou não de sintomas e manifestações clínicas da doença nos animais avaliados;
- Contribuir com a sensibilização do poder público local para implantação de políticas públicas pertinentes que favoreçam o controle da LVC e LVH na Macrorregião de Teófilo Otoni.

4.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

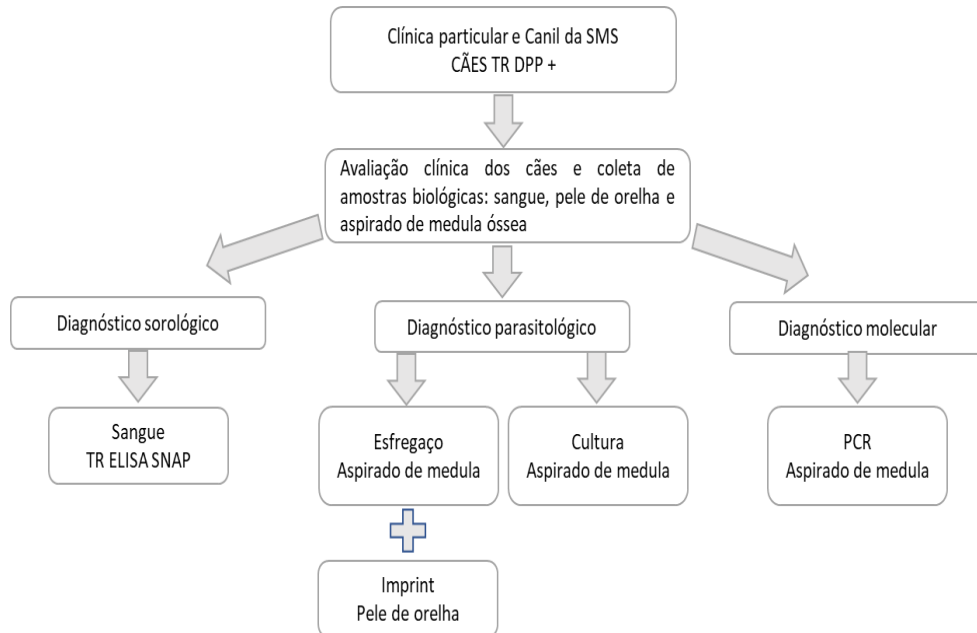
4.1 - Estratégia experimental

A coleta das informações foi realizada no período de agosto de 2019 a fevereiro de 2020, na Clínica Veterinária São Francisco em Teófilo Otoni, MG, e no Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG. Foram incluídos no estudo todos os animais que tiveram resultado positivo no Teste Rápido DPP®/Biomanguinhos, sintomáticos ou assintomáticos. Dos animais selecionados, foram coletados sangue venoso para realização do teste rápido (SNAP), fragmento de pele de orelha para realização do imprint por aposição e aspirado de medula óssea para realização de esfregaço em lâminas, isolamento em meio de cultura e diagnóstico molecular (Figura 13).

O cálculo amostral foi realizado para se ter uma amostragem significativa dos animais infectados na cidade de Teófilo Otoni, possibilitando assim alcançar os objetivos propostos. Conforme o último relatório de programação das ações do inquérito canino, (2014) existem 24.200 cães na cidade de Teófilo Otoni com prevalência da LVC observada/esperada >10%. Portanto, foram coletadas 147 amostras de cães de ambos os sexos e idades variadas com intuito de manter no mínimo 130 amostras de cães (O total de amostras utilizado foi de 132) para nível de significância de 5%. Este número foi calculado com base em tabela do Ministério da Saúde do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL 2014).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFVJM, sob o protocolo 03/2019 (Anexo 1). Os responsáveis legais pelos cães foram informados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento (Anexo 2), e a Declaração de Consentimento (Anexo 3) antes da coleta das amostras (Sangue venoso, Pele de Orelha e Sangue de Medula Óssea) e preencheram uma Ficha epidemiológica (Anexo 4) para pesquisa de dados. Os mesmos foram igualmente informados de que, ao final da pesquisa, receberiam um relatório contendo os resultados obtidos pelos diferentes testes realizados, assim como suporte técnico em relação a dúvidas sobre LVC. A coleta de material foi realizada e a ficha com presença ou não de sintomas preenchida. (Anexo5).

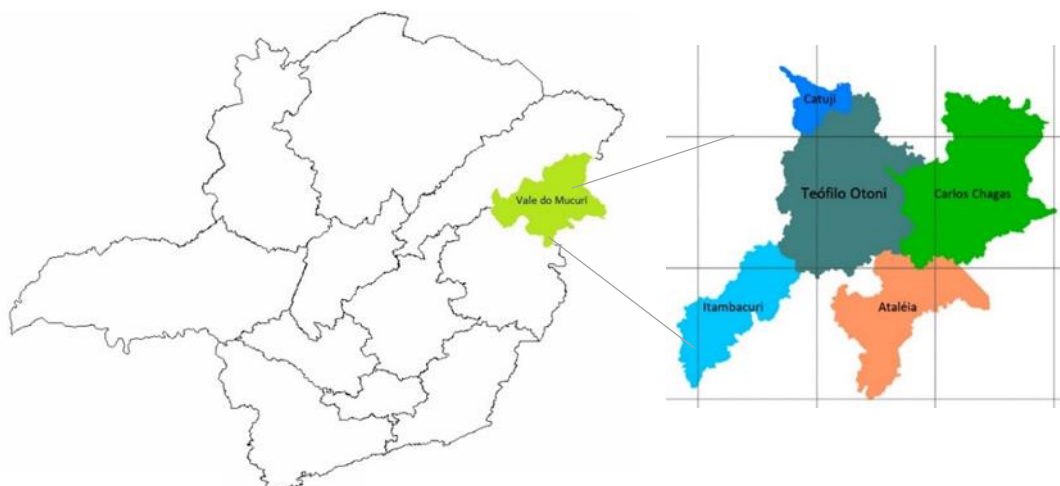
Figura 13 – Esquema representativo da estratégia experimental e metodologia usada na presente pesquisa.



4.2 - Local do estudo

O estudo foi realizado em Teófilo Otoni, MG, com amostras de cães atendidos na Clínica Veterinária São Francisco e cães provenientes do Canil Municipal de Teófilo Otoni, MG. As amostras coletadas foram oriundas das cidades de Teófilo Otoni, Carlos Chagas, Itambacuri, Ataléia e Catuji. (Figura 14)

Figura 14 - Mapa de Minas Gerais com destaque para os municípios da Região do Vale do Mucuri de onde originaram os cães selecionados para o estudo.



Fonte: mapasparacolorir.com.br/mapa/estado/mg/estado_minas_messorregioes.png - (Adaptado)

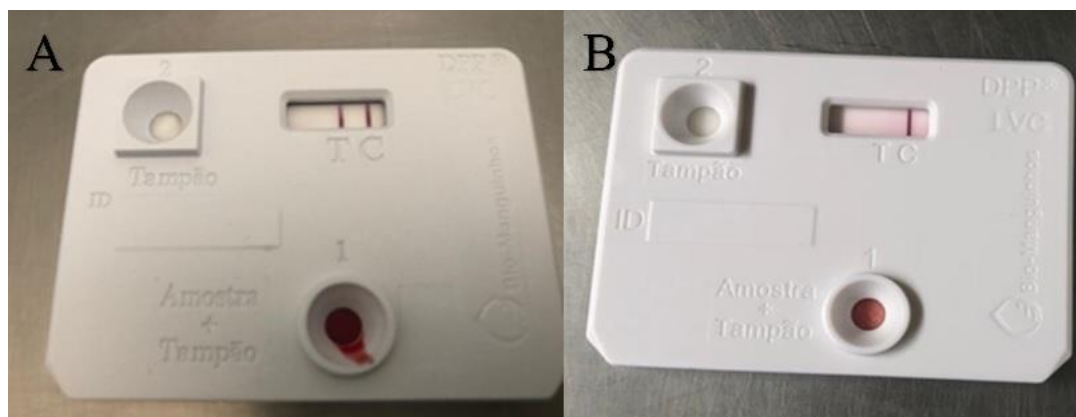
4.3 - Avaliação clínica dos animais e ficha epidemiológica

Em todos os animais selecionados para o estudo foi realizado o exame clínico e coletadas informações sobre as características dos animais, como: procedência, presença de sinais clínicos, pelagem, idade, raça, sexo, e nos animais provenientes da Clínica foram coletadas informações sobre vacina e tratamento, conforme apresentado na ficha epidemiológica (Anexo 2 e Anexo 5).

4.4 - Diagnóstico sorológico

Foi coletado sangue venoso para realização de Teste Rápido DPP®/Biomanguinhos. Os fatores de exclusão foram cães com temperamento agressivo ou ariscos. Conforme as orientações do fabricante o teste DPP® foi realizado adicionando 5 µL de sangue total (aproximadamente uma gota) ao poço 1 (amostra + tampão), e em seguida foram adicionadas 2 gotas do tampão no mesmo poço. Após 5 minutos as duas linhas azuis, controle (C) e teste (T), desapareceram. A seguir colocou-se 4 gotas do tampão no poço 2 (tampão), aguardando de 10 a 15 minutos, após esta etapa foi realizada a leitura dos resultados. O resultado é considerado positivo se ocorrer o aparecimento de uma linha de coloração vermelha nas linhas Teste (T) e Controle (C) (Figura 15 A), e negativo quando nenhuma linha aparecer na linha T (Figura 15 B) e inválido se a linha C falhar em aparecer.

Figura 15 – Dispositivo de Teste rápido LVC DPP Biomanguinhos® com resultado positivo A (Amostra Positiva) e com resultado negativo B (Amostra Negativa)



Fonte: Arquivo Próprio

A linha esquerda representa a banda de teste, indicando um resultado positivo.

Em casos de cães DPP positivos, foi feito o Teste Rápido SNAP/ELISA da IDEXX.

Para a realização do teste SNAP® LEISHMANIA para detecção de anticorpos anti *-Leishmania donovani* e *L. infantum*, após coleta do sangue, as amostras foram retiradas com pipeta e duas gotas do sangue foram colocadas em um microtubo, ao qual foram adicionadas seis gotas de conjugado, homogeneizando em seguida. Com o dispositivo SNAP posicionado em uma superfície plana colocou-se o conteúdo do microtubo na cavidade da amostra. Em seguida o dispositivo foi ativado e a leitura realizada depois de seis minutos. Para determinar o resultado do teste leu-se os três pontos de reação na janela do resultado: o ponto de controle negativo, o de controle positivo e o da amostra teste. Foram consideradas reagentes as amostras onde houve aparecimento de cor no local definido para o controle positivo do teste e no local definido para resultado da amostra teste (Figura 16 A) e, consideradas não reagentes, aquelas amostras nas quais houve aparecimento de cor apenas no local definido para o controle positivo do teste (Figura 16 B).

Figura 16 – Dispositivo de TR ELISA SNAP®/IDEX com resultado positivo A (Amostra Positivo) e com resultado negativo B (Amostra Negativa)



Fonte: Arquivo Próprio

4.5 – Diagnóstico parasitológico

Para o diagnóstico parasitológico direto foram coletadas amostras de pele da orelha esquerda e aspirado de medula óssea. A coleta do fragmento da orelha foi realizada após prévia higienização e infiltração de anestésico local, Lidocaina 2%. A coleta foi realizada com Punch descartável de 5 mm.

Logo após a coleta foi realizada a confecção das lâminas por aposição (imprint)

do fragmento, as lâminas foram fixadas com metanol e coradas pelo método Panótico Rápido. A confecção das lâminas foi realizada na Clínica Veterinária São Francisco. As lâminas foram analisadas em microscópio para visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp, considerando-se positivos os resultados em que o leitor visualizou formas amastigotas do parasito.

As amostras de aspirado de medula óssea foram obtidas por meio de punção aspirativa com agulha fina (PAAF) de 40mm x 12mm para a confecção de esfregaços em lâminas. Após tricotomia e desinfecção da pele, anestesiámos a área sobre o osso externo com lidocaína 2%, introduzimos uma agulha acoplada a uma seringa de 10 ml com duas gotas de EDTA e por pressão aspirativa coletamos aproximadamente 0,5 ml de sangue de medula. Foi colocada uma gota de sangue diretamente sobre uma lâmina de vidro e com outra lâmina em sentido perpendicular, espalhamos o sangue em uma camada fina pela sua superfície, com o objetivo de produzir uma monocamada de células. As lâminas contendo os esfregaços após secagem e fixação com metanol foram coradas pelo método Panótico Rápido (Romanovski) (OLIVEIRA et al, 2011; ALENCAR et al, 2002). O exame foi realizado por microscopia óptica em objetiva de imersão para a observação de formas amastigotas de *Leishmania* spp e confirmação do diagnóstico parasitológico, conforme descrito por HONSE (2014) e RAMOS e cols. (2012).

4.6 - Isolamento do parasito em meio de cultura

As amostras provenientes dos aspirados de medula foram armazenadas em geladeira (aproximadamente 4°C) durante 24 horas em solução salina com antibióticos (estreptomicina 100µg/mL e penicilina 500U/mL), em seguida adicionadas a tubos contendo meio de cultura NNN (NOVY e Mc NEL, 1903; NICOLLE, 1908) enriquecidos com meio LIT (Liver Infusion Triptose) e mantidos à 25° C ± 1°C. As amostras foram avaliadas uma vez por semana, durante 6 semanas, através da observação de lâmina, contendo uma gota da cultura, em microscópio ótico. Os parasitos isolados das amostras foram crescidos para serem utilizados nas técnicas moleculares (10^8 parasitas/total). Quando não ocorreu o aparecimento de formas flageladas depois de seis semanas, a cultura foi considerada negativa. As amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas no banco de cepas do Grupo de Estudos em Leishmanioses (GEL) do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, para posterior caracterização por métodos moleculares.

Para obtenção do número suficiente de parasitos (10^8 parasitos/total), para

extração de DNA, foram transferidos 2,5mL das amostras de cultura em crescimento exponencial (5^o e 6^o dia) para garrafas de 25mL contendo NNN e LIT (5mL). Após crescimento, esse volume foi sendo ampliado até 50mL de cultura para cada amostra com adição de LIT e realizada a contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente foi feita a lavagem e realizada a extração da massa de parasitos que foi estocada para a realização de PCR.

Quando os parasitos se encontravam na fase exponencial de crescimento, a massa celular foi preparada transferindo-se o conteúdo dos erlenmeyers para tubos FALCON de 50 ml. O meio LIT contendo cerca de 10⁸ parasitas foi centrifugado a 1500 xg durante 10 minutos a 4° C, desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado em solução PBS estéril pH 7,2. Os parasitas foram lavados por três vezes com PBS 1x, a 1500 xg, 4°C por 10 minutos. O sedimento ressuspensionado em 1,5 ml de PBS foi transferido para tubos de criopreservação e lavado como anteriormente. Parte do sobrenadante foi desprezada e o restante foi deixado em quantidade suficiente para cobrir o sedimento. Os tubos foram estocados a - 20°C até o uso.

As promastigotas, isoladas das amostras positivas em cultura, foram congeladas em 10% de glicerol, adicionado gota a gota e mantendo-se no agitador por 15 minutos, e então transferidas para tubos de criopreservação. Os tubos eram mantidos a - 70°C overnight e depois transferidos para o botijão de nitrogênio líquido.

4.7 - Diagnóstico Molecular

A presença do parasito foi investigada também através da amplificação do DNA isolado diretamente das amostras do aspirado de medula e das culturas positivas. O DNA das amostras foi extraído utilizando o protocolo do kit de extração “PureLink™ Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen®). O DNA foi dosado, aliquotado e estocado a -20° C. Reações de PCR que amplificam um fragmento do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) de *Leishmania* sp foram utilizadas para detectar e identificar o parasito nestas amostras.

Os iniciadores LITSR 5’ CTGGATCATTTTCCGATG 3’ e L5.8S 5’ TGATACTTATCGCACTT 3’ amplificam um fragmento de aproximadamente 350pb através da seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de mistura de dNTPs, 0,5 pmol do primer LITSR, 0,5 pmol do primer L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen), 2 µl de DNA molde em um volume final de 25 µl. A amplificação foi realizada alternando 33 ciclos de desnaturação a

95° C por 30 seg, anelamento a 53° C por 1 min e extensão a 72° C por 1 min em equipamento termociclador automático. A RFLP subsequente pode distinguir as seguintes espécies: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, e *L. panamanensis*. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de HaeIII (10 U/L), 1,5 µL de tampão da enzima e 10,0 µL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas controle descritas acima.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se um volume total 10µl de DNA, a região espaçadora interna transcrita 1 (ITS1- Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal foi amplificada utilizando os iniciadores LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'TGATACCACTTATCGCACTT-3') que se anelam nas seqüências conservadas SSU e 5.8S gerando um produto de 300-350 pb, visualizados em gel de agarose a 1%, comparado ao peso molecular de 100pb (Promega)

Foi feito um total de 240 microlitros da Solução Mix de PCR-ITS-1, foi pipetado 20 microlitros e acrescentado 5 microlitros de Extrato do DNA de cada amostra no microtubo e acrescentado também 5 microlitros dos controles das amostras de DNA de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. guyanensis* e um microtubo controle sem DNA. Verificamos as formações das bandas para identificar a espécie de *Leishmania* sp da amostra em pesquisa.

Os produtos da PCR foram digeridos com a enzima de restrição HaeIII nas seguintes condições: 10 µl do produto amplificado e 5µl de solução contendo 1,5 µl de tampão 10X (15mM), 1,0 µl da enzima (HaeIII), 0,15 µl de BSA e 2,35 µl de H₂O livre de DNA e RNA. A solução foi incubada em banho Maria por 2 horas a 37°C.

Os fragmentos resultantes da digestão com a enzima HaeIII foram separados em gel de agarose 2% e visualizados em transluminador Termociclador automático Eppendorf® Mastercycler Gradient sob luz ultravioleta e fotografados em aparelho Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia) para posterior análise. Os perfis de restrição de ITS1 foram analisados visualmente comparados ao peso molecular.

O exame parasitológico direto (exame de lâminas e isolamento em cultura) e o diagnóstico molecular (PCR para detecção e identificação das espécies de *Leishmania* sp) foram realizados na FIOCRUZ Minas – Instituto Renê Rachou em Belo Horizonte – MG.

4.8- Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo Teste exato de Fisher através do

programa GraphPad Prism, sendo considerado $p < 0,05$.

5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muito pouco se estudou até hoje sobre a LVC e LVH na cidade de Teófilo Otoni, MG. Na revisão bibliográfica encontramos dois estudos (RIBEIRO et al, 2007; TEIXEIRA et al, 2015) na região de Teófilo Otoni e em cidades do Estado de Minas próximas temos alguns trabalhos de pesquisa em LVH e LTA (FARIAS et al, 2019; MONTEIRO et al, 2005; VALDIVIA et al, 2017).

Com intuito de facilitar a compreensão da Leishmaniose Visceral Canina, desenvolvemos uma Cartilha informativa que tem como público alvo tutores, voluntários de ONG's e população da Macrorregião de Teófilo Otoni, MG. (Anexo 7).

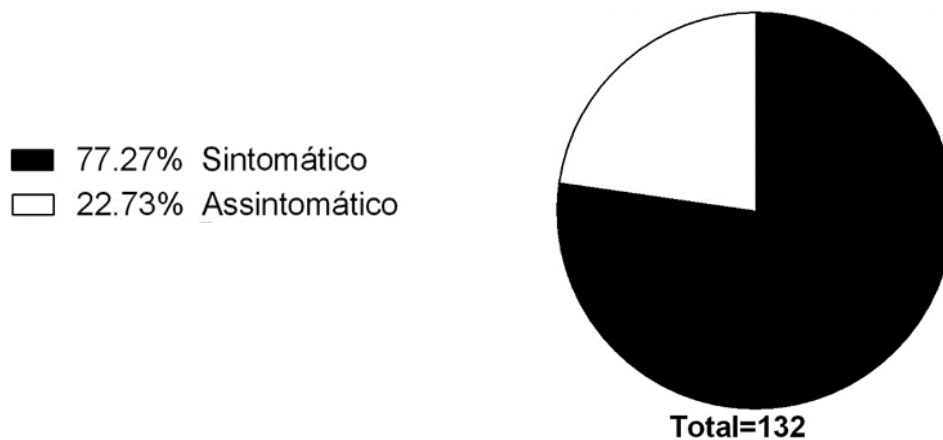
5.1 – Características dos animais

A coleta de dados foi realizada na Clínica Veterinária São Francisco e no Canil Municipal de Teófilo Otoni, MG. O diagnóstico sorológico foi realizado no local da coleta através do teste rápido DPP Biomanguinhos. Foram selecionados os primeiros 147 animais que deram resultado positivo no teste rápido, atendidos na Clínica Veterinária São Francisco e no Canil Municipal de Teófilo Otoni. Deste total, foram descartados 15 animais que apresentaram contaminação nas amostras coletadas, permanecendo um total de 132 cães.

Todos os animais provenientes do Canil Municipal (84) foram sacrificados, usando critérios clínicos padronizados como justificativa e diagnóstico sorológico através da realização de protocolo padrão proposto pelo Ministério da Saúde em consonância com o protocolo da Vigilância Sanitária do Município de Teófilo Otoni, MG.

Quanto à presença de manifestações clínicas de LVC, este estudo mostrou que a maioria dos cães avaliados apresentaram sinais clínicos da doença (Figura 17).

Figura 17 – Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados de acordo com os sinais clínicos.



Em relação aos sinais clínicos da doença nos cães soropositivos, 77,27% (102 cães) apresentaram pelo menos um sinal clínico possivelmente associado a LVC e 22,73% (30 cães) eram assintomáticos mesmo sendo sorologicamente positivos. Esses dados reforçam a importância desses cães na epidemiologia da doença e são coincidentes com os de Feitosa et al (2000), que relatou que 20% a 40% dos cães soropositivos não apresentavam sinais clínicos. Os sinais clínicos mais frequentes foram lesões cutâneas difusas ou simétricas com dermatite esfoliativa, onicogribose e hiperqueratose em focinho e coxins. Alguns animais, especialmente os provenientes do canil municipal apresentaram também magreza e lesões relacionadas a deposição de imunocomplexos como uveíte e úlceras em pontas de orelha.

Quanto à distribuição por sexo, observa-se que há homogeneidade na distribuição de machos e fêmeas entre os animais estudados, mesmo que o resultado tenha apontado um número maior de cães machos infectados. (Figura 18). Além disso, ao se analisar a proporção de machos e fêmeas em relação a presença de sinais clínicos, observou-se que 75,68% dos machos apresentaram-se sintomáticos e 24,32% assintomáticos e nas fêmeas 79,31% de sintomáticas e 20,69% de assintomáticas (Figura 19) (OLIVEIRA et al, 2010). Silva e cols (2017) relataram que, numa pesquisa realizada entre os meses de março a outubro de 2015, em 13 assentamentos rurais na Mesorregião do Sertão da Paraíba, fêmeas foram mais expostas ao risco de infecção, que pode estar associado às variações hormonais e imunológicas que ocorrem nas fêmeas nos períodos de estro e gestação, tornando-as mais susceptíveis à infecção. Estudos anteriores, relatam níveis significativamente maiores de infecção em machos (MONTEIRO 2014), no entanto, essa frequência difere de acordo com a região estudada, não existindo um consenso entre os pesquisadores sobre a frequência da doença de acordo com o sexo (BRASIL 2006; GONTIJO e MELO 2004). Para Bordoni 2014 e Oliveira e cols 2010 o sexo também não foi considerado importante na ocorrência da

doença.

Figura 18 – Representação gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por sexo.

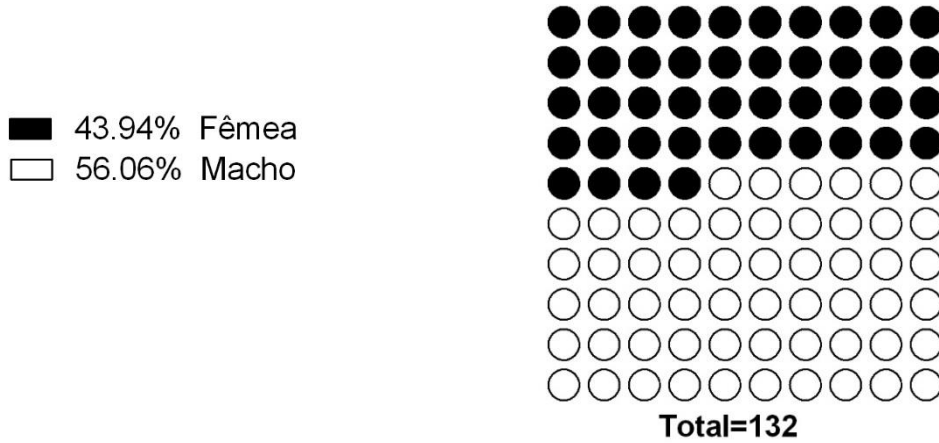
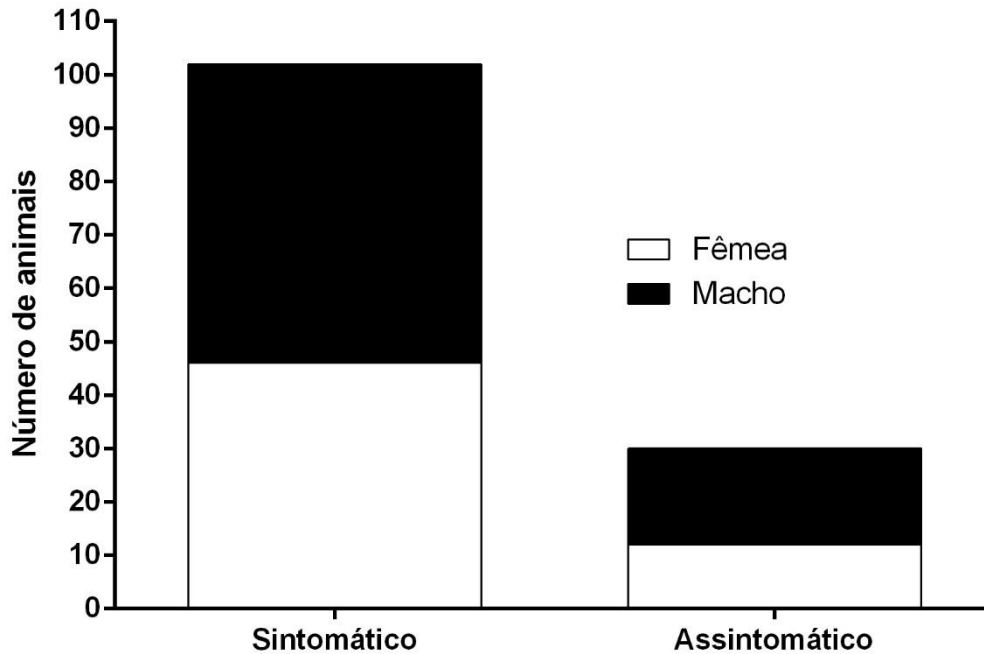
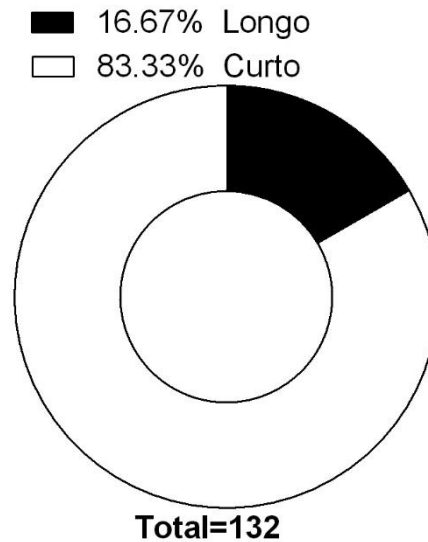


Figura 19 - Representação gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por sexo e sinais clínicos da doença.



Considerando o tipo de pelagem, os resultados apontam para um número maior de cães com pelagem curta (83%) em relação ao número de cães com pelagem comprida (17%) (Figura 20).

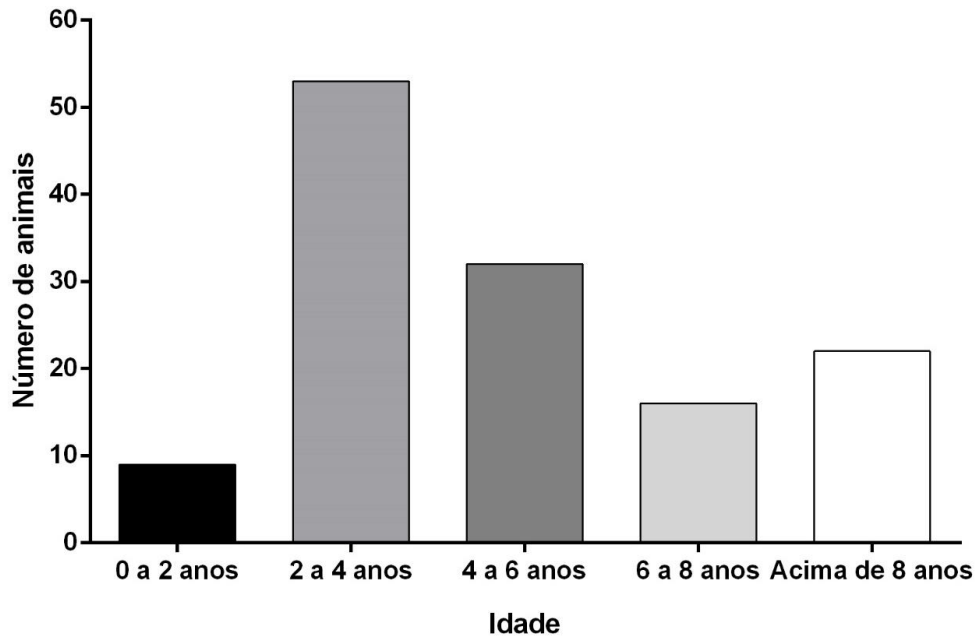
Figura 20 – Representação gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por tipo de pelagem



Corroborando os dados desta pesquisa, Cardoso (2013) relatou que 75% dos cães pesquisados em seu experimento apresentavam pelagem curta e Bordoni, em 2014, observou que pelagem curta é um dos fatores predisponentes que favorecem a infecção por *Leishmania infantum*, pois a pele do animal fica mais exposta para a picada pelo flebótomo. Penaforte e cols 2013 também afirmam que cães com pelagem curta estão mais propensos a serem picados pelo vetor, o que poderia justificar a maior frequência.

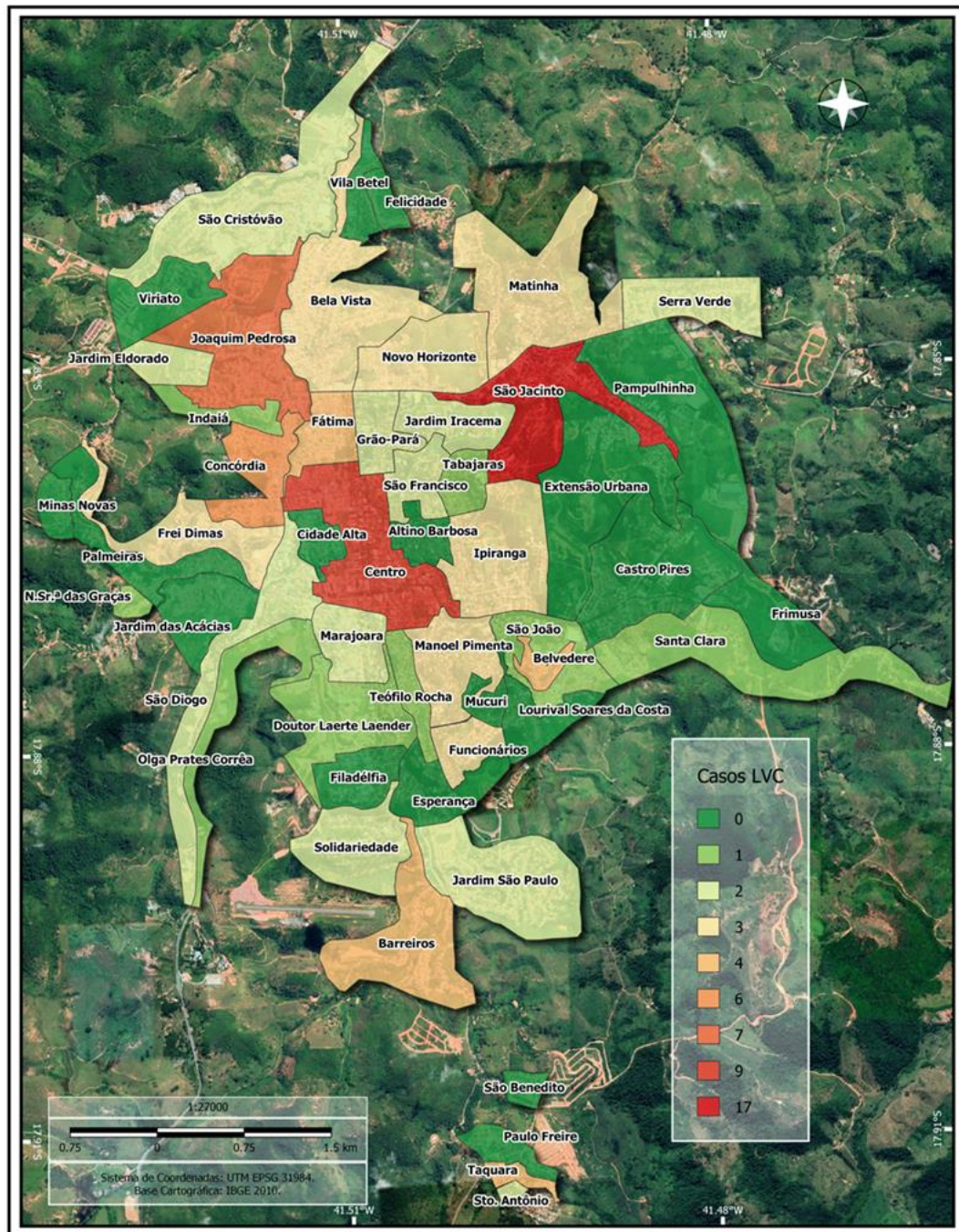
Em relação à idade, a maior frequência (64,39%) de cães com leishmaniose ocorreu em cães adultos-jovens entre 2 a 4 (40,15%) e 4 a 6 anos de idade (24,24%) e a menor em animais considerados filhotes com 0 – 2 anos de idade (6,81%). Nos animais acima de 8 anos a prevalência foi de 16,66%. (Figura 21)

Figura 21 – Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados por idade



A ocorrência de anticorpos anti-*Leishmania* foi observada em todas as faixas etárias. Os animais com 0 a 2 anos de idade apresentaram o menor índice percentual e animais com mais de mais de 6 anos de idade apresentaram um percentual de positividade menor em relação a faixa de animais entre 2 e 6 anos de idade. A manutenção de resultados positivos em testes sorológicos, mesmo por longos períodos após a infecção, pode ser uma importante causa de maior prevalência em cães adultos jovens. (PENAFORTE et al, 2013; SRIVASTAVA et al., 2011). Além disso, esses animais são geralmente mantidos fora de casa, o que aumenta o contato com o vetor (MATOS 2006). Associado a este fator, Figueiredo et al (2014) relatam que a positividade sorológica estatisticamente significativa nos cães adultos jovens pode estar associada à imaturidade imunológica, tornando-os bastante vulneráveis para contrair a infecção. A baixa frequência em animais acima de 6 anos pode estar relacionada com uma melhor resposta imune o que favoreceria a menor infecção dos mesmos. Corroborando com nosso estudo Feitosa et al. (2000), avaliando somente animais positivos para LVC, relataram maior positividade em animais adultos jovens entre três e seis anos de idade.

Figura 22 - Representação dos casos de LVC coletados de agosto/2019 a fevereiro/2020 na Clínica Veterinária São Francisco e no Canil Municipal de Teófilo Otoni/MG



Quanto à distribuição geográfica, os resultados apontam para um maior número de casos de LVC no município de Teófilo Otoni sendo 22 cães da Área Rural, 17 cães do Bairro São Jacinto, 9 cães do Centro, 7 cães do Bairro Joaquim Pedrosa, 6 cães do Bairro Concórdia e 66 cães de outros Bairros, perfazendo um total de 127 cães e 5 cães de outros municípios (Figura 22). Estes resultados mantêm a tendência encontrada em anos anteriores, uma vez que, de acordo com dados fornecidos pela Secretaria de Saúde de Teófilo Otoni, no período de 2015 a 2019, os locais de maior incidência da LVC e LVH aconteceram em áreas da região

Norte da Cidade de Teófilo Otoni, nos Bairros Joaquim Pedrosa, Bela Vista, São Cristóvão e até mesmo na região Central (SinanNet\Tabwin*. Gerenciador de Ambiente Laboratorial\FUNED.SMS-TO). Destaca-se o Bairro São Jacinto, na região nordeste, que apresentou um número alto de casos. Com relação às demais localidades, as diferenças observadas entre as referidas prevalências podem ser atribuídas a diversos fatores como número de amostras, forma de seleção dos cães ou da população (amostragem) adotada (BORDONI 2014; SOLLANO-GALLEGO et al., 2000; MADEIRA et al., 2004; JULIÃO et al., 2007).

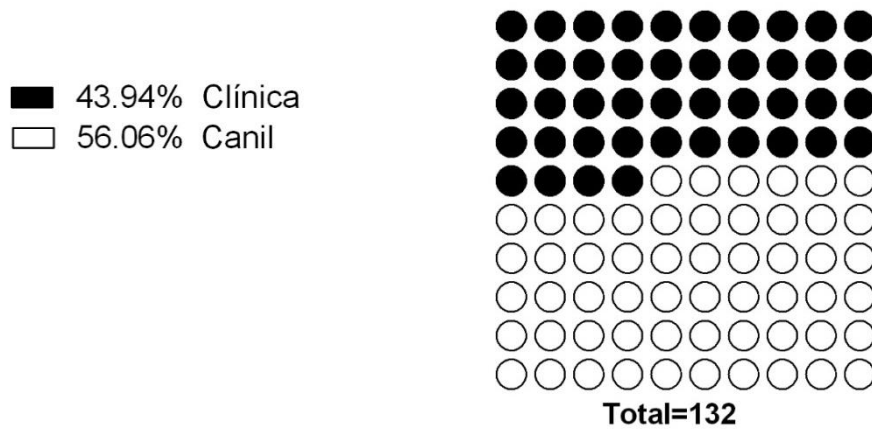
Observa-se que a distribuição da prevalência de LVC entre as diferentes áreas geográficas não foi constante, sendo a prevalência no centro foi de 6,82% e no total de bairros (50%) e outros municípios vizinhos (3,78%). Além disso, obteve-se uma amostragem significativa da Área Rural (16,67%). Os bairros da cidade de Teófilo Otoni que apresentaram maiores índices de prevalência são bairros localizados em regiões menos centrais. Estes valores encontrados nos bairros mais periféricos e na área rural sugerem a existência local de variáveis facilitadoras do ciclo biológico do parasito e do vetor, proporcionando uma intensa atividade de transmissão. Fatores biológicos e climáticos estão relacionados com a prevalência da LVC como a presença de grande quantidade de árvores favorecendo o acúmulo de lixo e matéria orgânica criando um ambiente propício para a presença do vetor (BORDONI 2014).

Nos últimos anos, a cidade de Teófilo Otoni, sofreu drásticas modificações ambientais; áreas antigamente representadas por reserva florestal, atualmente vêm sendo exploradas com construções de casas, condomínios e hotéis, podendo esse desmatamento estar associado com os maiores índices da doença nessas localidades, corroborando com os achados de BEVILACQUA et.al. (2001).

A aquisição de conhecimento sobre os fatores envolvidos na dinâmica de transmissão de *Leishmania infantum* em áreas urbanas e periurbanas é ainda um grande desafio para a saúde pública e pouco ainda se sabe sobre as variáveis que determinam a distribuição da doença nestes ambientes, particularmente sobre a infecção canina (BORDONI 2014; SILVA et al., 2012).

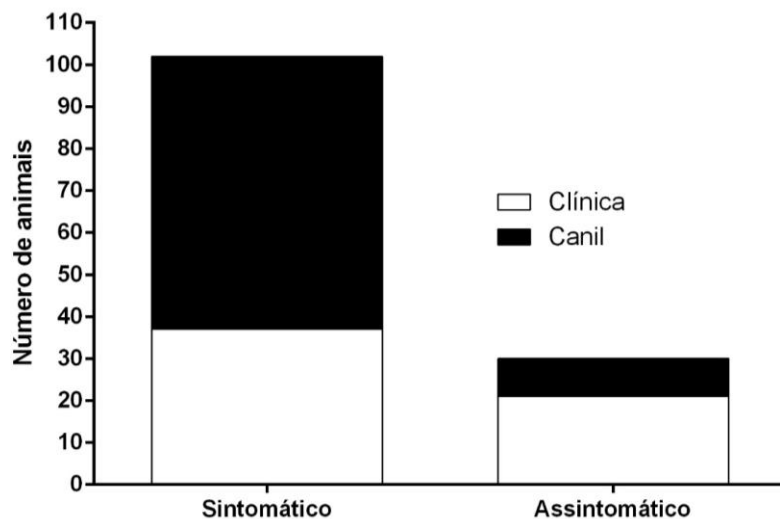
Em relação a procedência dos animais, pode-se observar um maior número de cães procedentes do Canil Municipal (n=74) em relação ao número de cães procedentes da Clínica Veterinária São Francisco de Teófilo Otoni (n=58) (Figura 18). Além disso, 87,84% dos animais provenientes do canil eram sintomáticos, enquanto que 63,79% dos animais provenientes da clínica apresentavam sintomas (Figura 23).

Figura 23 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados de acordo com a procedência dos animais



Uma das dificuldades observadas na realização deste estudo foi a obtenção dos dados de maneira completa nos cães provenientes do Canil Municipal sendo necessária uma coleta de dados mais detalhada sobre os animais por parte dos funcionários do setor de Vigilância Sanitária da PMTO.

Figura 24 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados de acordo com a procedência dos animais e que apresentaram sintomatologia clínica da doença.



O maior número de animais sintomáticos foi proveniente do Canil Municipal (Figura 24). Conforme estudos de Coura-Vital (2011) um grande número de cães assintomáticos infectados tem se mantido como potenciais transmissores silenciosos o que reforça a importância desses animais na cadeia epidemiológica da doença. Albuquerque e Langoni 2018 reforçam a importância da prática da guarda responsável e do bem-estar animal que contribui para melhor controle e resposta do animal, favorecendo assim o controle da

leishmaniose em humanos. Desta forma, os resultados deste estudo sugerem que muitos proprietários não levam seu animal ao Médico Veterinário quando o mesmo apresenta problemas de saúde, e muitos deles, “descartam” o animal no Canil Municipal quando tomam ciência da doença no animal.

Tabela 5 – Comparação percentual de animais tratados e/ou vacinados com presença ou ausência de sinais clínicos

Sinais clínicos	Tratamento/Vacina		
	Tratamento		Vacina
	Alopurinol	Milt + Alop	Leishtec
Presente	12,07%	5,17 %	5,17%
Ausente	12,07%	6,89%	5,17%
Total (%)	24,14%	12,06%	10,34%
Total (n)	14	07	06

No presente estudo, todos os animais que receberam tratamento, seja com Alopurinol, Milteforan ou Vacina, foram tratados e vacinados anteriormente a este estudo ou estavam em tratamento e foram provenientes da clínica.

Dos 132 animais pesquisados, apenas nos provenientes da clínica (58 cães) conseguimos obter informações referentes à tratamento e vacina.

Os resultados apontam que, dos 58 animais provenientes da clínica 21 animais (36,20%) receberam algum tipo de tratamento sendo que 14 animais (24,14%) foram tratados somente com Alopurinol e 07 animais (12,06%) receberam tratamento com Alopurinol e Milteforan, ao passo que 37 animais (63,80%) não receberam nenhum tipo de tratamento. Além disso, não foram detectados animais que receberam Milteforan, mas não receberam Alopurinol. Dentre os animais que receberam ambos os tratamentos, Milteforan e Alopurinol, 5,17% apresentaram sintomas e dos que receberam somente Alopurinol 12,06% apresentaram sintomas. Dentre os animais que foram vacinados (6 cães) o que equivale a 10,34%, a metade tinha sinais clínicos e a outra metade não apresentava nenhum sinal clínico (Tabela 3).

Esses dados reforçam que muitos proprietários ainda desconhecem assuntos pertinentes à leishmaniose canina como ciclo de transmissão, epidemiologia, sintomas,

tratamento e vacinação indicando a necessidade de implantação de medidas de educação em saúde. Além disso, os custos relativamente altos dificultam as ações de controle através de tratamento (Roeder-Ferrari 2020) e vacinação dos animais e na maioria das vezes o tutor opta pela eutanásia do animal (PEDRASSANI et al, 2019). O alto custo do medicamento Milteforan (Roeder-Ferrari 2020) e a não melhora clínica de alguns animais mesmo recebendo o tratamento (VIDES e MORAES 2018) favorecem para que, muitos deles, optem pela eutanásia do animal.

A miltefosina tornou-se uma importante droga no tratamento de LVC, devido ao diferente modo de ação, com base em uma atividade antiparasitária direta e não dependendo de sistema imunológico funcional, sua facilidade de administração, por via oral, e baixa toxicidade (ARAÚJO, COSTA e RISSO 2018). Além disso, mostrou uma eficácia clínica e laboratorial comprovada por Woerly et al. (2009); Miró et al., (2009); Andrade et al. (2011). Neste estudo, verificamos que mesmo sendo tratado com Milteforan, alguns cães não responderam ao tratamento e não tiveram diminuição da carga parasitária, apresentando sintomatologia clínica da doença. Vides e Moraes, 2018, num estudo com tratamento de cães com Miltefosina, também constataram que a o medicamento não redimiu os sintomas clínicos numa pequena parcela de animais. A miltefosina como terapia combinada, mostrou reduzir significativamente os sinais clínicos 30 dias após o tratamento (ARAÚJO, COSTA e RISSO 2018). Nosso estudo mostrou que mesmo recebendo a Vacina Leishtec, alguns animais desenvolveram e apresentaram sintomatologia clínica da doença. Silva 2015, num estudo com cães vacinados com a Vacina Leish-Tec®, constatou que eles apresentavam uma resposta positiva com tendência à redução da infectividade, mas ainda assim continuaram transmitindo o parasito, o que nos leva a crer que, se estavam infectados, poderiam apresentar sintomatologia clínica da doença. Segundo DIVE 2018, a vacina não confere 100% de proteção, dessa forma, mesmo que o cão esteja vacinado, se ainda permanecer em área de transmissão, pode se infectar e tornar-se uma fonte de infecção (reservatório do parasita). Um cão vacinado e que venha apresentar sorologia positiva e ou sintomatologia clínica é interpretado como sinal de que houve a infecção pela *Leishmania* sp, visto que a vacina não confere total proteção.

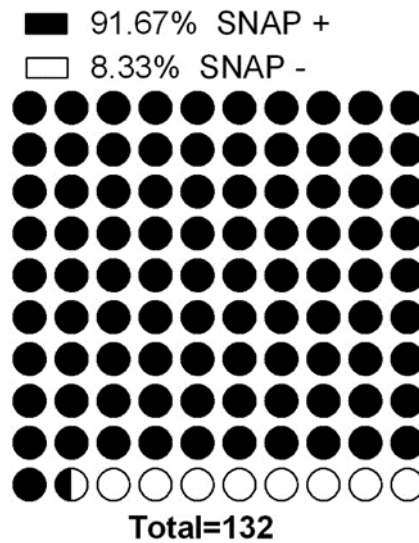
Conforme estudo realizado por Albuquerque e Langoni 2018, a opção preferencial dos veterinários para tratar a LVC é o Alopurinol e uma porcentagem dos animais tratados não responde ao tratamento e ainda apresentam sintomatologia clínica da doença. Assim sendo, muitos veterinários fazem associação de tratamento com Milteforan (leishmanicida) com Alopurinol (leishmaniostático). (ALBUQUERQUE e LANGONI 2018; ARAÚJO,

COSTA e RISSO 2018). O alopurinol, por ser uma droga leishmanioestática, possui uma ação efetiva quando combinada com outras medicações (ALBUQUERQUE e LANGONI; LARSON e LUCAS 2016; MIRÓ et al 2009; SOLANO-GALLEGO 2009).

5.2 - Diagnóstico sorológico

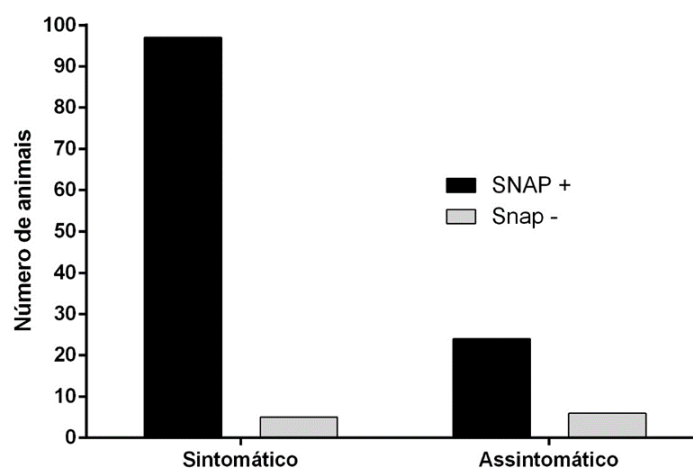
As técnicas recomendadas e fornecidas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de cães são duas: triagem por imunocromatografia com teste rápido Dual Path Platform (TR DPP® leishmaniose visceral canina) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para confirmação dos cães sororreagentes ao teste TR (BRASIL 2019; RIBEIRO et al 2019; ROEDER-FERRARI et al 2020; TEIXEIRA et al 2019). Os métodos sorológicos utilizados no presente estudo, em consonância com o Ministério da Saúde, foram realizados através do TR DPP® (triagem) e ELISA SNAP IDEXX, com sangue venoso. Considerando o ensaio imunoenzimático TR DPP® como triagem com diagnóstico positivo de 100% dos animais (Tabela 4) procedeu-se a realização do Teste ELISA SNAP IDEXX e, interessantemente, 11 animais testados foram negativos, mesmo apresentando DPP positivo (Figura 29) (Tabela 4 e 5). Ribeiro e cols 2019, num estudo realizado com diferentes testes sorológicos no diagnóstico de infecção natural por *Leishmania infantum* em cães, verificou que o teste mais sensível foi o DPP Bio-Manguinhos (97,9%), enquanto o ELISA rápido IDEXX apresentou maior especificidade (100%) e pode ser indicado como o melhor teste confirmatório da infecção, por não registrar resultados falsos positivos, sendo essa a melhor combinação de testes sorológicos para encontrar todos os verdadeiros animais positivos para diagnóstico prévio de LVC. Além disso, os animais positivos no DPP Bio-Manguinhos e negativos no rápido ELISA IDEXX devem ser monitorados, bem como novos testes devem ser realizados, como teste molecular e teste parasitológico. O uso de testes rápidos para o diagnóstico de LVC com resultados de baixos títulos de anticorpos, como ocorre com animais assintomáticos, deve ser avaliado com cautela (Figura 25).

Figura 25 - Representação gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultados positivo para o Teste Rápido de SNAP-IDEXX (ELISA).



Os resultados demonstraram que 3,79% dos animais apresentaram sintomas (Tabela 4 e 5), mesmo tendo o resultado de SNAP negativo, além disso, 18,18% dos cães não apresentavam nenhuma sintomatologia clínica e deram positivo no teste (Figura 26).

Figura 26 - Representação Gráfica do percentual dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de animais positivos sintomáticos no teste SNAP em relação ao grupo de animais positivos assintomáticos no teste SNAP.

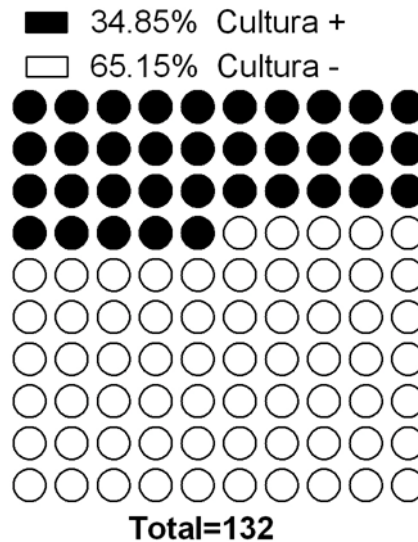


5.3 - Diagnóstico parasitológico

Ao se avaliar os resultados das culturas realizadas com as amostras de aspirado de medula óssea, observou-se que das amostras dos 132 animais, 86 (65,15%) apresentaram

cultura de *Leishmania* sp negativa e 46 (34,85%) apresentaram cultura positiva (Figura 27) (Tabela 5).

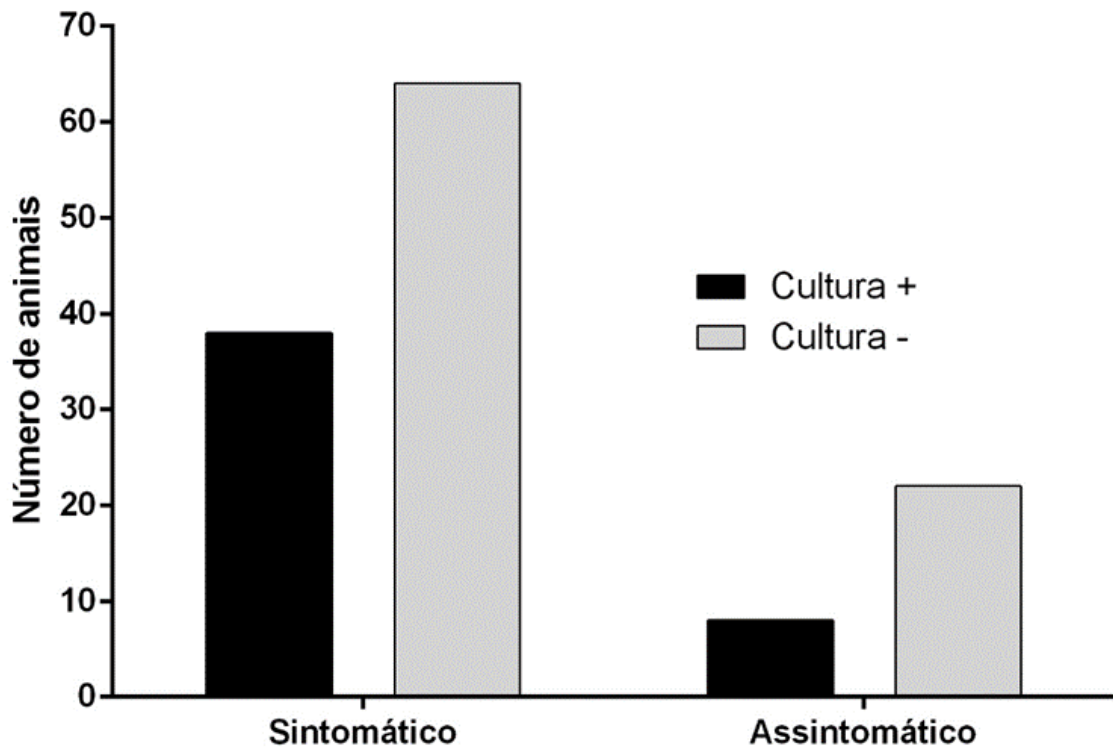
Figura 27 - Representação gráfica do percentual de amostras dos 132 cães avaliados que tiveram resultados positivo ou negativo na cultura.



De acordo com a OMS (1990), a cultura é a técnica considerada padrão ouro para a identificação de *Leishmania* spp. Contudo, deve-se levar em consideração a possibilidade de contaminação durante a coleta e a chance do parasito não se adaptar ao meio de cultura, além do fato de que nem todas as cepas crescem com facilidade ou que os tecidos ou órgãos de um mesmo indivíduo não possuem a mesma carga parasitária (Evans, 1989). Segundo Riboldi 2015, no diagnóstico por isolamento em meio de cultura, o não isolamento das formas promastigotas pode estar relacionado à baixa densidade parasitária e/ou ao pouco material colhido na amostra.

Ao se avaliar os resultados dos 46 (34,85%) animais que apresentaram resultado positivo na cultura, observou-se que animais eram sintomáticos e animais eram assintomáticos, e dos 86 (65,15%) animais que apresentaram resultado negativo na cultura, animais eram sintomáticos e animais eram assintomáticos (Figura 28). (Tabela 4 e 5)

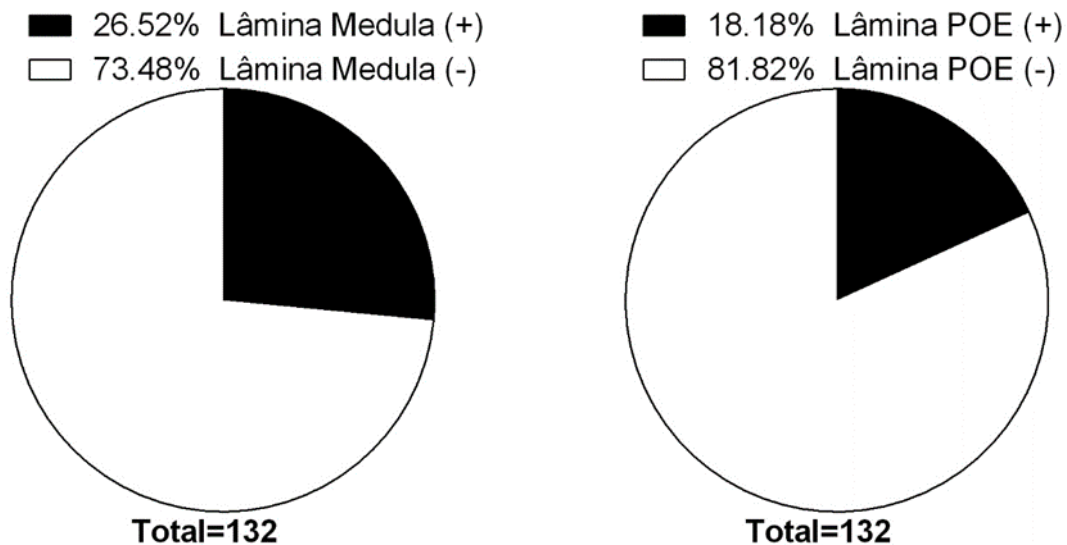
Figura 28 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães sintomáticos com cultura de *Leishmania* sp positiva, cães sintomáticos com cultura de *Leishmania* sp negativa, cães assintomáticos com cultura de *Leishmania* sp positiva e cães assintomáticos com cultura de *Leishmania* sp negativa.



O diagnóstico da LVC é complexo e desafiador, pois não existem testes 100% sensíveis e específicos (ARAÚJO, COSTA e RISSO 2018). Não existe priorização de teste e embora sempre se inicie um processo de diagnóstico a partir dos testes sorológicos, o uso de qualquer teste laboratorial único não tem sido eficaz e aumenta o potencial de erros de diagnóstico (GHARBI et al., 2015; SOLANO-GALLEGO et al, 2011; VULPIANI et al, 2011; PAPADOGIANNAKIS e KOUTINAS, 2015). Isso reforça a necessidade de se fazer uso de mais testes com intuito de fazer o diagnóstico correto da doença.

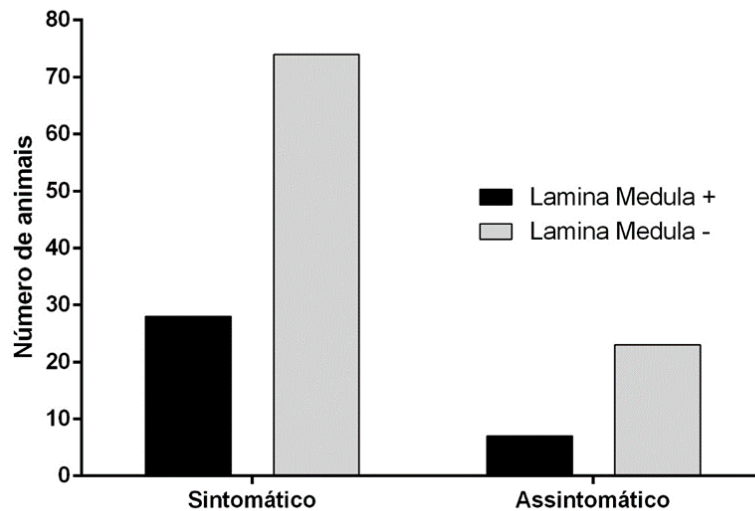
Quanto à leitura de lâminas prévias à cultura, verificou-se presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp em 26,52% das lâminas de Medula e 18,18% das lâminas de Pele de Orelha (PO) (Figura 29) (Tabela 4 e 5), sendo que na maioria destas lâminas não foi encontrado formas amastigotas.

Figura 29 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães com lâmina de Medula (LM) e lâmina de Pele de Orelha (LPO) com presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp (Positivas) e cães com lâmina de Medula e lâmina de Pele de Orelha (PO) sem visualização de formas amastigotas de *Leishmania* spp (Negativas)



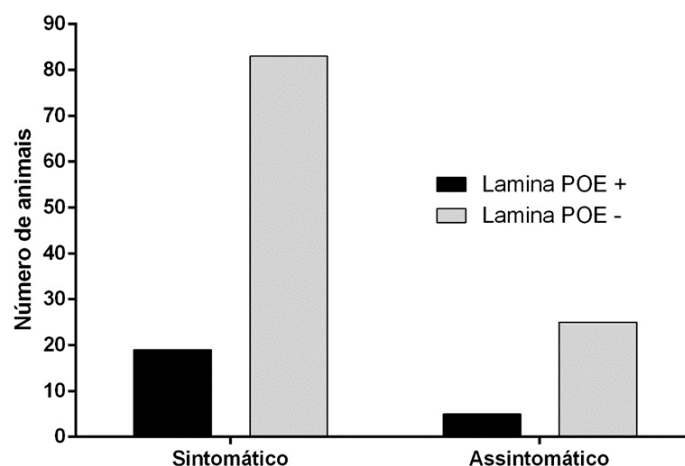
FURTADO, VIOL e BABO-TERRA (2011) concluíram em seus estudos que as Lâminas de imprint com fragmentos de orelha (LPO) apresentam menor positividade quanto a presença de formas amastigotas do que lâminas com esfregaço de sangue de medula. A LVC é caracterizada por diversas manifestações clínicas (HONSE 2014; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Emagrecimento, linfadenopatia, lesões cutâneas e mucosas hipocoradas foram os achados mais frequentes observados neste estudo. A presença de mucosas hipocoradas em cães com anemia tem sido comumente observada nos cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* (ARAÚJO, COSTA e RISSO 2018; FEITOSA et al 2000; OLIVEIRA et al 2010; REIS et al 2006). Nesse estudo foi verificado um grande número de lâminas de Pele de Orelha (LPO) com ausência de amastigotas. É possível que essa ausência de amastigotas esteja diretamente relacionada com a presença de anemia nos cães avaliados neste estudo, que leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo nos tecidos.

Figura 30 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães sintomáticos com lâmina de Medula Positiva e Negativa e cães assintomáticos com lâmina de Medula Positiva e Negativa para *Leishmania* spp.



Quanto à positividade das LM, este estudo mostrou que uma pequena quantidade de cães com LM positiva apresentou sinais clínicos da doença e que poucos cães assintomáticos apresentaram LM positiva (Figura 30) (Tabela 4 e 5). Além disso, uma pequena quantidade de cães com Lâmina de PO positiva apresentavam sinais clínicos da doença e que poucos cães assintomáticos apresentaram Lâmina de PO positiva (Figura 31) (Tabela 4 e 5).

Figura 31 - Representação Gráfica da frequência dos 132 cães avaliados e classificados em grupo de cães sintomáticos com lâmina de Pele de Orelha Positiva e Negativa e cães assintomáticos com lâmina de Pele de Orelha Positiva e Negativa para *Leishmania* spp.



De acordo com Brasil (2006) a citologia tem pouca especificidade em cães assintomáticos, sendo a sensibilidade inferior a 30% (FERRER 1999), além do fato de cães assintomáticos terem baixo rendimento das formas amastigotas (MYKOLANIS et al 2005). A baixa densidade parasitária pode resultar em falso-negativos na citologia, ou mesmo dificultar a identificação morfológica (GOMES et al 2008), aliado ao fato dos parasitos não estarem dispostos de forma homogênea no mesmo tecido (FERRER et al 1988).

Diferentemente do nosso estudo Chagas e colaboradores 2021 realizou um estudo da carga parasitária de vários tecidos associado a presença ou não de sinais clínicos e verificou que na quantificação da carga parasitária, a pele é o tecido que apresenta maior positividade especialmente em animais sintomáticos. Essa divergência de resultados com nosso trabalho pode estar relacionada com alguns fatores como confecção das lâminas, coleta de material em pele íntegra que não apresentava lesões dermatológicas e na variabilidade da carga parasitária entre cães com sinais clínicos e cães sem sinais clínicos.

Tabela 6 - Diagnóstico comparativo com percentual de animais com sinais clínicos presentes ou ausentes nos testes sorológicos e parasitológicos.

Sinais	Diagnóstico									
	Sorológico				Parasitológico					
	DPP		SNAP		Lâmina MO		Lâmina PO		Cultura	
Clínicos	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	(100%)	(0%)	(91,67%)	(8,33%)	(26,52%)	(73,48%)	(18,18%)	(81,82%)	(34,85%)	(65,15%)
Presente	78,03%	0%	73,49%	3,79%	21,18%	55,98%	3,79%	62,88%	29,49%	42,57%
Ausente	21,96%	0%	18,18%	4,54%	5,34%	17,50%	14,39%	18,94%	5,36%	22,58%

5.4 – Diagnóstico Molecular

Ao se avaliar os resultados de PCR e RFLP observou-se que dos 132 animais avaliados, 56 amostras apresentaram resultado positivo para PCR (42,42%) e 76 amostras apresentaram resultado negativo (57,58%) (Figura 32, 33, 34) (Tabela 5) e 69 amostras apresentaram resultado positivo para RFLP (identificação da espécie de *Leishmania* sp), sendo 56 amostras de sangue de medula (81,16%) e 13 amostras de macerado de cultura

positiva (18,84%) que tiveram resultado negativo na PCR (Figura 35, 36, 38, 39) (Tabela 4 e 5). A espécie de *Leishmania infantum* (Figura 35) foi a única espécie encontrada nas amostras analisadas. Os resultados do presente estudo sugerem que as metodologias baseadas em PCR/RFLP para o diagnóstico de LVC são confiáveis, pois são altamente sensíveis e reprodutíveis e envolvem um tempo de procedimento relativamente curto. Eles representam ferramentas úteis na vigilância epidemiológica em áreas endêmicas de LVC, onde os animais apresentam diferentes formas clínicas da doença.

Figura 32 - Representação gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultados positivo e negativo para o Teste de PCR.

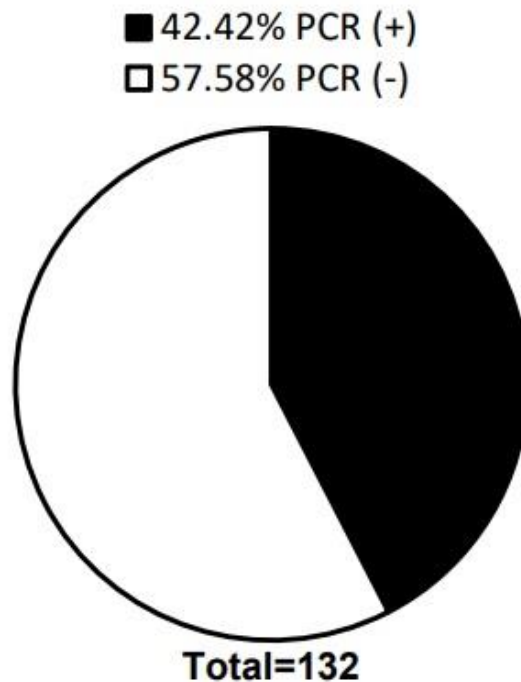
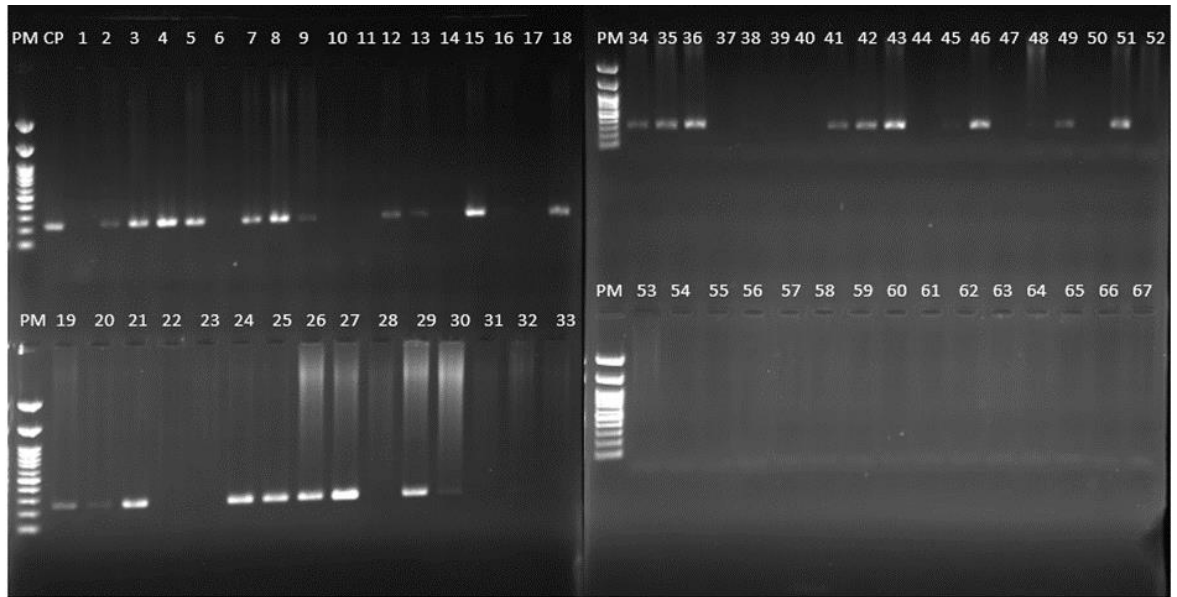


Figura 33 – Foto resultado Teste PCR Amostras 1 a 67



PM: Peso Molecular
CP: Controle Positivo

Figura 34 – Foto resultado Teste PCR Amostras 68 a 132

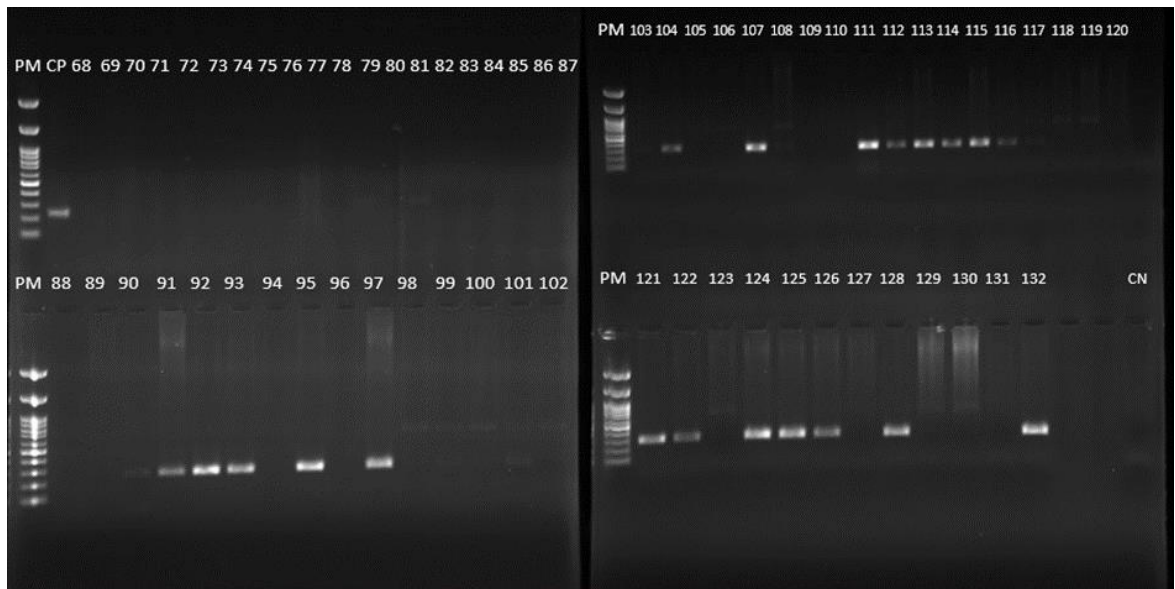


Figura 35 - Representação gráfica do percentual de 132 cães avaliados que tiveram resultado positivo para *L. infantum* (RFLP)

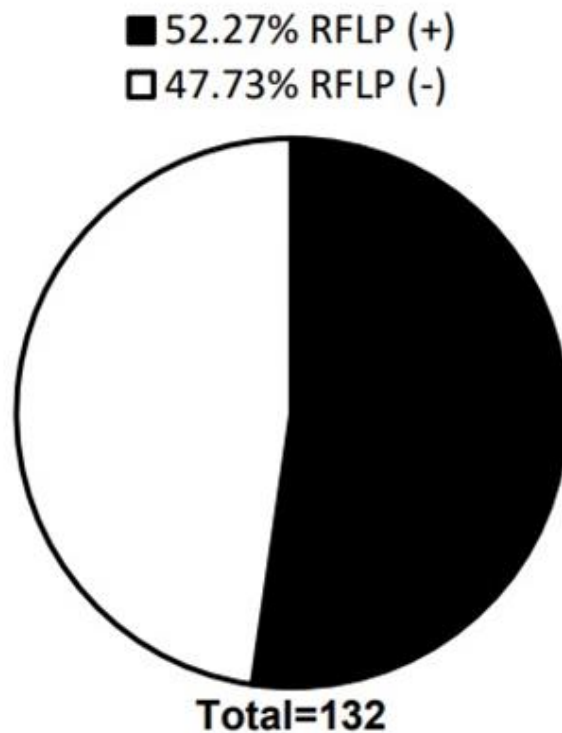


Figura 36 - Representação gráfica do percentual de 69 cães avaliados que tiveram resultados positivo para *L. infantum* (RFLP) considerando o tipo de amostra.

- 81,16% indentificação do *L. infantum* por RFLP em amostra de sangue e medula
□ 18,84% indentificação do *L. infantum* por RFLP em amostra de sangue e medula

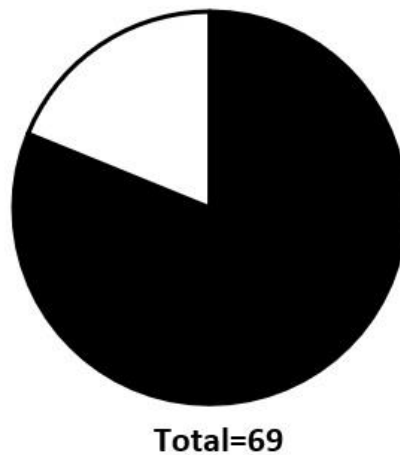


Figura 37 – PCR controles positivos e RFLP controles positivos para as espécies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. guyanensis* (Fotos)

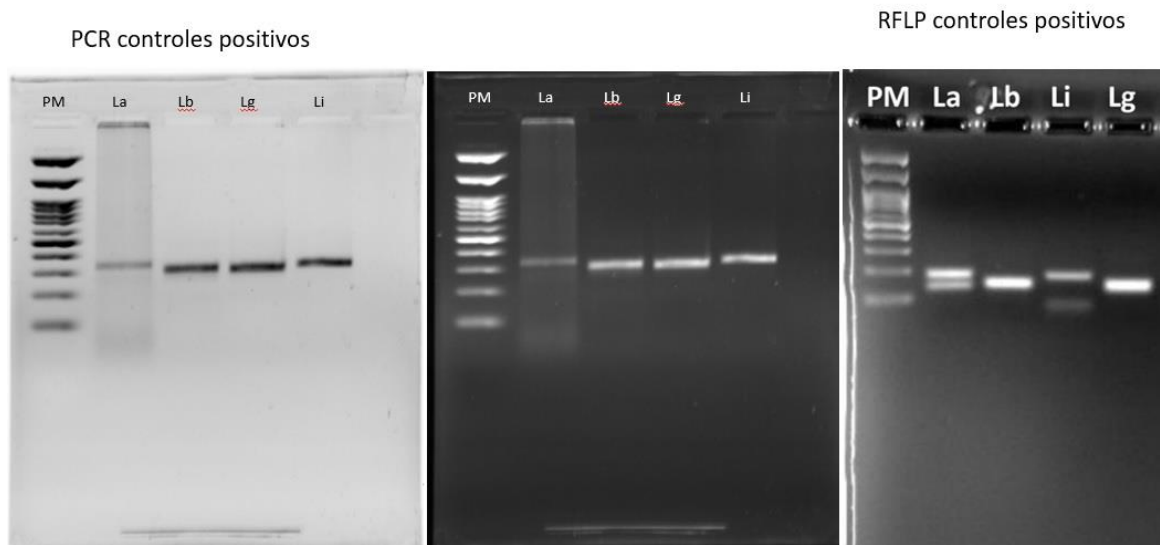


Figura 38 – Fotos resultado Teste RFLP Amostras positivas no PCR de medula óssea

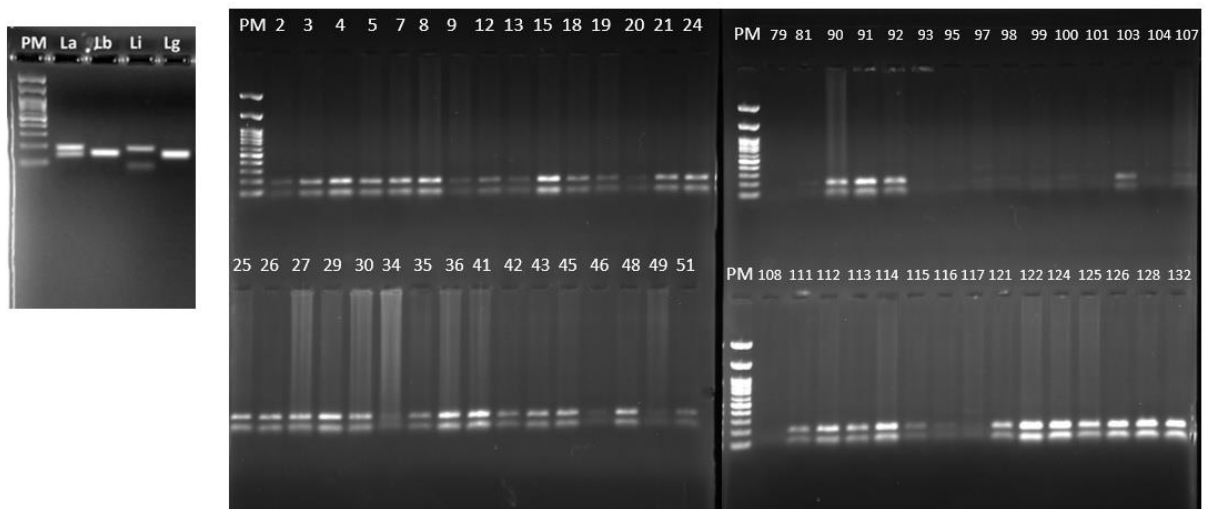
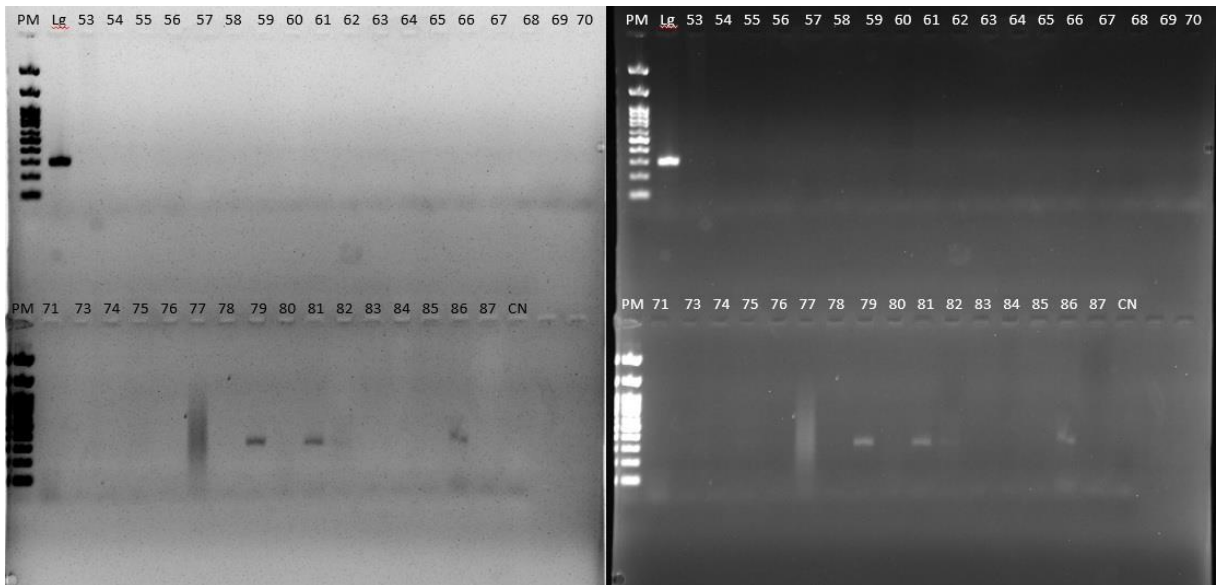


Figura 39 – Fotos resultado Teste RFLP (Amostras Sangue de Medula e Cultura)



No resultado final, 88 cães (66,67%) deste estudo tiveram o diagnóstico confirmado com positividade no RFLP (69) e 19 lâminas positivas para formas amastigotas no teste parasitológico de Lâmina (Figura 40) (Tabela 5).

Figura 40 - Representação gráfica do percentual de 132 cães avaliados que, no resultado final, tiveram diagnóstico positivo para Leishmaniose Visceral.

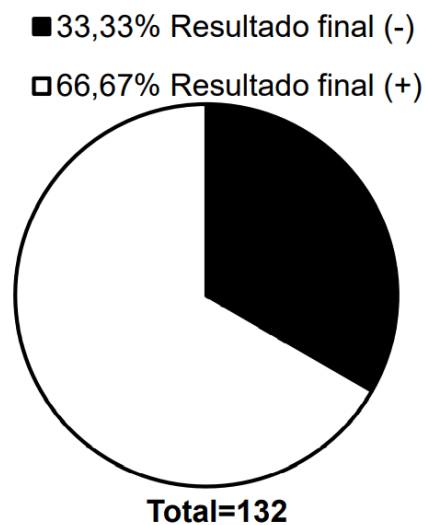


Tabela 7 – Positividade nos testes diagnósticos sorológico SNAP, parasitológicos (Cultura e Lâminas) e moleculares PCR e RFLP.

Métodos diagnósticos positivos	Nº animais	Percentual
SNAP	121	91,67%
Cultura	46	34,85%
Lâminas PO	24	18,18%
Lâmina Medula	35	26,52%
PCR	56	42,42%
RFLP (56 Medula e 13 Cultura)	69	52,27%
Identificação <i>L. infantum</i>		
Positividade em pelo menos um dos testes com identificação de <i>L. infantum</i>	88	66,67%

Assim como QUARESMA et al. 2009, este estudo demonstrou que o PCR é importante na detecção de *Leishmania* sp em amostras clínicas derivadas de cães naturalmente infectados, e que o PCR-RFLP representou uma importante contribuição mostrando que possivelmente os cães da Macrorregião de Teófilo Otoni estão envolvidos somente na cadeia epidemiológica de transmissão da Leishmaniose Visceral. ALVES SOUZA e colaboradores, num estudo semelhante em 2019 também verificou a importância da identificação da espécie para o diagnóstico adequado e para o entendimento epidemiológico e direcionamento de medidas de controle para as Leishmanioses. O diagnóstico etiológico (identificação da espécie) se torna essencial, uma vez que as medidas de controle e o tratamento são diferenciados para cada espécie (BRASILEISH 2018; DANTAS TORRES 2009; RIBEIRO et al, 2013).

QUINELL e colaboradores (2001) demonstraram, num estudo longitudinal em cães naturalmente infectados, que a sensibilidade da PCR era mais elevada logo após a infecção e que posteriormente, declinou à metade. Possivelmente essa seja a explicação para o resultado negativo para PCR em amostras que apresentaram resultado positivo em outros métodos diagnóstico.

A PCR é muito útil para a vigilância epidemiológica de áreas onde casos de LVC ainda não tenham sido descritos e onde estratégias de controle podem ser implantadas para limitar a disseminação da doença (HAAS e TORRES 2016). Apesar de todo o avanço nas

ferramentas diagnósticas, ainda é um grande desafio estabelecer um diagnóstico preciso para a LVC (NUNES et al, 2015).

6.0 – CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que, o diagnóstico de Leishmaniose requer o uso de vários testes diagnósticos e que o PCR, por sua elevada acurácia, pode e deve ser usado para a detecção de *Leishmania* sp em amostras clínicas derivadas de cães naturalmente infectados, sendo que o PCR-RFLP representa uma importante ferramenta, pois a identificação de espécies favorece, assim, a verificação da presença ou não de outras espécies de *Leishmania* spp e sua correlação com a LVH e LTA.

O diagnóstico da LVC ainda enfrenta sérios desafios. Considerando a falta de dados epidemiológicos regionais e locais sobre a leishmaniose e a necessidade de controle da expansão da doença, principalmente por meio do diagnóstico em seu principal reservatório, o cão, a detecção precoce de cães infectados é essencial para o direcionamento e melhoria das ações estratégicas no controle tanto da LVC como na LVH na Macrorregião de Teófilo Otoni, MG.

REFERÊNCIA

- ALBUQUERQUE A. L. H, Langoni H. A prática do tratamento na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos. Vet. e Zootec. 2018 jun.; 25(1):132-141.
- ALENCAR, N. X., Kohayagawa A., Campos K. C. H., Takahira R. K. Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material; Ver, MV & Z, V. 5 N. 2 (2002).
- ALMEIDA A. B. F., Faria R. P., Pimentel M. F. A., Dahroug M. A. A., Turbino N. C. M. R., Sousa V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.42 no.2 Uberaba Mar./Apr. 2009
- ALMEIDA S. S, Gomes C. L, Silva E. C, Brandão S. T. R, Aviz W. P., Pinheiro L. P., Paciello M. O., Cangussu A. S. R., Aguiar R. W. S., Barbosa L. C. B., Giunchetti R. C., Viana K. F. Dual-Path Platform (DPP) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): change the sequence of the tests does not change the number of positive dogs for canine visceral leishmaniasis. Afr J Microbiol Res. 2017; 11:106 –109. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8300>
- ALMEIDA T. S. O., Almeida T. S. O., Ramalho S. N. L. Delineamento das Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil e o seu Impacto Social – Inter Cientia, Vol. 5 • Nº 1 • Ano 2017.
- ALVAR J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol 57: 1-88.
- ALVARENGA F. C. Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico. Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Belo Horizonte, 2013.
- ALVES SOUZA N., Leite R. S., Silva S. O., Penna M. G., Vilela L. F. F., Melo M. N., Andrade A. S. R. Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. Acta Tropica 193 (2019) 12–17
- 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. Cad Saúde Publica. 2004 Jan-Fev;20(1):259-65.
- ALVES W. A. Controle da Leishmaniose Visceral Baseado no Reservatório Canino. Consulta de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en Las Américas Catalogación en la fuente Organización Panamericana de la Salud Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas Rio de Janeiro, PANAFTOSA, © 2006. 152p.
- ANDRADE, H. M; Toledo, V.P.C.P; Pinheiro,M.B; Guimarães,T.M.P.D; Oliveira, N.C, et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (=L.

chagasi) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 181, n. 2–4, p. 83–90, 2011. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/.../S0304401711003293>>.DOI:10.1016/j.vetpar.2011.05.009

ANTUNES T. R., Godoy K. C. S., Oliveira G. G., Silveira A. W., Ramos C. A. N. R., Souza A. I. Técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco de medula óssea para identificação e determinação de intensidade parasitária na leishmaniose visceral canina - *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.70, n.5, p.1362-1368, 2018

APOLINÁRIO F. A rede urbana da mesorregião do Vale do Mucuri: uma proposta de hierarquização por meio de técnicas de estatística multivariada. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Geografia – Tratamento da Informação Espacial, da PUC-MG. Belo Horizonte, 2011.

ARAÚJO A. K L., GONDIM A. L. C. L. 2020. Utilização da imunoterapia no tratamento da leishmaniose visceral canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 48 (Supl 1): 533.

ARAÚJO C. M. C, COSTA A. S., RISSO J. M. R. Uso da Miltefosina como terapia combinada em Leishmaniose Visceral Canina – Relato de caso. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.15 n.27; p. 2018

ARAÚJO L. S. R., Silva J. F., Mendonça I. P., Feitosa T. F., Ribeiro Vilela V. L. R., Costa P. W. L.; Percepções dos profissionais de saúde do município de Sousa-PB sobre leishmaniose visceral. *Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB Revista Principia*, Nº 50 João Pessoa 2020, pag 61-67

BANETH G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L: Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 2008; 24(7):324-330.

BAPELA, M. J.; KAISER, M.; MEYER, J. J. M. South African Journal of Botany Antileishmanial activity of selected South African plant species. *South African Journal of Botany*, v. 108, p. 342-345, 2017.

BATELLA, W. B.; Os limiares das cidades médias: reflexões a partir da cidade de Teófilo Otoni. 2013. 228 páginas. Tese (Doutorado em Geografia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP), campus de Presidente Prudente-SP, 2013.

BATELLA W., Urban structuring of Teófilo Otoni/MG: the social topography of a medium-sized city in the Mucuri Valley *Caderno de Geografia*, v.28, n.54, 2018 ISSN 2318-2962

BELO V. S., Werneck G. L., Barbosa D. S., Simões T. C., Nascimento B. W. L., Silva E. S., Struchiner C. J. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neglected Tropical Diseases*, Califórnia, v. 7, n. 4, 2013.

BEVILACQUA, P. D., Paixão H. H., Modena C. M., Castro M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 1, 2001.

BISUGO M. C., Araújo M. F. L., Taniguchi H. H., Cunha E. A., Santos A. A., Spessoto Junior M., Kaneto C. N., Camargo C. V. O., Polizel M. A., Vigilato M. A. N., Negreiros C. M. S., Okagima M., Gonçalves N. M., Lundstedt L. P., Andrade A. M., Lima V. M. F., Tolezano J. E. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(2):185-193, 2007.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal of Parasitology*, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan 1998.

BORDONI, G. M. Prevalência, distribuição e identificação de prováveis fatores de risco para Leishmaniose Visceral Canina em Camaçari - BA. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

BRASIL - 2016 Nota Técnica no 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa. Autorização para uso milteforan no tratamento da leishmaniose visceral canina. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>. Acesso em 02 de outubro de 2020.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral - 1.^a edição. 5.^a reimpressão. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

BRASIL, Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Paraná. Manual Técnico Leishmanioses Caninas. Curitiba 2015. Última atualização 15/04/2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários, NOTA TÉCNICA N 11/2016/CPV/DFIP/DAS/GM/MAPA. Processo N 21000.042544/2016-94. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wpcontent/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>. Acesso em 09/12/2020.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia de Bolso Leishmaniose Visceral, Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária 1. ed., Brasília - DF: CFMV, 2020

BRASIL. Decreto nº 51.838, de 14 de março de 1963. Baixa Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses. Presidência da República, Brasília, 1963. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D51838.htm. Acessado em: 10 Março 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde (2011). Esclarecimento sobre substituição do protocolo Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina; Nota técnica conjunta nº 01/2011, CGDT-CGLAB/DEVIT/SVSE/MS. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p. ISBN: 978-85-334-2706-8. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf Acesso em 02 de

Outubro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica, 7. ed., Cad. 11, Ministério da Saúde, Brasília/DF, p. 1-64, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.: il.

BRASILEISH. 2017. Estadiamento e Tratamento da LVC. Disponível em: <http://www.brasileish.com.br>. Acessado em 18/12/2020

BRASILEISH. Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da Leishmaniose Canina. 2018.

CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira. Implicações da evolução clínica e da carga parasitária em aspectos histopatológicos da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* [manuscrito] / Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso - 2013.

CARNEIRO, L. A. Estudo prospectivo sobre a dinâmica da evolução clínica e imunológica da infecção canina por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no estado do Pará. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

CFMV 2016. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Disponível em <http://portal.cfmv.gov.br/portal/noticia/index/id/4794/secao/6> Acesso em 09/12/2020.

CHAGAS U. M. R, de Avelar D. M, Marcelino A. P, Paz G. F, Gontijo C. M. F. Correlations between tissue parasite load and common clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Parasitol. 2021 Mar; 291:109368. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109368. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33556846.

COLLINS, F. Fêmea de flebotomíneo. 2011. 1 fotografia.

CONTRERAS I.K., Machado M. A., Rocha C. O. J. M., Oliveira, G. R., Carvalho F. C. G., Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. Pubvet v.13, n.4, a302, p.1-6, Abr 2019.

CORTEGIANO B. M., CHUCRI T. M., Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis at Hovet Unimes in Santos-SP. Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 7, p. 48594-48602 jul. 2020.

COSTA, Ana Flávia Pereira. Influência de diferentes meios de cultura axênicos no crescimento, viabilidade e infectividade de *Leishmania (Leishmania) infantum*. 2019. 115 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

COURA-VITAL W., Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção. Tese (Doutorado) UFMG Departamento de Parasitologia (2011).

COURA-VITAL, W. Marques, J. Veloso, V.M. Roatt, B. M. Aguiar-Soares, D. R. O. Reis, L. E. S. Braga, S. L. Morais, M. H. F. Reis, A. B. Carneiro, M.; Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. 2011 - PLOS Neglected Tropical Diseases, August 2011. V 5 (8) -1291.

COURA-VITAL, W., Ker H. G., Roatt B. M., Aguiar-Soares R. D. O., Leal G. G. A., Moreira N. D., Oliveira L. A. M., Machado E. M. M., Morais M. H. F., Corrêa-Oliveira R., Carneiro M., Reis A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. PLoS ONE 9 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>. 2014.

DANTAS Torres F. Canine Leishmanioses in South America. Parasite & Vector, 2009.

DANTAS TORRES, F., Sales, K. G. S., Silva, L. G., Otranto, D. & Figueredo, L. A. (2017). *Leishmania*FAST15: a rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. Molecular and Cellular Probes, 3165-69.

DANTAS TORRES, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V. M., Paiva-Cavalcanti, M. & Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends in Parasitology, 28(12):531-538.

DIAS D. S., Ribeiro P. A. F., Salles B. C. S., Thaís TO Santos T. T. O., Ramos F. F., Lage D. P., Costa L. E., Portela A. S. B., Carvalho G. C., Chávez-Fumagalli M. A., Caligiorne R. B., Oliveira J. S., Magalhães-Soares D. F., Silva E. S., Galdino A. S., Menezes-Souza D., Duarteuma M. C., Gonçalves D. U., Coelho E. A. F. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. Parasitology International 67 (2018) 344-350.

DIVE/SES/SC. Guia de Orientação Santa Catarina. Vigilância da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf>. Acessado em: 12/06/2019.

ESPIR, Thais Tibery, Características da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente; Manaus: UFAM, 2013.180 f. - Tese (Doutorado em Biotecnologia)

ESSID, R. Rahai F., Msaada K., Sghair I. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. Industrial Crops and Products, v. 77, p. 795-802, 2015.

EVANS D (1989). Handbook on isolation characterization and cryopreservation of

Leishmania. UNDP/ World Bank/ WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Genova: WHO.

FARIA A. R., ANDRADE H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saude 2012; 3(2):47-57

FARIAS H. M. T., Gusmão J. D., Aguilar R. V., Barbosa S. F. A., Perfil epidemiológico da Leishmaniose Visceral Humana nas regiões de saúde do Norte de Minas Gerais. Enferm. Foco 2019; 10 (2): 90-96.

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, São Paulo, ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, E.C. Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias 2010.

FERRER LM, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. Skin lesions in canine leishmaniasis. J. Small Anim. Pract.1988;29(6):381-8.

FERRER LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis na update. Proceeding of the International Canine Leishmaniasis. Fórum Barcelona-Spain.1999:6-10.
FERRER LM. Leishmaniasis: update in diagnosis and therapy. Proceedings ESVD congress PISA, 1997.

FERROGLIO E., Zanet S., Mignone W., Poggi M., Trisciuglio A., Bianciardi P. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot; Parasitol Vet. 144 (1-2): 162-6 – 2007.

FIGUEIREDO M. J. F. M., Souza N. F., Figueiredo H. F., Meneses A. M. C., Silva Filho E., Nascimento G. G. Fatores de risco e classificação clínica associados à soropositividade para Leishmaniose Visceral Canina. Cienc. Anim. Bras., Goiânia, v.15, n.1, p. 102-106, jan/mar. 2014

FRANÇA. A. O., Pompilio M. A., Pontes E. R. J. C., Oliveira M. P., Pereira L. O. R., Goto H., Sanchez M. C. A., Dorval M. E. C. Detecção da infecção por *Leishmania* e progressão para doença em doadores de sangue. 13º Congresso Científico Internacional / Brasil - Itália | OMNIA 2018.

FREITAS E. M., Costa-Val A. P., Michalick M. S., Transmission of *Leishmania infantum* via blood transmission in dogs; potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol 2006. 137 (1-2):159-67.

FUNED.SMS-TO - Gerência de Inteligência de Informações de Saúde\SinanNet\Tabwin*. Gerenciador de Ambiente Laboratorial\FUNED.SMS-TO. Pesquisado em 10 de Janeiro de 2021.

FURTADO, M.V.L., VIOL, M.A. e BABO-TERRA, V.J. Pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. em linfonodos, medula óssea, baço, pele e sangue de cães naturalmente infectados. PUBVET, Londrina, V. 5, N. 30, Ed. 177, Art. 1198, 2011.

GAMA, A. C. de S; Reis, S. Rolim; Figueira, L. de P; Pinheiro, F. G; Leishmaniose Tegumentar Canina: Diagnóstico Parasitológico de infecção por *Leishmania* sp. domiciliados na zona leste do Município de Manaus, AM, BR. XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA – Manaus, 2009.

GHARBI M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. Rev Sci Tech. 2015;34(2):613–26.

GOMES YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. Vet J. 2008;175: 45-52.

GONÇALVES B. de S. Leishmaniose Visceral Canina na área urbana de Cuiabá-MT: Comparação de técnicas laboratoriais, tentativa de desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico e caracterização da espécie de *Leishmania* circulante em amostra selecionada. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP Departamento de Ciências Biológicas – DCB - Dissertação de Mestrado Acadêmico – Rio de Janeiro 2010.

GONTIJO C. M. F., Melo M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas; Rev. Bras. Epidemiol. 2004, vol.7, n.3, pp. 338-349.

GOVERNO DE MINAS GERAIS - Plano Mineiro de Desenvolvimento Integrado - 2016 a 2027 – Perfis Territoriais (Ficha Técnica). Belo Horizonte 2015 - Vol 3 - 361 págs.

GRIMALDI JR, G., Teva A., Ferreira A. L., Santos C. B., Souza-Pinto I., Azevedo C. T., Falqueto A. 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.

GRISOTTI, M. Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. Ciência & Saúde Coletiva, 15 (Supl.1): 1095-1104, 2010.

HAAS D. J., TORRES A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. Revista Científica de Medicina Veterinária Ano XIV Número 26 – Janeiro de 2016 – Periódico Semestral.

HARALAMBOUS C., Antoniou M., Pralong F., Dedet J-P., Soteriadou K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 60 (2008) 33 – 42.

HELLMANN, M. A.; MARCHESAN, E. D.; VELASQUEZ, L. G. Leishmaniose e plantas medicinais: uma revisão. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama, v. 22, n. 3, p. 217-231, Set/Dez 2018.

HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. Phenotypical

characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.

HONSE, Carla de O.; Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutora em Ciências. Rio de Janeiro, 2014.

INCT - IDN. 2013 - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas. Doenças Negligenciadas. Disponível em: <http://www.cdts.fiocruz.br/inctidn/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=112&Itemid=61>. Acesso em Julho 2020.

JESUS, J. R., de Araújo F. A. P., de; Spalding S., Tiecher F. Evaluación serológica de anticuerpos para *Leishmania* spp en la población canina en región de foco de Leishmaniosis Tegumentar Americana en Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Parasitologia Latinoamericana* 61: 121 – 125, 2006 FLAP

JULIÃO, F. S., Souza B. M. P. F., Freitas D. S., Oliveira L. S., Laranjeira D. F., Dias-Lima A. G., Souza V. M. M., Barroin-Melo S. M., Moreira Jr E. D., Paule B. J. S. A., Franke C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 8, p.319-324, 2007.

KLEIN, T.; Longhini, R.; Bruschi, M.L.; Mello, J.C.P. 2009 - Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30 (3): 241-248.

LAMOTHE, J. Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotericine B.39 cas. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'animal de Compagnie*, 32, 133-141, 1997.

LAMOTHE, J. Treatment of canine leishmaniasis from A (Amphotericin B) to Z (Zylorick). In canine Leishmaniasis: an update. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona, Espanha, 1999.

LANA R. S. Eco-epidemiologia das leishmanioses em Jaboticatubas, Serra do Cipó, um importante pólo turístico de Minas Gerais. Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte/Março/ 2014.

LARSSON C. E; LUCAS R. Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária. São Caetano do Sul: Interbook, p. 313-344. 2016.

LAURENTI M.D., Leandro Jr M. V. S., Tomokane T. Y., De Lucca H. R. L., Aschar M., Souza C. F. S., Silva R. M., Marcondes M., da Mata V. R. L. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 205; 444 – 450 – 2014.

LEISH Domus, 2008.

LIMA, Denise A.de; Novo, Shênia P. C.; Santos, Fernanda N.; Maciel, Elvira M. de S G.;

Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba – Rio de Janeiro. *Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA, Três Lagoas*, v. 10, n. 1, p. 157-174 Janeiro/Julho. 2020.

LOPES E. G. Atributos diagnósticos da reação em cadeia pela polimerase com oligonucleotídeos iniciadores direcionados a genoma de cinetoplasto e nuclear de *Leishmania* spp. 2010. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/D.10.2010.tde-06122011-103958. Acesso em: 09/09/2020.

MADEIRA M. F., Schubach A. O., Schubach T. M. P., Leal C. A., Marzochi M. C. A., Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Society of Infectious Diseases*, v.8, p.440-444, 2004.

MAIA, C.; CAMPINO L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, v. 158, n.4, p. 274-287, 2008.

MATOS M. M, Figueira K. D., Amora S. S. A., Suassuna A. C. D., Ahid S. M. M., Alves N. D. Ocorrência da Leishmaniose Visceral em cães em Mossoró, Rio Grande do Norte. *Ciência Animal*, 16(1):51-54, 2006

MARCELINO, A. P.; Filho, J. A. de S.; Bastos, C. de V.; Ribeiro, S, R.; Medeiros, F. A. C.; Reise, I. A.; Lima, A. C. V. M. R.; Barbosa, J. R.; Paz, G. F.; Gontijo, C. M. F.; Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Acta Tropica* 207 (2020) 105495.

MARCONDES M., Biondo A. W., Gomes A. A. D., Silva A. R. S., Vieira R. F. C., Camacho A. A., Quinn J., Chandrashekar R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dog. *Parasitol Vet.* 175 (1-2): 15-9. 2011.

MEDEIROS, R. A. Caracterização da *Leishmania infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada a Saúde) – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MIRÓ, G; OLIVA, G; CRUZ, I; CANAVATE, C; MORTARINO, M, et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 5–6, p. 397– 404, 2009. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20178476>> DOI: 10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x.

MONTEIRO A. G. Diagnóstico molecular e identificação das espécies de *Leishmania* na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil. Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Biologia Celular. Brasília 2014.

MONTEIRO E. M., Silva J. C. S., Costa R. T., Costa D. C., Barata R. A., Paula E. V., Machado-Coelho G. L. L., Rocha M. F., Fortes-Dias C. L., Dias E. S. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.38 no.2 – 2005.

MOREIRA D., Santarém N., Loureiro I., Tavares J., Silva A. M., Amorim A. M., Ouaiissi A., Silva A. C., Silvestre R. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. PLoS neglected tropical diseases, v. 6, n. 1, p. e1469, 2012.

MYKOLANIS ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs affected with *Leishmania infantum*. Vet Clin Pathol. 2005;34(3):243-7.

NCOLLE C. Nouvelles acquisition sur le Kala-zar culture; innovation auchien; etiologie – C. R. Hedd. Scieneset Acad Sci 1908; 146: 498-9.

NERY G., Becerra D. R. D., Borja L. S., Magalhães-Junior J. T., SOUZA B. M. P. S., Franke C. R., Veras P. S. T., Lorangeira D. F., Barroin-Melo S. M. Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. Pesq. Vet. Bras. 37(7):701-707, julho 2017.

NEVES, DP. Parasitologia Humana, 11^a ed, São Paulo, Atheneu, 2005.

NOGUEIRA F. S., Avino V. C, Galvis-Ovallos F., Pereira-Chioccola V. L., Moreira M. A. B., Romariz A. P. P. L., Molla L. M., Menz I. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. Parasites & Vectors 2019; 12(79): 1-11.

NOLI, C.; SARADOMICHELALIS M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Vet. J. 202, 425–435, (2014).

NOVY F. G., Mcneal W. J. The cultivation of *Trypanosoma brucei*: a preliminary note. J. American Med Assoc. 1903; 41: 1266-8.

NUNES, C. M., Lima V. M. F., Melo G. D., Paula H. B., Pereira M. E. G., Tronco C. M. T., Hiramoto R. M., Laurenti M. D., Burattini M. N., Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniasis diagnosis in a longitudinal studies Rev. Bras. Parasitol. V. 24, 402–409, <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015073> (2015).

OLEAGA A., Zanet S., Espíd A., Macedo M. R. P., Gortázar C., Ferroglio E., Leishmania in wolves in northern Spain: A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. Veterinary Parasitology 255 (2018) 26–31.

OLIVEIRA L. C. P., Araújo R. R. de, Alves C. R., Mouta-Confort E., López J. A., Fernanda Mendonça-Lima F. W. de Soroprevalência e fatores de risco para leishmaniose visceral canina na área endêmica de Dias D'Ávila, Estado da Bahia, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2010, vol.43, n.4, pp.400-404.

OLIVEIRA L. F. G., GILBERT B., VILLAS BÔAS G. K., Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. Revista Fitos, Rio de Janeiro, Vol. 8(1): 1-72, Jan-Mar 2013.

OLIVEIRA S. S., Araújo T. M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral

(calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995- 2000). *Cad Saude Publica*. 2003 Nov-Dez;19(6):1681-90.

OLIVEIRA T. S, Miranda F. G, Ribeiro V. M, Santos R. de L.; Análise de métodos de diagnóstico para leishmaniose visceral canina a partir de levantamento de casos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Belo Horizonte, MG; *Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*; 2011; 9(31); 692-696.

OLIVEIRA, A. C., ANTONIO, N. da S., PICCININ, A., Controle e tratamento da Leishmaniose Visceral Canina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódicos Semestral*.

OMS 1990. Guidelines for dog population management. Genebra;1990.

OMS 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2010. (WHO Technical Report Series, 949).

OMS 2011. The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. 12p.

OMS 2016. Leishmanioses. Nota descritiva, Setembro, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em: 20 Out. 2020.

OMS 2019. Leishmaniasis – epidemiological situation. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 13 de Maio de 2020. p.121-134, Jan 1998.

PALATNIK de SOUSA C. B., Santos W. R., França-Silva J. C., Costa R. T., Reis A. B, Palatnik M., W Mayrink W., Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human Am. J. Trop. Med. Hyg., 65(5), 2001, pp. 510–517.

PALTRINIERI S., Solano-Galleno L., Fondati A., Lubas G., Gradoni L., Castagnaro M., Crotti A., Maroli M., Oliva G., Roura X., Zatelli A., Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 1184–1191, <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1184> (2010).

PAPADOGIANNAKIS E. I., Koutinas A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015; 163(3 4):94–102.

PEDRASSANI D., Rodrigues D. G., Santos R. C., Andrejow A. P., Figueiredo F. B. Detecção sorológica de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães atendidos em hospital veterinário escola. *Saúde Meio Ambient.* v. 8, p. 193-206, 2019.

PENAFORTE K. M., Belo V. S., Teixeira-Neto R. G., Ribeiro R. A. N., Oliveira R. B., Schettini D. A., Silva E. S. Leishmania infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal,* v. 22, n. 4, pág. 592-596, out-dez. 2013.

- QUARESMA, P. F., Murta S. M. F., Ferreira E. C., Rocha-Lima A. C. V. M., Xavier A. A. P., Gontijo C. M. F. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, Basel, v.111, p.289–294, 2009.
- QUINELL RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 2001 Mar;122(Pt 3):253-61.
- RAMOS R. A. do N., Pimentel D. de S., Lira N. M. S., Santana M. A., Faustino M. A. da G., Alves L. C. Avaliação da Biopsia de Medula Óssea Esternal e íliaca no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. *Ciência Animal* 22(2): 13 – 16, 2012.
- REGUERA R. M., Morán M., Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2016; 227:98–114.
- REIS A. C. S. M., Borges D. P. L., D’Avila G. V. S. C., Barbosa M. S., Ternes Y. M. F., Santiago S. B., Santos R. S., O Cenário de Políticas Públicas do Brasil diante do quadro das doenças negligenciadas. *Saúde e Ciência em Ação – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde*. v.3, n. 01: Agosto-Dezembro 2016 ISSN: 2447 9330
- REIS, L. C., Brito M. E. F., Souza M. A., Pereira V. R. A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Revista de Patologia Tropical*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, maio-ago., 2006.
- REITHINGER, R. DUJARDIN, J. C, Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol*. 45, 21–25. 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>
- RIBEIRO C. R., Gonçalves C. A., Cruz L. M., Galera P. D. Prevalência da Leishmaniose Visceral Canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal – Brasil. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.20, 1-8, e-49589, 2019
- RIBEIRO V. M., Silva S. M., Menz I., Tabanez P., Nogueira F. S., Werkauser M., Fonseca A. L., Dantas-Torres F. Control of visceral leishmaniasis in Brasil: recommendations from Brasileish. *Parasites & Vectors* 2013, 608.
- RIBEIRO, Luiz Antonio et al; *Leishmania Tegumentar Americana (LTA) em Teófilo Otoni, Minas Gerais: uma visão sócio-econômica*. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2007.
- RIBEIRO, V.M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. *Clínica Veterinária*, São Paulo Ano 12, n.71, p.66-76, 2007.
- RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. *Nosso clínico*, São Paulo, ano 24, p.10-20, 2001.
- RIBEIRO V. M., MIRANDA J. B., Marcelino A. P., Andrade H. M., Reis I. A., Cardoso M.

S., Gontijo C. M. F., Paz G. F. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Parasitology* 274 (2019) 108920.

RIBOLDI, E. O. Tese: Perfil da Leishmaniose Visceral Canina na região Metropolitana de Porto Alegre. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Ciência da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação de Patologia. 2015 140p

ROATT B. M., Aguiar-Soares R. D. O., Reis L. E. S., Cardoso J. M. O., Mathias F. A. S., Brito R. C. F., da Silva S., Gontijo N. F., Ferreira S. de A., Valenzuela J. G., Corrêa-Oliveira R., Giunchetti R. C., Reis A. B. (2017) A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis promotes significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite Burden. *Immunol.* 8: 217. doi: 10.3389 / fimmu. 2017.00217

ROCHA, M. F. Michalsky, E. M. Lara-Silva, F. O. Valadão J. L. França-Silva, J. C. Pinheiro, L. C. Sousa, J. F. Santos, R. C. Soares, M. D. Fortes-Dias, C. L. Dias, E.S. Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil; *PLOS Neglected Tropical Diseases* February 20, 2020.

ROEDER-FERRARI, L.D.; Sousa, R. S.; Garcia, R. C. M.; Pinheiro, P. R.; Ribeiro, C. L.; Deziderio, F. S.; Tuleski, G. L. R. Controle da leishmaniose visceral canina - um enfoque no bem-estar animal. *Clínica Veterinária*, v. 1, p. 78-83, 2020.

ROSSETTI, M.L., Silva C. M. D., Rodrigues J. J. S. Doenças Infecciosas – Diagnóstico Molecular, Capítulo 3 – pág. 41; Ed. Guanabara Koogan, 2006.

ROSYPAL A. C., ZAJAC A. M., LINDSAY D. S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet Clin Small Anim.* 2003; 33:921-37.

SANTARÉM, N. Sousa, S. Amorim, C. G. Carvalho, N. L. Carvalho, H. L. Felgueiras, O. Brito, M. Silva, A. C. da; Challenges in the serological evaluation of dogs clinically suspect for canine leishmaniasis. *Scientific RepoRtS* (2020) 10:3099

SANTOS C. M., Tonial A. L., Duarte V. R., Favacho A. R. M., Ferreira E. C. Análise citológica para diagnóstico de leishmaniose em um gato oligossintomático em área endêmica, Campo Grande, MS, Brasil. *Braz. J. Anim. Environ. Res.*, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 59-71, jul./set. 2018.

SCHIMMING B. C. e PINTO E SILVA J. R. C. Leishmaniose Visceral Canina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* – issn: 1679-7353 Ano X – Número 19 – julho de 2012 – Periódicos Semestral

SCIENCE Photo, 2008.

SILVA F. S., Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* V.1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA J. D., Melo D, H. M., Costa J. A. G., Costa D. F., Silva R. B. S., Melo M. A., Azevedo S. S., Alves C. J. Leishmaniose Visceral em cães de assentamento rural. *Pesq. Vet. Bras.* 37(11):1292-1298, novembro 2017 DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100016

SILVA J. F., FIGUEIREDO K. A., CARVALHO M. G. F. M. Productos naturales para el tratamiento de la leishmaniasis: una tecnologia de exploración. Revista Cubana de Farmácia - Vol. 50, No. 2 (2016).

SILVA K. L. O., Santos D. P., Coelho N. M. D., Silva D. C., Okamoto A. C., Gaetti-Jardim Júnior E. Vaccines Vs Leishmaniasis: A Review. Arch Health Invest (2013) 2(4): 18-28.

SILVA LF, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Veneral Transmission of Canine Visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009 Mar; 160 (1-2): 55-59. (a)

SILVA S. M, Ribeiro VM, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MSM, First Report Transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* a naturally infected bitch from Brazil. Vet Parasitol. 2009 Dec; 166 (1-2): 159-62. (b).

SILVA S. R. Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com LeishTec® (Hertape Saúde Animal S/A) para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*, *Phlebotominae*) / Belo Horizonte, 2015. Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

SILVA, J. P. et al. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 4, p. 480-484, 2012.

SILVA, S. R. da. Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina. Tese (Mestrado) Fiocruz/Minas- Belo Horizonte, 2009.

SILVA. T. L, Manipulação da fisiologia digestiva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*): efeito da Galactosamina na atividade tripsinolítica intestinal do principal vetor de *Leishmania infantum* nas Américas. Tese de mestrado, UFMG, Belo Horizonte 2015.

SINAN/CPDE/DIE/SVE/SubVS/SESMG Pesquisado em 10 de Janeiro de 2021.

SOARES, M. J. V. Seqüenciamento de DNA e imunoistoquímica renal para a detecção de *Leishmania* sp em cães. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2007.

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 leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009; 165:1-18.

SOLANO-GALLEGO L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M. G., Ferrer L., Bourdeau P., Gaetano Oliva G., Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. I. Parasites & Vectors 2011, 4:86.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. Veterinary Parasitology, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOUSA-PAULA L. C., Silva L. G., Sales K. G. S., Dantas-Torres F (2019) Failure of the dog culling strategy in controlling human visceral leishmaniasis in Brazil: A screening coverage issue? PLoS Negl Trop Dis 13(6): e0007553. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007553>

SOUZA M. A., Silva A. G., Afonso-Cardoso S. R., Favoreto Junior S., Ferreira M. S. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras MedTrop 38: 137-141, 2005.

SOUZA M. V. C. Fatores que interferem na sensibilidade do teste parasitológico no diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. 2013 46 f.: il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

SOUZA Y. C. P., Carvalho A. F. S., Carvalho L. A. R., Mansur V. F. R. Testes diagnósticos para Leishmaniose Visceral – Atualidades e Perspectivas. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária – ISSN: 1679-7553 Ano XI – Número 21 – Julho 2013 – Periódico Semestral.

TAVARES D. H. C. Desenvolvimento de proteínas quiméricas de *Leishmania chagasi* utilizando regiões antigênicas de proteínas recombinantes previamente selecionadas. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco - Recife 2012.

TEIXEIRA A. I. P. Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina. Teses Doutorado em Medicina Tropical 178 p. Brasília 2019.

TEIXEIRA A. I. P.; Silva, D. M.; Vital T.; Nitz N. Carvalho B. C.; Hecht M.; OLIVEIRA, D. Oliveira E.; Rabello A; Romero G. A. S. Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 114, n. e180452, p. 1-9, 2019. doi: 10.1590/0074-02760180452.

TEIXEIRA NETO, R. G. Análise espacial das leishmanioses no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Belo Horizonte, 2014.

TEIXEIRA, Daniel de Azevedo; Silva, Iris Emília; Validação da Técnica do Teste Rápido DPP – LVC nos Municípios sob jurisdição do Laboratório Macrorregional de Teófilo Otoni – MG no ano de 2015. www.unipacto.com.br/revista-multidisciplinar/arquivos_pdf../revista2016_1/13.pdf

TRUJILLO C, Ramirez R, Vélez ID, Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. Immunol Lett 70: 203-209, 1999.

VALDIVIA H. O. et al. Comparative genomics of canine isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. Scientific Reports 7, 40804; doi: 10.1038 / srep40804 (2017).

VAN DER AUWERA, G., DUJARDIM, J. C. 2015. Species typing in dermal leishmaniasis.

Clin. Microbiol. Rev. 28, 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>

VASCONCELOS R. S. et ali; Doenças Negligenciadas: Revisão de Literatura sobre as intervenções propostas. *Sau. & Transf. Soc.*, ISSN 2178-7085, Florianópolis, v.6, n.2, p.114-131, 2016.

VAZ T. P., Gama-Melo M. O., Quaresma P. F., Gontijo C. M. F., Santos G., Barbosa F. S., Fonte G., Evaluation of the euthanasia of seropositive dogs for canine visceral leishmaniasis as the only method of controlling the disease in the enzootic area in the Midwestern Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.* 2020, vol.40, n.2, pp.107-112.

Vides J. P.; Moraes L. R. S. Tratamento da Leishmaniose visceral canina com miltefosina – relatos de casos. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 16, n. 3, p. 80-80, 11 dez. 2018.

VULPIANI P. M., Iannetti L, Paganico D, Iannino F, Ferri N. Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: State of the art. *Vet Med Int.* 2011; 2011(6): 215964.

WOERLY, V; Mayenard L; Sanquer, A; Hyone-Myong Eun. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitology Research*, v. 105, n. 2, p. 463–469, 2009. Disponível em < <https://trove.nla.gov.au/work/78397085>> DOI: 10.1007/s00436-009-1404-2.

XIMENES L. J. F. e organizadores. Perfil socioeconômico do Norte de Minas – Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2016.

ZOONOSES\SMSTO\Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL. Pesquisado em 10 de Janeiro de 2021.

APÊNDICE – ANEXOS:

ANEXO 1

	<small>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</small>															
CERTIFICADO																
Teófilo Otoni, 16 de julho de 2019.																
<p>Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LCV) NA MACRO REGIÃO DE TEÓFILO OTONI – MG: DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE DE LEISHMANIA SP.", registrada com o nº 03-2019 R, sob a responsabilidade de Alessandra de Paula Carli - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em 17ª Reunião Ordinária, no dia 09 de julho de 2019.</p>																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%;">Finalidade</td> <td>() Ensino (X) Pesquisa Científica</td> </tr> <tr> <td>Vigência da Autorização</td> <td>01/08/2019 a 31/03/2020</td> </tr> <tr> <td>Espécie/linhagem/raça</td> <td>Cão</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td>130</td> </tr> <tr> <td>Peso/Idade</td> <td>várias</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Machos e Fêmeas</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Clínica Veterinária São Francisco, em Teófilo Otoni, MG; casa do proprietário, em Teófilo Otoni, MG; e Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG.</td> </tr> </table>			Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	Vigência da Autorização	01/08/2019 a 31/03/2020	Espécie/linhagem/raça	Cão	Nº de animais	130	Peso/Idade	várias	Sexo	Machos e Fêmeas	Origem	Clínica Veterinária São Francisco, em Teófilo Otoni, MG; casa do proprietário, em Teófilo Otoni, MG; e Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica															
Vigência da Autorização	01/08/2019 a 31/03/2020															
Espécie/linhagem/raça	Cão															
Nº de animais	130															
Peso/Idade	várias															
Sexo	Machos e Fêmeas															
Origem	Clínica Veterinária São Francisco, em Teófilo Otoni, MG; casa do proprietário, em Teófilo Otoni, MG; e Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG.															
<p><i>Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.</i></p>																
<p><i>Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.</i></p>																
 Sarah Alves Auharek <small>Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM</small>																
<small>Campus do MUCURI Comissão de Ética no Uso de Animais/UFVJM Prédio do ICET, sala 217 – Rua do Cruzeiro, 01 – Jardim São Paulo – Teófilo Otoni/MG – CEP 39803-371 Telefone: +55 (33) 3529-2700</small>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;">CEUA</td> <td style="padding: 5px; font-size: small;">Comissão de Ética no Uso de Animais</td> </tr> </table>		CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais												
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais															

ANEXO 2

Termo de Consentimento

Título do Projeto: Estudo Epidemiológico da Leishmaniose Visceral Canina (LCV) na Macrorregião de Teófilo Otoni – MG – Brasil: Diagnóstico, Prevalência Canina e identificação da espécie de *Leishmania* sp.

Nome do Pesquisador Principal: Lídia Roedel Hinkelmann Berbert
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Orientador: Alessandra de Paula Carli

Coorientadora: Caio César Caio de Souza Alves

Objetivos do Estudo:

O Objetivo desse estudo é fazer diagnóstico para *Leishmania* sp em cães (*Canis familiaris*) com ou sem sintomatologia clínica que forem avaliados na Clínica Veterinária São Francisco em Teófilo Otoni, MG, na casa do proprietário quando se fizer necessário e no Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG com intuito de estudar a prevalência e identificação das espécies de *Leishmania* na macrorregião de Teófilo Otoni, MG, Brasil. O cão é considerado o reservatório doméstico da LV, sendo também aventada a hipótese de ser uma importante fonte de infecção de LT. Esse estudo se torna muito importante para o estabelecimento de medidas eficientes de diagnóstico e controle, já que a qualificação e a quantificação parasitária em diferentes amostras clínicas nos cães pode ser útil na indicação da participação do mesmo como fonte de infecção. Este estudo poderá estabelecer critérios e cuidados necessários com os cães, que podem diminuir o avanço da LT e LV em humanos e esclarecer a real importância dos cães no ciclo de transmissão da doença.

Procedimentos a serem realizados com o animal:

Atendimento com avaliação clínica do animal na Clínica Veterinária São Francisco, ou no Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG;

Procedimento de diagnóstico de triagem com Teste de DPP Biomanguinhos e SNAP IDEX ELISA;

Em caso de um dos exames de triagem darem positivo será realizada coleta de pele de Orelha Esquerda com prévia assepsia e anestesia no local. Essa coleta será realizada com Punch descartável 5 mm e em seguida será realizada a impressão por aposição (Imprint) do fragmento de pele em lâmina e fixação com metanol para posterior coloração por Panótico Rápido. O fragmento de pele e a lâmina com Imprint será enviada para a FIOCRUZ BH para realização de leitura parasitológica da lâmina e realização de PCR do fragmento de pele.

Será realizada a coleta de sangue de medula óssea no osso Esterno com prévia tricotomia, higienização e assepsia do local com álcool 92%, anestesia local com Lidocaína e punção com agulha descartável 40 x 12 e seringa descartável de 10 ml. Esfregaço em lâmina do sangue de medula, fixação com metanol e posterior coloração por Panótico Rápido e PCR do sangue de medula para diagnóstico e identificação da *Leishmania* em questão.

O número de atendimentos pode variar de acordo com a necessidade de cada animal. Os procedimentos de coleta de materiais poderão ser feitos na casa do proprietário, mas preferencialmente serão realizadas na clínica. Nos animais do canil a coleta será realizada no próprio Canil Municipal da Prefeitura Municipal de Teófilo Otoni, MG.

Potenciais riscos para os animais: Nenhum. Haverá somente o desconforto causado no momento dos procedimentos para coleta de material.

Cronograma: Coleta de Material no período de agosto/2019 a fevereiro de 2020.

Previsão de Amostragem: 130 animais

Benefícios: Possibilitar o controle da Leishmaniose Humana e Canina através do Diagnóstico, prevalência de *Leishmania sp* em cães e identificação da espécie na Macrorregião de Teófilo Otoni, MG.

O proprietário será devidamente esclarecido sobre o objetivo, procedimentos que serão realizados em seu animal e os benefícios deste estudo para o controle da Leishmaniose Visceral em humanos e cães.

Sua autorização para a inclusão do seu animal nesse estudo é voluntária. Seu animal poderá ser retirado do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele.

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.

Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo seu animal será a Dra Lídia Roedel Hinkelmann Berbert, inscrita no CRMV-MG sob o nº 3104. Além do Médico Veterinário responsável, a equipe do pesquisador principal Prof. Dra Alessandra de Paula Carli também se responsabilizará pelo bem-estar do seu animal durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador principal ou com a sua equipe pelos contatos: alessandrapcarli@hotmail.com ou caio.alves@ufvjm.edu.br (Coorientador)

Tel. de emergência: 33-98834-6162

Equipe: Clínica Veterinária São Francisco

Endereço: Rua Mário Campos Nº 96 – Centro – Teófilo Otoni – MG - Brasil

Telefone: 33-3522-1104/33-98824-8581

ANEXO 3

Declaração de Consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s) a seguir, neste projeto de pesquisa. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma ficará comigo e outra com o pesquisador.

Identificação do Animal

Nome do animal:

Número do Animal:

Espécie: Canina Idade/Nasc:

Raça:

Teófilo Otoni – MG, Atendimento em:

Nome do Responsável/Tutor:

Endereço:

RG:

CPF:

Assinatura Responsável/Tutor

Nome do Pesquisador Responsável: Lídia Roedel Hinkelmann Berbert

Endereço: Rua Mário Campos Nº 96 – Centro – Teófilo Otoni – MG

RG: MG 1526266 PCMG CPF: 349.115.706-44

Assinatura Pesquisador Responsável

ANEXO 4**Ficha Epidemiológica - Questionário para Pesquisa Mestrado UFVJM – Leishmaniose**

1 – Nome do Proprietário

Endereço:

Fone (s):

2 – Nome do Animal:

Idade:

Espécie:

Raça:

Sexo: () Masculino () Feminino

Pelagem: Curta () Longa ()

Já apresentou alguma doença anteriormente? () Sim () Não Qual?

Com diagnóstico confirmado? () Sim () Não Qual foi o tratamento?

Já foi vacinado? () Sim () Não Contra quais doenças? Quais Vacinas? () Polivalente

() Raiva () Leishtec () Giárdia () Pneumodog () Bronchiguard ()

Outras _____

Faz uso de algum medicamento? () Sim () Não Qual?

Faz uso de Alopurinol? () Sim () Não

Já fez tratamento com Milteforan? () Sim () Não Quantas vezes (ciclos de 28 dias)?

Usa Coleira para prevenir contra Leishmaniose? () Sim () Não

Se sim, qual a marca (nome)? () Scalibour () Levree () Seresto

Troca a coleira dentro do tempo previsto pelo fabricante?

O animal vive em que local da casa? Apto () Casa () Dentro de casa () No quintal

() Na Fazenda ()

O animal viaja com frequência? () Sim () Não Para Onde? Fazenda ()

Praia () Outros ()

Veterinário Responsável pela coleta de material:

Testes Realizados: DPP Biomanguinhos () Snap IDEX ELISA ()

ELISA TECSA () RIFI TECSA () Fragmento de Ferida(s) () Sim Quantos?

Fragmento de Pele (OE) () Imprint Pele () Punção de Medula ()

Esfregaço de sangue de Medula () Sintomatologia - Sim () Não ()

 Médico Veterinário Responsável pela coleta - Carimbo

ANEXO 5

Manifestações Clínicas		DPP	SNAP	Prognóstico
Nome:		Número:		
Cães Assintomáticos	Nenhuma sintomatologia Clínica que possa levantar qualquer suspeita da doença			Bom
Sintomáticos Leves	Linfoadenomegalia isolada			Bom a Reservado
	Dermatite isolada e discreta			
Sintomáticos moderados	Lesões cutâneas difusas ou Simétricas			Reservado a Ruim
	Dermatite esfoliativa			
	Onicogribose			
	Hiperqueratose (focinho e coxins)			
	Ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas)			
	Linfoadenomegalia generalizada			
	Perda de Appetite			
	Perda de peso			
Sintomáticos Graves	Lesões relacionadas a deposições de imunocomplexos (Uveíte, Úlceras profundas em pontas de orelha, Glomerulonefrite)			Reservado a Ruim
Sintomáticos muito graves	Tromboembolismo pulmonar			Ruim
	Síndrome nefrótica/doença renal grave			

ANEXO 6

DECRETO Nº 51.838, DE 14 DE MARÇO DE 1963

Baixa Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, usando da atribuição que lhe confere o art. 87, item I, da Constituição, resolve baixar as seguintes Normas Técnicas Especiais para o Combate as Leishmanioses no País, de acôrdo com os artigos 26 e 131 do Decreto nº 49.974-A de 21 de janeiro de 1961 e obedecido o dispositivo do artigo 8º do mesmo Decreto:

Art. 1º O combate às leishmanioses tem por objetivo a interrupção da transmissão da doença do animal ao homem, e ou inter-humana.

Art. 2º Ao Departamento Nacional de Endemias Rurais compete a execução das medidas profiláticas necessárias à obtenção do que estabelece o art. 1º.

Art. 3º O Departamento Nacional de Endemias Rurais executará as seguintes medidas profiláticas:

- a) investigação epidemiológica;
- b) inquéritos extensivos para descoberta de cães infectados;
- c) eliminação dos animais domésticos doentes;
- d) campanhas sistemáticas contra os flebotomos nas áreas endêmicas;
- e) tratamento dos casos humanos.

Art. 4º O Instituto Nacional de Endemias Rurais realizará isoladamente, ou em conjunto com outros órgãos de pesquisas, as seguintes atividades:

- a) inquéritos para a descoberta de animais reservatórios;
- b) investigação das espécies transmissoras, sua bionomia e distribuição geográfica.

Art. 5º A educação sanitária será realizada com objetivo de esclarecer a população sôbre a importância do cão na epidemiologia da doença, ressaltando a necessidade da eliminação do animal doente.

Art. 6º De acôrdo com a lei, é compulsória a notificação à autoridade sanitária da ocorrência de casos de Leishmaniose, positivos ou suspeitos.

Art. 7º Para o cumprimento do que estabelece os Artigos 3º e 4º, as autoridades sanitárias e seus auxiliares terão livre ingresso em todos os locais que forem julgados de interêsse para o combate á doença.

Art. 8º Nas áreas endêmicas será obrigatório o exame dos cães, visando manter o contrôle da zoonose na população acima.

Art. 9º Os cães encontrados doentes deverão ser sacrificados, evitando-se, porém, a

crueldade.

Art. 10. O Departamento Nacional de Endemias Rurais elaborará as instruções de serviço necessárias ao cumprimento destas normas.

Art. 11. Ficam revogados os artigos de números 1.572 a 1.575 do Decreto nº 16.300 de 31 de dezembro de 1923.

Brasília, D.F., 14 de março de 1963; 142º da Independência e 75º da República.

JOÃO GOULART

Paulo Pinheiro Chagas



LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O que é, quais são os sintomas e como proceder?





Sumário

Prefácio.....	p.3
Introdução.....	p.4
Sintomas.....	p.6
Como é feita a transmissão?.....	p.8
Como prevenir a doença?.....	p.9
Como é feito o diagnóstico?.....	p.10
Tratamento x Cura.....	p.11
Mitos e Verdades.....	p.12
Referências.....	p.15





Prefácio

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Leishmania sp.* e transmitida através da picada do mosquito-palha, também conhecido como birigui. Porém, o mosquito só transmite a *Leishmania sp.* se estiver infectado, ou seja, se antes houver picado um animal já infectado.

Os principais reservatórios são os animais silvestres, no entanto o cão doméstico também pode servir como hospedeiro, e tem se tornado um importante reservatório do parasita principalmente em áreas urbanas.

A leishmaniose é uma doença com alta prevalência em regiões de clima tropical, que é um clima alternadamente úmido e seco, tornando-se presente em todos os estados brasileiros, inclusive em Minas Gerais.

Concordando com este cenário, Teófilo Otoni apresenta um alto número de casos de leishmaniose, tanto canina quanto humana.

Tendo em vista esta alta prevalência de casos e o alto impacto desta patologia no bem estar social, esta cartilha tem como objetivo orientá-lo (a), fornecendo informações e dicas sobre a Leishmaniose.





Introdução

A leishmaniose é uma doença que apresenta diferentes formas clínicas, dependendo da espécie do parasita, e pode ser dividida em Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). As principais espécies encontradas no Brasil são a *L. donovani* e *L. infantum*.

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como calazar, é uma doença infecciosa sistêmica grave e zoonótica, ou seja, uma doença transmitida entre animais vertebrados e seres humanos. A transmissão acontece através da picada do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* infectado, conhecido popularmente como mosquito-palha.

A espécie *L. infantum* causa Leishmaniose Visceral tanto em humanos quanto em cães, sendo a principal espécie causadora da Leishmaniose Visceral Canina.

O entendimento sobre o que é a Leishmaniose é muito importante, pois nosso país apresenta quadros graves de epidemias e endemias. Considerando a transmissão dessa doença entre animais e seres humanos, o controle de infecções nos reservatórios é vital para restringir a transmissão da leishmaniose visceral para humanos.

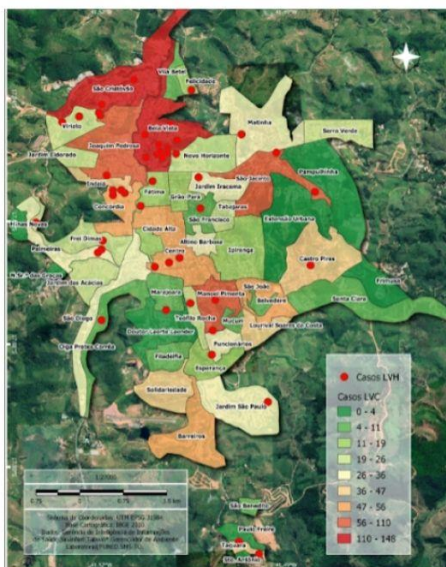


5 Leishmaniose Visceral Canina: O que é, quais são os sintomas e como proceder?



Segundo a Organização Mundial de Saúde, o cão doméstico é o principal reservatório para a doença humana. O Brasil registrou recentemente um grande aumento no número de casos humanos e caninos de Leishmaniose Visceral, sendo Minas Gerais um dos estados com maiores índices de notificação.

Pode-se observar, no mapa abaixo do município de Teófilo Otoni - MG, a relação entre o maior número de diagnósticos de Leishmaniose Visceral em humanos nas regiões de maior número de casos de Leishmaniose Visceral Canina, o que evidencia a importância do conhecimento e prevenção da doença nos cães.



Fonte: Elaboração própria, 2020.





Sintomas

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos.

Sintomas nos cães:

Os cães, quando infectados, podem ficar assintomáticos ou podem apresentar sintomas clássicos:

- Emagrecimento
- Lesões e descamação no pelo
- Aumento das unhas,
- Aumento do fígado e do baço,
- Aumento dos linfonodos,
- Queda dos pelos,
- Dermatites,
- Inflamação dos olhos,
- Edema de patas,
- Perda de pesos e
- Eventualmente vômitos.

O período de incubação no cão varia de 3 meses a vários anos, com média de 3 a 7 meses.



**Sintomas nos humanos:**

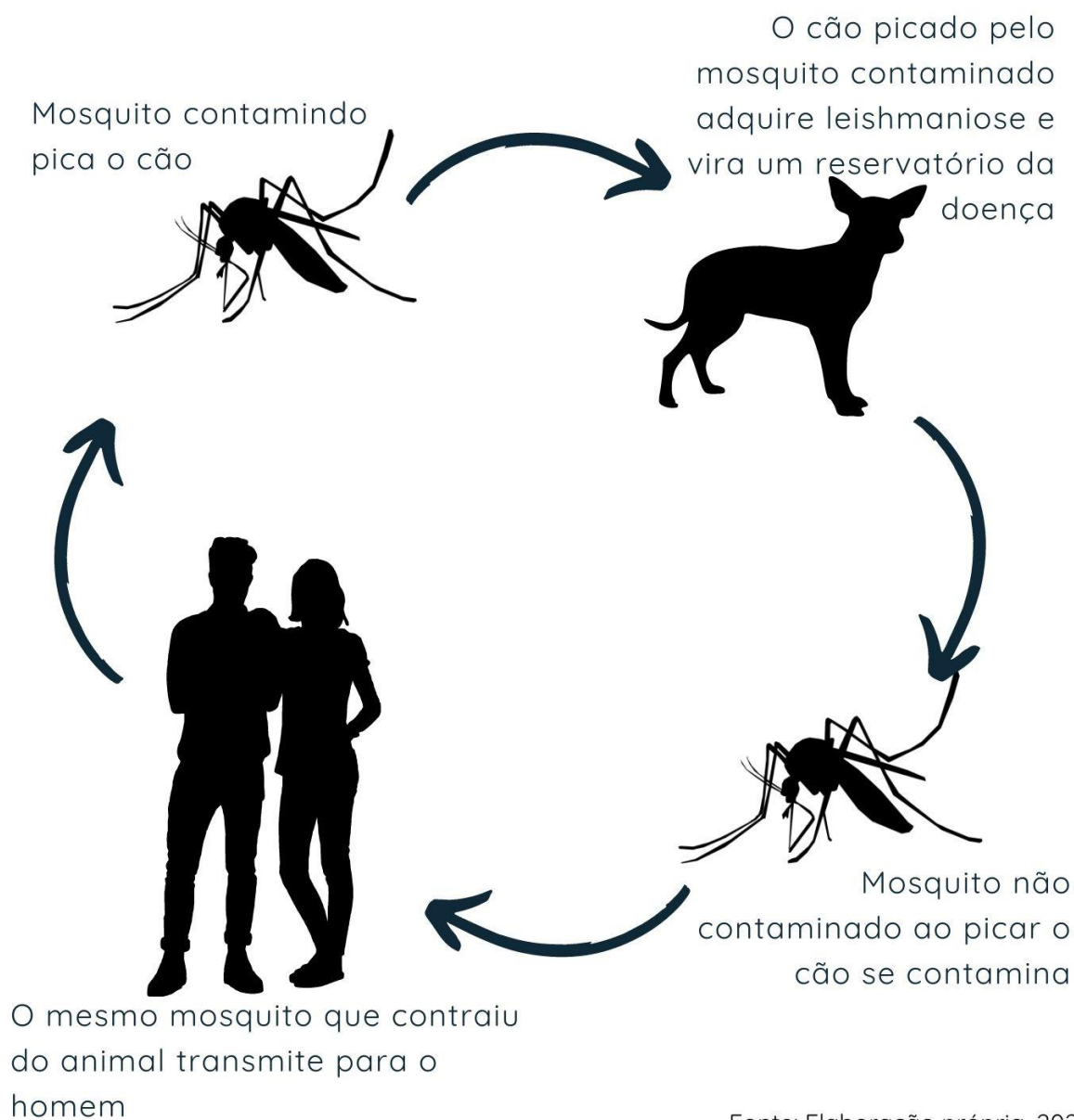
Os sintomas em humanos se assemelham aos sintomas nos cães. Os principais sintomas em humanos são:

- Febre intermitente, por semanas;
- Fraqueza;
- Perda de apetite
- Emagrecimento;
- Anemia;
- Palidez;
- Aumento do baço e do fígado;
- Problemas respiratórios,
- Diarreia.

Período de incubação no homem é de 10 dias a 24 meses, com média entre 2 e 6 meses.



Como é feita a transmissão?



Fonte: Elaboração própria, 2021





Como prevenir a doença?

As principais ações para prevenir a Leishmaniose são as de controle do mosquito.

Dentre elas, algumas formas de evitar a picada do mosquito ao animal são:

- Uso de coleira anti leishmaniose para repelir o inseto com deltametrina 4% (de acordo com o fabricante pode ser substituído). No caso de cães alérgicos à coleira, uso de inseticidas de aplicação tópica à base de permetrina;
- Limpeza e retirada de matéria orgânica do ambiente para evitar os insetos;
- Usar inseticidas nos ambientes que o animal mais permanece, à base de deltametrina e cipermetrina;
- Usar plantas, como a citronela, para repelir os insetos;
- Evitar passeios ao final da tarde e noite, pois são horários de maior atividade dos flebotomíneos;
- Procurar manter os cães em ambiente telado.





Como é feito o diagnóstico?

O diagnóstico é realizado por meio da história clínica e de testes.

Testes para diagnóstico de leishmaniose:

- Testes sorológicos;
- Teste parasitológico, considerado o padrão-ouro - visualização do parasita por meio de microscopia óptica ou de uma cultura de nódulo linfático, baço ou aspirados de medula óssea e;
- Testes moleculares (PCR).





Tratamento x Cura

A LVC não tem cura, mas tem tratamento.

Por meio de medicamentos é possível reduzir a carga parasitária, eliminar os sinais clínicos e potencializar o desenvolvimento de uma forte resposta celular, capaz de controlar a infecção.

Mesmo realizando o tratamento, todos os animais devem utilizar inseticidas tópicos com propriedade repelente a fim de minimizar o risco de transmissão!





Mitos e Verdades

"O cão transmite a leishmaniose?" **Mito!**

O agente vetor, ou seja, quem transmite a leishmaniose é o mosquito-palha.

"A vacina impede a infecção?" **Mito!**

Vacina não impede infecção, ela tem ação contra o protozoário Leishmania, caso o cão seja picado por um mosquito palha infectado.

"Eutanasia em cães é a solução?" **A eutanásia é preconizada pelo Ministério da Saúde, mas é uma solução questionável.**

Pode ser feito o tratamento e os métodos de prevenção, de forma a reduzir a carga parasitária do animal e evitar a disseminação da doença.

"Existe cura nos cães?" **Mito!**

Até o momento, não existe comprovação de cura para essa doença. As medicações disponíveis apenas diminuem o número de parasitas circulantes no organismo do animal.





Mitos e Verdades

"Só quem vive em regiões endêmicas deve se preocupar com a doença?" **Mito!**

A transmissão da leishmaniose visceral canina já foi confirmada em 25 das 27 estados do Brasil. Não morar em uma região endêmica não significa estar fora de risco, afinal, viagens para áreas endêmicas, a chegada de pessoas provenientes de áreas endêmicas, entre outras situações podem promover migração dos parasitos para as mais diversas regiões. Por isso, a prevenção é sempre indicada.

"A proteção do animal vacinado é baixa?" **Mito!**

A proteção do cão vacinado é em torno de 92 a 96%.

"A vacina causa reação?" **Mito!**

A reação à vacina é individual e varia de cão para cão.

"É necessário fazer um teste sorológico antes de vacinar?" **Verdade!**

Somente animais negativos devem ser vacinados.





Mitos e Verdades

"A vacina pode ser tomada apenas uma vez?"

Mito!

Após as primeiras doses, deve ser feita a revacinação anual do cão.

"A vacina torna a sorologia do cão positiva?" **Mito!**

A vacina tem como função promover a geração de resposta imunológica e consequente proteção ao animal, e não infecta nem torna a sorologia do animal positiva após a vacinação, uma vez que apenas induz a produção de anticorpos anti-A2 (não detectado nas sorologias convencionais disponíveis para o diagnóstico da enfermidade).

Organização e revisão: Lídia Roedel Hinkelmann Berbert

Autores: Alícia Caroline Cardoso Ferreira

Deise Dutra Soares

Júlia de Souza Brasil da Silva

Raíssa Lisboa Ramos

Projeto gráfico: Júlia de Souza Brasil da Silva





Referências

BRASIL. *Guia de Vigilância em Saúde*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. - 1. ed. atual. - Brasília : Ministério da Saúde, 2016.

BERBERT, Lídia Roedel Hinkelmann. **Estudo da Infecção por Leishmania em cães na Macrorregião de Teófilo Otoni - MG**. 2021. Qualificação (Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, 2021.



