

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

FATORES QUE INTERFEREM NA SENSIBILIDADE DO
TESTE PARASITOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Marcus Vinícius Caetano de Sousa
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Dezembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

FATORES QUE INTERFEREM NA SENSIBILIDADE DO
TESTE PARASITOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Marcus Vinícius Caetano de Sousa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Dezembro de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S725f Sousa, Marcus Vinícius Caetano de, 1984-
2013 Fatores que interferem na sensibilidade do teste parasitológico
no diagnóstico de leishmaniose visceral canina / Marcus Vinícius
Caetano de Sousa. -- 2013.
46 f. : il.

Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Leishmaniose visceral.- Teses. 3. Ve-
terinária - Diagnóstico - Teses. I. Medeiros, Alessandra Aparecida.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Gradua-
ção em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marcus Vinícius Caetano de Sousa – Nascido em 23 de setembro de 1984, natural de Uberaba – MG, filho de José Waldir de Sousa e Elisete Caetano de Sousa. Ingressou na Universidade de Uberaba em Julho de 2004, onde fez o curso de Medicina Veterinária o qual conclui em Julho de 2009. Em 2010 iniciou o Mestrado na Área de Saúde Animal, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia.

“Que eu não perca a vontade de doar este enorme amor que existe em meu coração, mesmo sabendo que muitas vezes ele será submetido a provas e até mesmo ser rejeitado”.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo gostaria de agradecer a Deus pela dádiva da vida, pois sem ela não estaria tendo a oportunidade desta nova jornada de evolução e aprendizado.

Aos Meus pais Jose Waldir e Elisete primeiramente por serem maravilhosos pais e ainda pela preocupação, por não deixarem de me apoiar, incentivar e fazer de tudo para permitir a mim e meus irmãos que cheguemos o mais longe possível em nível de educação e caráter.

Aos meus irmãos Ana Paula e Jose Waldir Filho por me apoiarem incondicionalmente, e ainda pelos meus cunhados Guilherme e Bruna por estarem sempre presentes.

À professora Dra. Alessandra pela orientação e permitir que esta fase final da minha vida na área acadêmica fosse cumprida.

Ao meu melhor amigo Endrigo Gabellini Alves por me ajudar na realização deste trabalho e ainda por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis desta caminhada ainda que fosse seu momento de descanso ou aperto do seu Doutorado.

Ao Centro de Controle de Zoonoses, na pessoa do Dr. Adalberto De Albuquerque Pajuaba Neto, e principalmente à Dra. Márcia Beatriz Cardoso de Paula, Dra. Ana Cláudia Borges e aos funcionários do canil, por auxiliarem durante a coleta de dados e disponibilidade em auxiliar no experimento;

A todos aqueles que deixaram saudades, ensinamentos e amizade do Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Belo Horizonte, em especial Dr. Anilton César Vasconcelos, Dra. Luciana Moro e minha amiga Irma Ximena.

Ao Laboratório de Patologia Clínica, em especial ao Prof. Antônio Vicente Mundim e ao Felipe César Gonçalves e ao Pablo Noleto, pela contribuição direta na execução do trabalho ;

Aos professores Matias Pablo Szabó, Rodrigo Queiroz, Joely F.F Bittar e em especial a professora Georgia Modé Magalhães pelos ensinamentos e paciência em ensinar e ajudar sempre.

Ao meu amigo Igor de Paula Castro por sempre me ajudar nas coletas e por ser um grande companheiro assim como minha amiga Nicolle Pereira por estar sempre disposta a ajudar.

As amigas de mestrado Juliana Magnino e Tatiane Carvalho por participar desta caminhada e sempre ter uma palavra de incentivo.

A todos aqueles que participaram indiretamente desta dissertação, como a aluna Paula Batista, meus amigos do pensionato, nesta fase em Uberlândia, em especial ao Alberto (Nurse) Rodrigo Lucena, Marcela, Mariana, Paulo, Dêlcio, Fabíola.

Aos amigos de Uberaba Juliano Ronda, Farley Gomide, Lúcio Flávio, Marco Aurélio, Vanessa, Elaine e Amália pelo apoio dado neste último ano.

Aos colegas e amigos da empresa Dog Minas que permitiram que pudesse encontrar um novo caminho e pela compreensão desta fase final da dissertação, em especial Patrícia Ladir.

Gostaria de agradecer em especial minha doce namorada Fernanda Oliveira Rodrigues por estar ao meu lado nesta fase final sempre preocupada e me incentivado a seguir em frente.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
PALAVRAS-CHAVE.....	ii
ABSTRACT.....	iii
KEYWORDS.....	iii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Agente etiológico.....	3
Vetor.....	3
Ciclo Biológico.....	4
Epidemiologia.....	6
Aspectos Clínicos.....	6
Diagnóstico.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
Local de estudos.....	10
Amostras.....	10
Diagnóstico Sorológico.....	11
Diagnóstico Clínico.....	11
Diagnóstico Anatomopatológico.....	11
Diagnóstico Citopatológico.....	12
Análise Estatística.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

FATORES QUE INTERFEREM NA SENSIBILIDADE DO TESTE PARASITOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO - O presente estudo objetivou verificar a sensibilidade do teste parasitológico quando se utilizou aspirados ou *imprints* de baço, linfonodos e medula óssea, em função do tempo, além de correlacionar o resultado, a carga parasitária dos cães com a sintomatologia clínica. Foram utilizados 31 cães sororreagentes e eutanasiados provenientes do CCZ de Uberlândia. No Laboratório de Patologia da UFU, foram confeccionadas as lâminas e avaliadas em microscópio óptico, objetiva 100X. As lâminas eram avaliadas por no máximo uma hora e quando positiva registrou-se o tempo dispensado para o diagnóstico em um, cinco, 20, 30 e 60 minutos. Na determinação da carga parasitária as formas amastigotas eram visualizadas e agrupadas em uma, 10, 50, 100, 500, 1000 e até 1500 visualizações em 100 campos. Dos 31 animais analisados 11 (35,48%) eram sintomáticos, 17 (54,83%) oligossintomáticos e três (9,67%) assintomáticos. Na análise por PAAF houve diferença de leitura de 20 minutos com um minuto ($p=0,001$), assim como a sensibilidade do teste foi maior com o tempo de 60 minutos do que com 20 minutos ($p=0,04$). Na análise de *imprint* a sensibilidade do teste foi maior com o tempo de 20 minutos do que com cinco ($p=0,03$). Não houve diferença estatística entre as duas técnicas aplicadas na coleta de amostras para cada tecido (medula óssea $p=1,0$; linfonodo $p=0,76$; baço $p=0,57$). Não houve diferença na sensibilidade dos diagnósticos realizados por PAAF entre os tecidos, assim como por *imprint*. A carga parasitária de ambas as técnicas demonstraram que os animais assintomáticos possuem menor carga parasitária do que em relação aos sintomáticos.

Palavras Chave: cão, parasitológico, sensibilidade, *Leishmania*

INFLUENCE FACTORIES THE SENSITIVITY PARASITOLOGICAL DIAGNOSIS OF CANINE LEISHMANIASIS VISCERAL

ABSTRACT - This study aimed to investigate the sensitivity of parasitological testing when using aspirates or imprints of spleen, lymph nodes and bone marrow in function of time and correlate the parasite load of dogs with clinical symptoms. We used 31 seropositive dogs that were euthanized from the CCZ of Uberlândia. In the UFU's Laboratory of Pathology, the blades were fabricated and evaluated under a light microscope, 100X objective. The slides were evaluated for at most one hour and, if it was positive, the time spent for diagnosis in one, five, 20, 30 and 60 minutes were recorded. In the determination of the parasite load, the amastigotes were displayed and grouped in one, 10, 50, 100, and 500, 1000 and even 1500 views in 100 fields. Among the 31 animals analyzed, 11 (35.48%) were symptomatic, 17 (54.83%) oligosymptomatic and three (9.67%) asymptomatic. In the analysis by PAAF, difference was read of 20 minutes with one minute ($p = 0.001$), and the test sensitivity with time was greater at 60 minutes than at 20 minutes ($p = 0.04$). In the analysis of imprint, the test sensitivity was higher with time at 20 minutes than at five ($p = 0.03$). There was no statistical difference between the two techniques used in collecting samples for each tissue (bone marrow $p = 1.0$, $p = 0.76$ lymph nodes, spleen $p = 0.57$). There was no difference between tissues in the sensitivity of diagnoses made by PAAF, as well as imprint. The worm burden of both techniques demonstrated that asymptomatic animals have lower parasite load than in relation to symptomatic.

Key Words: dog, parasitologic, sensibility, *Leishmania*

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma importante endemia causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*. É transmitida ao homem por picada do mosquito *Lutzomyia longipalpis*, e tem como principais reservatórios canídeos silvestres e domésticos (MOREIRA et al., 2002; SILVA, et al., 2009).

Foi considerada uma das seis endemias prioritárias no mundo (OMS, 2010) e, no Brasil, já foi identificada em 21 das 27 unidades da federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone. Nos últimos sete anos, foram registrados em média 3.357 casos e 236 óbitos (BRASIL, 2010). De 1995 a 2005, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2006).

Na leishmaniose visceral canina (LVC), quando as leishmanias são inoculadas na pele do hospedeiro pelos flebótomos, invadem os macrófagos e neles se multiplicam (SILVA, 2007), desencadeando alguns sinais clínicos, dentre eles estão hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, lesões cutâneas, ceratoconjuntivite, alopecia, apatia, onicogribose, anorexia e grave perda de peso (REIS et al., 2006). A forma sub-clínica da doença pode ocorrer por longos períodos e é uma característica importante da Leishmaniose. Os animais assintomáticos representam grande problema para a saúde pública, pois dificultam a detecção da doença e a adoção de medidas adequadas de controle (MACHADO, HOFFMANN, LANGONI, 2007).

Os exames hematológicos são considerados de valor limitado no diagnóstico de LVC por mostrar resultados inespecíficos, no entanto são importantes para avaliar clinicamente o animal, sendo a anemia arregenerativa normocítica normocrômica o achado hematológico mais frequente (REIS et al., 2006).

A variabilidade das manifestações clínicas da doença direciona o diagnóstico para os métodos laboratoriais (NETA et al., 2006). Nenhum teste diagnóstico para LVC tem 100% de sensibilidade e especificidade (SILVA, 2007). As técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são

imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2003).

Dentre os métodos utilizados no diagnóstico etiológico da LVC, o teste parasitológico por meio da identificação microscópica dos parasitos em esfregaços obtidos por punção de linfonodo, baço e medula óssea constitui-se num método eletivo (padrão-ouro ou *gold standard*), podendo-se ainda utilizar o cultivo deste material em diferentes meios de cultura (Novy-MacNeal-Nicolle e Shneider são os mais utilizados) para isolamento dos parasitos (HERWALDT, 1999).

Embora o teste parasitológico seja considerado 100% específico, sua sensibilidade pode variar de menos de 30% a 100% em esfregaços obtidos por punção de linfonodos, e de 6,2% a 100% em esfregaços obtidos de medula óssea (REALE et al., 1999; SARIDOMICHELAKIS et al. 2005), sendo que em animais assintomáticos a sensibilidade deste teste é menor (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

Diante da divergência de resultados entre os testes empregados, e pela importância de tal doença para a saúde pública, buscas por novos testes mais específicos são constantes, na tentativa de possibilitar uma maior segurança na implementação das ações de controle (NETA et al., 2006). É relevante a tentativa de diminuir o número de resultados falsos positivos e negativos para a eficiência do programa de prevenção à leishmaniose, já que a sorologia é apenas um método indireto de medir a infecção, não definindo o grau de parasitismo e o potencial de transmissão que o cão possa ter para o vetor (LAURENTI, 2009).

No sentido de se aprimorar o diagnóstico parasitológico da LVC, objetivou-se verificar a sensibilidade do teste quando se utilizou aspirados ou *imprints* de baço, linfonodos ou medula óssea, em função do tempo de observação dos esfregaços, utilizando como teste padrão RIFI e ELISA, em cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Objetivou-se ainda: determinar o melhor tecido para a realização do teste, correlacionar o resultado e a carga parasitária dos cães positivos no exame parasitológico com a sintomatologia clínica dos cães.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Agente etiológico

O agente envolvido na Leishmaniose Visceral é o protozoário do gênero *Leishmania*, pertencente ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. É um parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear e apresenta duas formas morfológicas distintas: a promastigota que é a forma flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto (vetor) e a amastigota que é a forma sem flagelo e que se encontra no hospedeiro vertebrado (FUMAGALLI, 2008).

Segundo Michalick e Genaro (2005), as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, são alguns dos agentes etiológicos causadores da Leishmaniose Visceral (LV) na Ásia, África e Europa, enquanto que a *Leishmania chagasi* é a responsável pela doença nas Américas. A infecção em humanos ocorre pela *Leishmania donovani*, enquanto que a *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* são responsáveis por infectar tanto o homem quanto os cães.

Vetor

Insetos denominados flebotomíneos que pertencem a Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Phlebotomus* nos países do Velho Mundo e *Lutzomia* nas Américas onde são conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, dentre outros (GRIMALDI, TESH, 1993). No Brasil as regiões Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste são principalmente acometidos pela espécie *Lutzomia longipalpis*. São considerados de pequeno porte já que medem de 2 a 3 mm e tem como característica o corpo com intensa pilosidade, hábitos de voo crepusculares e alojam-se em locais úmidos e escuros como espaços ente folhas caídas, tronco de árvores e toca de animais. Possuem os olhos arredondados, proeminentes e separados, além de antenas longas formadas por 16 segmentos, durante o pouso suas asas ficam em posição vertical. (BRAZIL, BRAZIL, 2003).

A adaptação destes vetores aos ambientes urbanos em periferias de grandes centros, principalmente na região Sudeste, foi verificada ao final dos anos 80, sendo que estes vetores podem ser encontrados em galinheiros, chiqueiros, canis, paiol e inclusive no ambiente intradomiciliar (SILVA, 2012).

Os flebotomíneos necessitam de suprimentos de carboidratos que adquirem na natureza diretamente da seiva de plantas, do néctar, de secreções de afídeos e de frutas maduras. Para as fêmeas, esses nutrientes são complementados pela alimentação sanguínea, o que possibilita a maturação dos ovários (DIAS, LOROSA, REBÊLO, 2003). Sendo assim apenas as fêmeas são capazes de transmitir o parasita aos hospedeiros vertebrados (GRIMALDI, TESH, 1993).

No ambiente terrestre é onde ocorre seu ciclo biológico que compreende as fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Sobre um substrato úmido e com alto teor de matéria orgânica, as fêmeas colocam seus ovos para garantir a alimentação das larvas. Geralmente entre sete e 10 dias os ovos eclodem e as larvas se alimentam vorazmente e desenvolve-se de acordo com as condições do meio ambiente entre 20 e 30 dias, podendo as larvas de quarto estágio realizar a parada do seu desenvolvimento, caso ocorra condições adversas, sendo esta parada denominada diapausa. Após a fase larval, transformam-se em pupas que são mais resistentes às variações de umidade e tem duração média de uma a duas semanas. As pupas não se alimentam e têm respiração aérea, além de permanecerem imóveis e fixas ao substrato. O ciclo de desenvolvimento dura em torno de 30 a 40 dias de acordo com a temperatura (BRASIL, 2006).

Ciclo Biológico

Os reservatórios da doença existem tanto em ambientes silvestres como urbanos, porém o cão é considerado a principal fonte de infecção na área urbana e sua enzootia tem precedido a ocorrência de casos humanos (BRASIL, 2006).

Algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres já foram registrados como hospedeiros, porém, devido à periurbanização da doença os cães domésticos tornaram-se os mais importantes reservatórios do parasita (FUMAGALLI, 2008).

A correlação da infecção no cão e no homem varia de região para região e depende de alguns fatores, como: a nutrição humana, a capacidade imunitária, a quantidade de canídeos na população e o comportamento dos insetos vetores.

As leishmanias possuem ciclo biológico heteroxênico, necessitando de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (Figura 1) (SOUZA, BORASCHI, NUNES, 2007). Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp que por divisão binária vão se reproduzir e diferenciar rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também vão se reproduzir por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas colonizando o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes chamadas de promastigotas metacíclicas. No parasita o ciclo se completa em torno de 72 horas. Ao realizar um novo repasto sanguíneo as formas promastigotas metacíclicas serão liberadas juntamente com a saliva do inseto. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BRASIL, 2006).

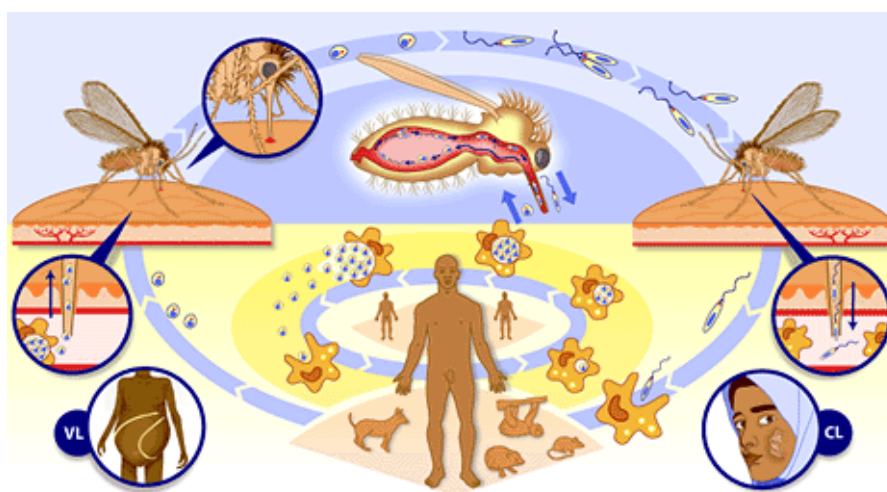


Figura 1. Ciclo da *Leishmania*.

Fonte: OMS, 2010.

Epidemiologia

Difunde-se por 22 países no Novo Mundo e em 66 nações do Velho Mundo sendo encontrado principalmente no Sudeste da Ásia, Leste da África e no Brasil (BRASIL, 2006). Em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LV humana somaram 48.455 casos, sendo que 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. De 1995 a 2005, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2006). Está entre as seis endemias prioritárias no mundo (OMS, 2010).

Ocorre em Minas Gerais desde a década de 1940 quando foram detectados os primeiros casos humanos no norte do Estado, onde tipicamente ocorria em áreas rurais. Atualmente 84% dos casos confirmados são de pacientes residentes em zonas urbanas, e em 60% a residência concentra-se na região metropolitana de Belo Horizonte (RESENDE, MOREIRA, PINTO, 2009).

De 2000 a 2006, foram confirmados à Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais (SESMTG) 2.727 casos humanos de LVA, com 246 óbitos, registrados no Sistema de Informação de Agravos Notificáveis (SINAN-MG, 2010).

A doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de cinco anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%) (BRASIL, 2006).

O aumento do número de casos humanos na área urbana é alarmante e isto ocorre pelas mudanças ambientais, como: desmatamento, construção de barragens, migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas, entre outros fatores que fazem com que ela esteja entre as seis doenças mais importantes do mundo, ocorrendo em 21 dos 26 estados brasileiros (OMS, 2012; BRASIL, 2006)

Aspectos Clínicos

Em cães a infecção é clinicamente semelhante a humanos, embora no cão além do acometimento de vísceras, frequentemente são observadas lesões de pele nos animais sintomáticos (KRAUSPENHAR et al. 2007). Dependendo de

propriedades tanto do parasita como do hospedeiro, a leishmaniose canina irá se desenvolver de uma forma aguda ou crônica (BRASIL, 2006).

De acordo com Mancianti et al. (1988) os cães são classificados em animais assintomáticos (sem sinais clínicos), oligossintomáticos (um a três sinais clínicos) e de sintomáticos (mais de três sinais clínicos).

Os principais sinais clínicos são representados pela caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia. Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal (KRAUSPENHAR et al. 2007), além de pelame seco, prurido, alopecia e áreas de hiperqueratose, além de se observar emagrecimento, onicogribose, alterações oculares e mucosas pálidas (ASSIS et al. 2010).

Lesões renais como glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial com comprometimento renal (LOPEZ et al. 1996; LUVIZOTO, 2006), lesões oculares como queratoconjuntivite, blefaroconjuntivite, panoftalmite, poliartrite, assim como de necrose isquêmica cutânea na região auricular são acometidos por imunocomplexos (LUVIZOTO, 2006) que se depositam em diversos tecidos gerando lesões inflamatórias (SILVA, 2007).

Segundo Troncarelli (2009) existem ainda os cães que podem apresentar a doença na forma latente com ausência de sinais clínicos e estes podem ainda manter o parasita no organismo e constituem possíveis fontes de infecção, os mesmos são considerados assintomáticos e geralmente representam entre 40 a 60% de uma população soropositiva (ALVES E BEVILACQUA, 2004).

Diagnóstico

As técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para o inquérito canino são a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2003).

A IFI apresenta sensibilidade de 68% e 100% e especificidade variando de 74% a 100% (ALVES, BEVILACQUA, 2004). Segundo Sundar e Rai (2002) a RIFI apresenta baixa sensibilidade e exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar. Entretanto, Alves e Bevilacqua (2004) citam uma série de vantagens da RIFI, como fácil execução, rapidez, baixo custo e sensibilidade e especificidade adequadas, justificando o fato de ainda ser o teste de eleição para inquéritos epidemiológicos.

O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo mais sensível e menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos (EL-AMIN et al. 1986 apud GONTIJO, MELO, 2004).

A técnica de PCR é comprovadamente mais sensível e poderia ser a técnica de eleição, porém é onerosa e não faz parte da rotina de muitos laboratórios e não está padronizada pelo Ministério da Saúde (QUEIROZ et al. 2010). Assis, et al. (2010) ainda cita que é preciso ter cautela na análise de PCR para levantamento epidemiológico, já que ele identifica apenas o DNA do parasita no sangue ou tecido, e não necessariamente a doença no animal, enquanto o método parasitológico detecta o parasita intacto no tecido. A PCR apresenta ainda 94% de sensibilidade e constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico de leishmaniose, porém depende de algumas variáveis como: área endêmica, tipo de amostra, o alvo do DNA utilizado para amplificação, além do método de extração de DNA (BRASIL, 2006). A técnica de PCR, deveria sofrer alguns ajustes para ser utilizada em larga escala, como se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo (MELO, 2004).

O teste diagnóstico mais confiável é a observação direta do parasita em esfregaço de medula óssea ou linfonodos (NOGUEIRA et al. 2009), corados por Giemsa, Leishman ou Panótico®, sendo uma forma segura, simples, rápida e pouco traumática para o diagnóstico da enfermidade (LAURENTI, 2009). A especificidade

desse método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado do seu processamento e coloração, além do observador e da quantidade de amostras e do número de campos analisados ao microscópio (SARIDOMICHELAKIS et al. 2005). A sensibilidade pode ser de 50% a 83% em amostras de medula óssea e entre 30% e 85% em amostras de linfonodo, quando ambos os tecidos estão combinados a sensibilidade sobe para 71% a 91% (FERRER, 1999). A demonstração de um único parasita ao microscópio em esfregaço é suficiente para diagnóstico da doença (MELO, 2004).

A cultura também é um método diagnóstico para LVC, sendo que o crescimento das formas promastigotas leva de 4 a 6 dias e a leitura é feita semanalmente até a o diagnóstico ser concluído após há terceira semana. Estes meios de cultura são ricos em nutrientes (hemina, soro fetal bovino) e a falta de manuseio estéril durante o processo, assim como na coleta de material pode levar ao crescimento de bactérias e fungos e diminuir o crescimento da leishmania e, portanto, pode diminuir a sensibilidade do teste (LAURENTI, 2009). Barrouin – Melo et al. (2004) ainda cita que o exame direto ou a cultura do parasita em baço e medula óssea são técnicas utilizadas como esteio para o diagnóstico de leishmaniose, tanto em seres humanos como em cães.

Os animais assintomáticos apresentam um desafio para o diagnóstico parasitológico já que apresentam uma baixa carga parasitária o que torna o diagnóstico difícil. No entanto quando possuem alta carga parasitária não há problemas para um diagnóstico rápido e seguro (LAURENTI, 2009), foi o que Assis e colaboradores (2010) encontraram ao citarem que cães polissintomáticos obtiveram uma sensibilidade maior ao realizar o diagnóstico, já que apresentaram um grau parasitário bastante intenso.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Local de Estudo

O estudo foi realizado no município de Uberlândia, localizado na porção sudoeste do Estado de Minas Gerais, região do Triângulo Mineiro, entre as coordenadas geográficas de 18°56'38" de latitude sul e 48°18'39" de longitude oeste de Greenwich, a uma altitude média de 863m. Ocupa uma área de 4.115,09 km², sendo que 219,00 km² são ocupados pela zona urbana e 3.896,09 km² pela zona rural. O clima é tropical chuvoso, com inverno seco, sendo a precipitação média anual de 1500-1600 mm, com forte concentração de chuvas nos meses de dezembro a fevereiro. A temperatura média mensal varia de 20,9°C a 23,1°C e o período mais quente do ano se estende de outubro a março. A vegetação é típica do cerrado e a hidrografia bastante rica (PREFEITURA MUNICIPAL DE UBERLÂNDIA, 2011).

Em Janeiro de 2008, ocorreu o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana no município de Uberlândia e foi notificado ao CCZ por meio da Vigilância epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde. No bairro onde ocorreu a doença reside um grande numero de pessoas provenientes de cidades que são endêmicas para *leishmania* e, portanto é possível que cães tenham vindo para o município acompanhado seus donos e consequentemente infectando flebotomíneos. (PAULA, et al. 2008).

Amostras

O estudo foi realizado com a colaboração do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), do Município de Uberlândia, obtendo a aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 007/10. Foram utilizados 31 cães identificados como sororreagentes nos inquéritos sorológicos realizados pelo CCZ, no período de março de 2010 a janeiro de 2011.

Diagnóstico sorológico

Os cães apreendidos ou doados ao CCZ foram mantidos isolados no canil do CCZ e receberam ração e água *ad libidum*. Na triagem realizou-se teste de ELISA com amostras de sangue coletadas em papel de filtro. Os animais reagentes na triagem foram então submetidos à confirmação pela IFI, após coleta de sangue dos mesmos por punção venosa em tubos sem anticoagulante, para obtenção de soro sanguíneo a ser utilizado no teste sorológico Imunofluorescência indireta (IFI). A reação de imunofluorescência indireta, para a pesquisa de IgG, foi realizada segundo instruções do *kit* de IFI para diagnóstico da leishmaniose canina (Biomanguinhos® -Rio de Janeiro/FIOCRUZ/MS). O CCZ consideraram como positivas amostras que apresentaram fluorescência em diluições iguais ou superiores a 1/40.

Diagnóstico Clínico

No CCZ os animais foram submetidos ao exame clínico padrão seguindo a ficha clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HV-UFU). De acordo com Mancianti et al. (1988) os cães foram classificados em três grupos, sendo grupo 1 composto por animais assintomáticos (sem sinais clínicos), grupo 2 de oligossintomáticos (um a três sinais clínicos) e grupo 3 de sintomáticos (mais de 3 sinais clínicos). Os principais sinais clínicos observados para a divisão dos grupos foram: onicogribose, áreas de alopecia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e uveíte, segundo Moreira et al. (2002).

Após exame clínico, os animais foram eutanasiados conforme disposto na Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária- CFMV n.º 714/2002.

Diagnóstico Anatomopatológico

Após a eutanásia os cães foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal do HV onde se procedeu à necropsia dos mesmos, seguindo-se a técnica de necropsia e a sequência de inspeção de órgãos da Ficha de Necropsia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia.

Durante a necropsia foram colhidas amostras em duplicata de baço, linfonodo e medula óssea pelas técnicas de *imprint* e pela punção aspirativa com agulha fina (PAAF). As amostras de medula óssea foram obtidas por meio de secção de fêmur direito dos cães; os linfonodos utilizados foram os poplíteos, sendo o direito utilizado para PAAF e o esquerdo para *imprints* através da secção do mesmo longitudinalmente e o baço foi puncionado na sua extremidade cranial e seccionado na extremidade caudal para confecção dos *imprints*.

Diagnóstico Citopatológico

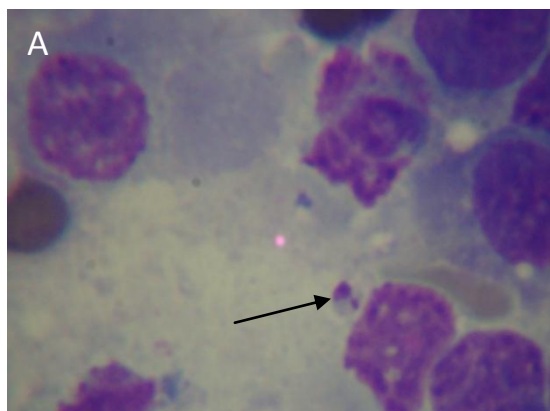
O diagnóstico citopatológico foi realizado através da pesquisa de formas amastigotas do parasito em citopatologia de baço, linfonodos, e medula óssea. Foram confeccionadas lâminas com *imprints* e esfregaços com material obtido através de PAAF. As lâminas foram coradas com Corante Panótico Rápido (Renylab®) e observadas em microscópio óptico com objetiva de 100 x, em ensaio cego (o observador não tinha conhecimento do grupo ao qual o animal avaliado pertencia).

A técnica de *imprint* consiste em tocar a superfície de corte do tecido extirpado à superfície de uma lâmina de vidro após a retirada do excesso de sangue com o auxílio de um papel toalha, e a PAAF, consiste em introduzir uma agulha 13 x 3.8 no órgão a ser aspirado, realizando movimento em leque para uma maior amostragem, retirar a agulha e acoplar a uma seringa de 10 ml com o êmbolo puxado e então deposita-se a amostra em lâmina de vidro, após o procedimento utiliza-se uma lâmina extensora em um ângulo de 45° graus para a realização do esfregaço.

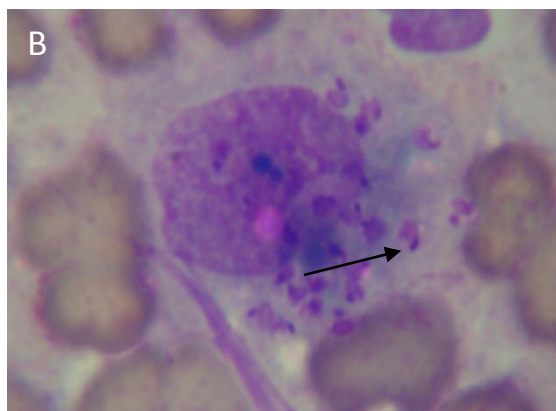
No sentido de se avaliar a influência do tempo sobre o diagnóstico parasitológico, a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp foi realizada até o tempo de uma hora, em microscopia óptica, utilizando-se óleo de imersão, objetiva de 100 vezes. Os esfregaços eram examinados por uma hora antes de serem considerados negativos. Quando a forma amastigota era visualizada o observador anotava o tempo de observação gasto para a identificação da forma amastigota.

Os critérios utilizados para se considerar uma amostra positiva foram: visualização das três estruturas básicas do parasita (núcleo, citoplasma e cinetoplasto), presença de estruturas íntegras, independência da carga parasitária (TRONCARELLI, et al. 2009) e presença de formas livres ou dentro de macrófagos (MOREIRA, et al. 2002) (Figura 2). Na análise do tempo empregado para o diagnóstico das formas amastigotas, foram estabelecidos os tempos de um minuto, cinco minutos, 20 minutos, 30 minutos e 60 minutos e os resultados positivos agrupados em cada um destes tempos de acordo com o tempo gasto para o diagnóstico de cada lâmina.

Nos animais positivos no exame parasitológico realizou-se a observação de 100 campos com o intuito de obter a carga parasitária. Na determinação da carga parasitária as amostras foram agrupadas de acordo com o número de formas amastigotas visualizadas em: uma, 10, 50, 100, 500, 1000 e até 1500 visualizações em 100 campos.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2012



Fonte: Arquivo Pessoal, 2012

Figura 2. Amastigota livre (A) e dentro de macrófago (B) apresentando as três estruturas básicas e também dentro de macrófago. Uberlândia, 2012.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por tabela de contingência comparando-se os grupos dois a dois pelo teste de Fisher um grau de confiabilidade de 95%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 31 animais analisados 11 (35,48%) eram sintomáticos, 17 (54,83%) oligossintomáticos e três (9,67%) assintomáticos.

Tasca et al. (2009) avaliando 34 cães sorologicamente positivos para leishmaniose, verificaram que 8 (23,53%) eram assintomáticos, 17 (50%) oligossintomáticos e 9 (26,47%) sintomáticos, proporção semelhante a observada no presente estudo. Já Dias et al. (2008), em estudo sobre soroprevalência, parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp, relataram que 15 (53,57%) eram assintomáticos e 13 (46,43%) sintomáticos. Entretanto este autor não classificou os animais em oligossintomáticos, somente em sintomáticos ou assintomáticos, portanto quando o animal apresentava pelo menos um sinal clínico era classificado como sintomático.

Moreira et al. (2007) encontraram 46,1% de animais diagnosticados como sintomáticos, 28,1% como oligossintomáticos e, assim como no presente estudo, obtiveram um índice menor de cães assintomáticos (25,8%).

Segundo as raças, 24 (77,41%) eram cães sem raça definida, três (9,67%) Pit Bull, um (3,22%) Rotweiller, um (3,22%) Pastor Alemão, um (3,22%), Doberman e um Boxer (3,22%).

Em relação ao sexo, 19 (61,29%) animais eram fêmeas e 12 (38,70%) machos. A idade dos mesmos variou de um a sete anos. ALMEIDA, MENDONÇA e SOUSA (2010) também encontraram um número maior de animais sem raça definida (31,57%) sendo acometidos de leishmaniose; porém a raça mais frequente foi a raça Boxer (17,54%), diferente do presente estudo na qual a raça mais frequente foi aos cães sem raça definida. Os autores anteriormente citados também observaram um número maior de fêmeas, sendo 35 (45,2%) dos animais com leishmaniose. Todas as raças de cães são susceptíveis, porém os cães de raças grandes são mais susceptíveis por freqüentarem mais o ambiente peridomiciliar e, conseqüentemente, são passíveis de terem mais contato com o vetor (FEITOSA et al. 2000).

Utilizando a técnica de PAAF, três (9,67%) animais sororreagentes foram negativos no teste parasitológico e 28 (90,33%) foram positivos em pelo menos um órgão avaliado. Já utilizando a técnica de *imprint*, cinco (16,12%) animais apresentaram-se negativos e 26 (83,88%) foram positivos (Tabela 1). Entre estes animais, dois foram negativos em ambas as técnicas de colheita. Não houve diferença significativa entre as duas técnicas de colheita de amostras analisadas ($p=0,71$).

Não houve diferença significativa entre o diagnóstico por PAAF e o sorológico ($P=0,23$) pelo teste de Fisher, porém houve diferença significativa entre o diagnóstico por *imprint* e o sorológico ($P=0,05$) pelo teste de Fisher.

Tabela 1. Número de animais positivos e negativos no teste parasitológico, de acordo com a técnica utilizada, Uberlândia, 2012.

Sorológico	PAAF	<i>Imprint</i>
Reagente	28 (90,33%) ^a	26 (83,88%) ^a
Não reagente	3 (9,67%) ^a	5 (16,12%) ^a
Total	31	31

Moreira et al. (2002), em testes parasitológicos utilizando amostras puncionadas de linfonodos poplíteos, verificaram que 50% dos casos foram positivos, 36,7% suspeitos e 13,3% negativos para leishmaniose, de acordo com o exame direto nos esfregaços. Por outro lado, em *imprints* de baço, Tasca et al. (2009) obtiveram 64,7% de animais positivos e 35,3% negativos ao exame parasitológico. Estes autores avaliaram apenas um órgão e não utilizaram tempo mínimo de leitura das lâminas, o que influenciou a menor sensibilidade alcançada por estes autores no teste parasitológico, quando comparados com o presente

estudo em que utilizou-se medula óssea, baço e linfonodos como amostras e o tempo mínimo de leitura de uma hora.

No sentido de se identificar qual deve ser o órgão de eleição para coleta de amostras para exame parasitológico, comparou-se o número de resultados positivos obtidos pela PAAF ou *imprint* de baço, linfonodo e medula óssea (Tabela 2).

Tabela 2. Número de animais positivos no teste parasitológico, de acordo com o órgão e a técnica de obtenção de amostras empregados em cães sororreagentes para leishmaniose, Uberlândia , 2012.

Técnica de obtenção de amostras	Medula óssea	Linfonodo	Baço
PAAF	26 (83,7%) ^{a A}	23 (74, 19%) ^{a A}	21 (67,74%) ^{a A}
Imprint	25 (80,64%) ^{a A}	25 (80,64%) ^{a A}	24 (77,41%) ^{a A}

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as técnicas de coleta de amostras. Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre o tipo de tecido analisado.

No que diz respeito ao melhor tecido para obtenção de amostras, no presente estudo a medula óssea apresentou o maior número de animais positivos sendo 26 (83,87%), seguidos de 23 (74,19%) linfonodos e 21 (67,74%) baço utilizando a técnica de PAAF. Quando foram utilizados *imprints* de medula óssea e linfonodo ambos apresentaram 25 (80,64%) animais positivos e baço 24 (77,41%) animais positivos. No entanto, não houve diferença estatística entre as duas técnicas aplicadas na coleta de amostras para cada tecido (medula óssea $p=1,0$; linfonodo $p=0,76$; baço $p=0,57$).

Do mesmo modo, apesar do número de resultados positivos serem maior quando se utilizava a medula óssea como tecido de amostra não houve diferença

significativa na sensibilidade dos diagnósticos realizados por PAAF nos tecidos medula óssea e linfonodo ($p=0,53$), medula óssea e baço ($p=0,23$), linfonodo e baço ($p=0,78$). No caso de coleta por *imprint* também não houve diferença significativa entre a medula óssea e linfonodo ($p=1,25$), medula óssea e baço ($p=1,00$) e linfonodo e baço ($p=1,00$).

Moreira et al. (2002) analisando amostras de linfonodos obtiveram um total de 50% de amostras positivas no exame parasitológico. ALMEIDA, MENDONÇA e SOUSA (2010), em estudo conduzido em Cuiabá, verificaram em aspirados de medula óssea e linfonodo dos animais sororreagentes, formas amastigotas de *Leishmania* sp. em 32 (21,3%) e 31 (20,7%) cães, respectivamente. No presente trabalho a sensibilidade do teste parasitológico, tanto em linfonodos quanto em medula óssea foi consideravelmente superior aos resultados destes autores.

Saridomichelakis et al. (2005) relata que o linfonodo e o baço possuem alta sensibilidade e especificidade, porém caem para 30% quando se trata de cães assintomáticos mesmo quando os esfregaços são submetidos a leitura de 1000 campos em microscopia óptica. O esfregaço de medula óssea é muito sensível quando analisado cuidadosamente, sendo que atinge nível sensível semelhante ao de aspirados de baço (Silva, Stewart e Costa, 2007).

Troncarelli et al. (2009) analisando 100 *imprints* de baço de cães sororreagentes para leishmaniose, obtiveram 51 (51%) amostras positivas.

Em um estudo, analisando *imprints* de medula óssea de pessoas sororreagentes para leishmaniose visceral Silva, Stewart e Costa (2005) obtiveram 83 (95,4%) amostras positivas. Ainda no mesmo estudo, o baço não foi considerado uma boa opção de órgão para ser realizada a punção, já que um paciente morreu após tal procedimento.

O presente estudo corrobora com Nogueira et al. (2009) que consideram que o diagnóstico mais confiável é a observação direta do parasita em esfregaço de medula óssea ou linfonodos, já que em ambas análises do presente estudo os dois órgãos apresentaram alta positividade. Por outro lado, quando utilizada uma técnica mais sensível como a cultura de aspirados de baço e linfonodo, Barrouin – Melo et

al. (2004) demonstraram que o baço é o local de eleição sendo 97,9% das amostras positivas contra 25% de linfonodos.

Silva et al. (2007), em estudo comparando a sensibilidade quando realizava teste parasitológico com amostras de ambos linfonodos poplíteos e de ambas as cristas ilíacas para obtenção de medula óssea, verificaram que a punção de dois órgãos aumenta a sensibilidade do teste. Porém estes autores consideram ainda que o tempo de leitura dispensado para a avaliação de dois esfregaços de um mesmo animal demanda um tempo incompatível com a rotina clínico-laboratorial e é mais laborioso.

No grupo sintomático não houve nenhuma diferença significativa entre os tecidos quando utilizados, a técnica de PAAF (baço x linfondo $p = 1$; baço x medula $p=1$ e linfondo x medula $p=1,52$) assim como quando utilizado a técnica de *imprint* (baço x linfondo $p=1$; baço x medula $p=1$ e linfondo x medula $p=1$). A análise estatística no grupo sintomático frente ao tecido quando utilizado técnicas de coleta diferentes também demonstrou que não houve diferença significativa (amostra de baço por PAAF x amostra de baço por *imprint* obteve $p= 1$, amostra de linfondo por PAAF x linfondo por *imprint* $p =1$ e amostra de medula por PAAF x amostra por medula por *imprint* $p =1$). Sendo, portanto, que não há influência do tipo de tecido analisado no grupo assim como pela técnica.

Quando realizada a análise estatística no grupo oligossintomático utilizando a técnica de PAAF frente ao tecido não houve nenhuma diferença significativa (baço x linfondo $p = 1$; baço x medula $p= 0,39$; linfondo x medula $p =0,22$) assim como quando utilizado a técnica de *imprint* (baço x linfondo $p = 1,29$; baço x medula $p = 1,29$ e linfondo x medula $p =1,29$). A análise realizada pelas diferentes técnicas no grupo oligossintomático também não obteve diferença significativa (amostra de baço por PAAF x amostra de baço por *imprint* obteve $p= 1,29$; amostra de linfondo por PAAF x linfondo por *imprint* $p =1$ e amostra de medula por PAAF x amostra por medula por *imprint* $p =0,39$) (Tabela 3)

Os resultados das análises estatísticas quando comparados os tecidos entre a sintomatologia clínica (sintomático x oligossintomático), demonstrou que não houve diferença significativa, ou seja, a técnica de PAAF no baço obteve o valor de

p = 0,66, linfonodo p = 0,19 e medula p = 1. Quando utilizada a técnica de *imprint* no baço, obteve p=0,35; no linfonodo p= 0,12 e medula p=0,12.

TABELA 3. Número de animais positivos no exame parasitológico de acordo com a técnica de colheita empregada e o órgão utilizado para coleta, entre os cães classificados em assintomáticos, sintomáticos e oligossintomáticos, Uberlândia, 2012.

	Assintomáticos (N=3)	Sintomáticos (N=11)	Oligossintomáticos (N=17)
Baço (I)	2 (66,6%)	10 (90,90%) ^{a A}	12 (70,58%) ^{a A}
Baço (P)	0	9 (81,81%) ^{a A}	12 (70,58%) ^{a A}
Linfonodo (I)	2 (66,6%)	11 (100%) ^{a A}	12 (70,58%) ^{a A}
Linfonodo (P)	2 (66,6%)	10 (90,90%) ^{a A}	11 (64,70%) ^{a A}
M. O (I)	2 (66,6%)	11 (100%) ^{a A}	12 (70,58%) ^{a A}
M. O (P)	1 (33,3%)	10 (90,90%) ^{a A}	15 (88,23%) ^{a A}

I= *Imprint*; P= Punção; M.O= Medula Óssea

Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística entre as técnicas de coleta de amostras. Letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre o tipo de tecido analisado.

Saridomichelakis et al. (2005), realizando análise citológica de cães sintomáticos e oligossintomáticos positivos para LVC, padronizaram a leitura de 10 a 1000 campos, o que segundo os autores levava a leitura ser realizada em 45 a 60 minutos quando lia-se até 1000 campos. No grupo sintomático a sensibilidade analisando em conjunto linfonodo e medula óssea chegou a 94,7%, enquanto que

no grupo assintomático a positividade foi inferior a 30%. Porém no presente estudo não verificou-se diferença significativa na sensibilidade do teste parasitológico de acordo com a sintomatologia apresentada pelo animal.

Na avaliação da influência do tempo de leitura empregado no teste parasitológico dos três tecidos avaliados, das 93 amostras obtidas por PAAF 70 (75,26%) apresentaram-se positivas em até uma hora de leitura e 23 (24,74%) foram negativas. Considerando-se os períodos de um minuto, cinco minutos, 20 minutos, 30 minutos ou 60 minutos empregados para leitura das lâminas, dentre as amostras positivas, 29 (31,18%) foram positivas com a leitura realizada até um minuto; 42 (45,16%) em até cinco minutos; 56 (60,21%) em até 20 minutos; 62 (66,66%) em até 30 minutos e 70 (75,27%) positivas em até uma hora (Figura 3). Houve diferença estatística com tempo de leitura de 20 minutos quando comparado com tempo de um minuto ($p=0,001$), assim como a sensibilidade do teste foi maior com o tempo de leitura de 60 minutos quando comparado com 20 minutos ($p=0,04$).

Nas 93 amostras obtidas por *imprint*, 74 (79,56%) foram positivas com a leitura realizada em até uma hora de leitura e 19 (20,44%) foram negativas. Com a leitura realizada até um minuto 37 (39,78%) amostras foram positivas, em até cinco minutos 53 (56,98%), em até 20 minutos 68 (73,11%), em até 30 minutos 72 (77,41%) e em até uma hora 74 (79,56%) foram positivas (Figura 3). O tempo de leitura de cinco minutos foi diferente do tempo de um minuto ($p=0,02$) pelo teste de Fisher, assim como a sensibilidade do teste foi maior com o tempo de 20 minutos do que com o tempo de cinco ($p=0,03$) e diferentemente da análise de PAAF não houve diferença significativa entre 20 e 60 minutos de leitura ($p=0,38$).

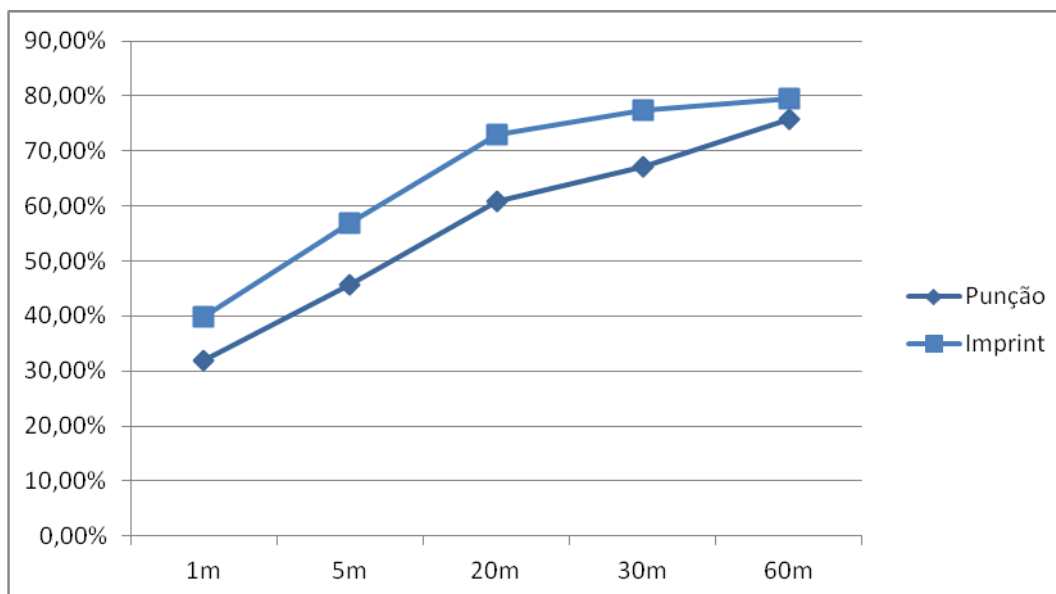


Figura 3. Percentual de resultados positivos em amostras obtidas por PAAF e *imprint* em função do tempo empregado para leitura no teste parasitológico, Uberlândia, 2012.

Verifica-se que quanto maior o tempo empregado para a leitura das lâminas maior o número de resultados positivos, tanto para amostras obtidas por PAAF como obtidas por *imprint* (Figura 3). Quando comparadas as técnicas de PAAF e *imprint* para obtenção de amostras para exames parasitológicos, verifica-se que quando são utilizados *imprints* o número de resultados positivos é maior, apesar de não haver diferença significativa entre as duas técnicas.

Silva, Stewart e Costa (2005) analisando a sensibilidade do diagnóstico parasitológico com até uma hora de leitura em *imprints* de medula óssea de humanos, obtiveram com um minuto de leitura 35 de 87 (40,2%) amostras positivas, 57 de 87 (65,5%) positivas em cinco minutos, 78 de 87 (89,7%) em 20 minutos, 80 de 87 (92,0%) em 30 minutos e 83 de 87 (95,4%) com até uma hora de leitura. No presente estudo o percentual de amostras positivas em até uma hora de leitura foi menor e não há na literatura, até onde se pode saber, estudos sobre a influência do tempo de leitura sobre diagnóstico parasitológico em cães, sendo este trabalho pioneiro neste campo.

Saridomichelakis et al. (2005) obtiveram por PAAF de linfonodo de cães sintomáticos 57 (83,8%) animais positivos com a análise de 100 campos, e quando utilizaram 1000 campos obtiveram 63 (92,6%) animais positivos. Quando utilizaram PAAF de medula óssea de cães sintomáticos obtiveram em 100 campos, 50 (72,5%) animais positivos e quando utilizaram 1000 campos obtiveram 60 (88,2%), o que demonstra que quanto maior o número de campos, maior o número de cães positivos. Neste mesmo estudo, na análise de cães assintomáticos, obtiveram em amostras por PAAF de linfonodo um total de cinco (12,5%) animais positivos em 100 campos e quando utilizado 1000 campos obtiveram oito (25,8%) animais positivos. Quando utilizaram a técnica de PAAF em amostras de medula óssea de cães assintomáticos, na análise realizada em até 100 campos o número de animais positivos foi de quatro (7,8%) e de sete (14,6%) positivos quando utilizados até 1000 campos.

Na avaliação da carga parasitária dos animais, nas amostras obtidas por PAAF em um total de 70 lâminas positivas, 15 (16,13%) amostras apresentaram somente uma forma amastigota, seguida de 28 amostras (30,10%) com até 10 formas amastigotas, 12 (12,90%) com até 50 formas amastigotas, duas (2,15%) com até 100 amastigotas, quatro (4,30%) com até 500 amastigotas, cinco (5,37%) com até 1000 amastigotas e quatro (4,30%) com até 1500 amastigotas em 100 campos. Nas 74 amostras positivas obtidas por *imprint*, nove (9,67%) apresentaram uma forma amastigota, 40 (43,01%) apresentaram até 10 amastigotas, 11 (11,82%) apresentaram até 50 amastigotas, cinco (5,37%) apresentaram até 100 amastigotas e nove (9,67%) apresentaram até 500 amastigotas em 100 campos (Figura 4).

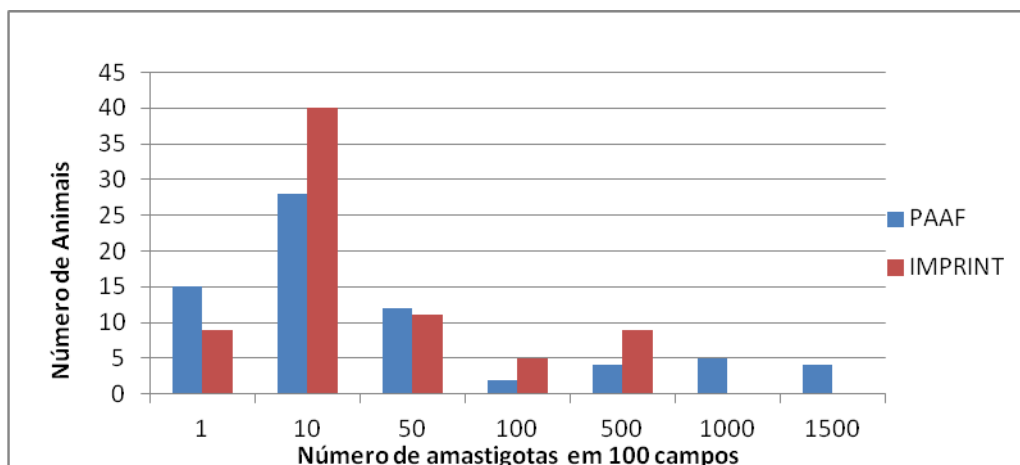


Figura 4 Relação carga parasitária com o tipo de técnica analisada. Uberlândia, 2012.

Quando se relacionou a sintomatologia clínica dos animais frente à carga parasitária obtida em amostras por PAAF e independente do tecido verificou-se que das 15 lâminas com visualização de uma amastigota em 100 campos, três (4,28%) são de animais sintomáticos, 10 (14,28%) oligossintomáticos e dois (2,85%) assintomáticos (Figura 5). No que se refere às lâminas com visualização de até 10 amastigotas, 15 (21,42) são de animais sintomáticos, 12 (17,14%) são de animais oligossintomáticos e uma (1,42%) de animais assintomáticos. Quatro (5,71%) eram sintomáticos, oito (11,42%) eram oligossintomáticos das 12 lâminas positivas com visualização de até 50 amastigotas. Das duas lâminas positivas com visualização de até 100 amastigotas, um animal (1,42%) era sintomático e o outro oligossintomático. Já das quatro lâminas com visualização de até 500 amastigotas um (1,42%) animal era sintomático e três (4,28%) oligossintomáticos, das cinco lâminas com até 1000 amastigotas visualizadas, todas as cinco (7,14%) eram de animais sintomáticos e das quatro lâminas com visualização de até 1500 amastigotas, as mesmas quatro (5,71%) eram de animais oligossintomáticos.

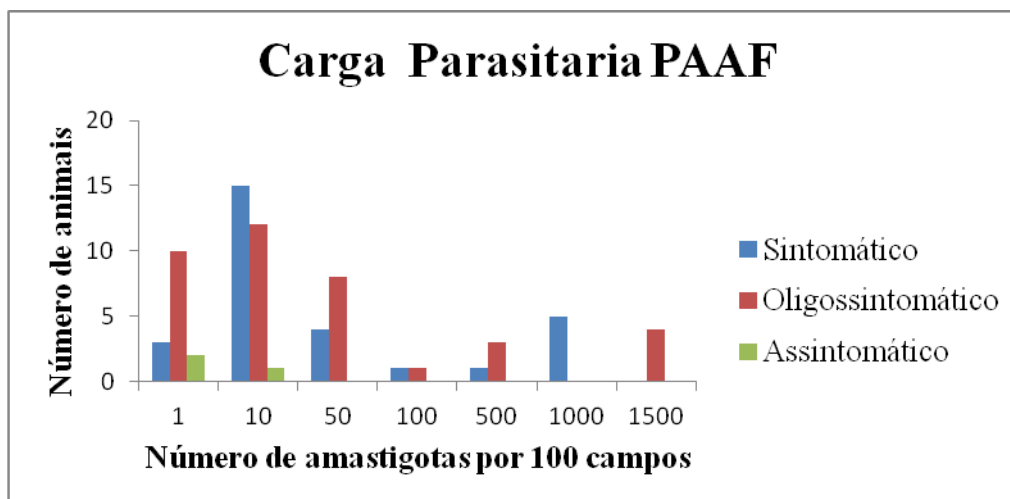


Figura 5. Carga parasitária de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, em amostras colhidas por PAAF, Uberlândia, 2012.

Quando se relacionou a sintomatologia clínica dos animais frente à carga parasitária obtida em amostras por PAAF, verificou-se que as maiores cargas parasitárias foram observadas em animais sintomáticos e oligossintomáticos (Figura 5). Os animais assintomáticos foram aqueles que atingiram carga parasitária menor.

Considerando as amostras obtidas por *imprint* e independente do tecido, obtiveram-se nove lâminas com visualização de uma amastigota e destas, três (4,05%) eram de animais sintomáticos e seis (8,10%) de animais oligossintomáticos. Já das 40 lâminas visualizadas com até 10 amastigotas, 18 (24,32%) eram de animais sintomáticos, 16 (21,62%) oligossintomáticos e seis (8,10%) assintomáticos. Com visualização de até 50 amastigotas obtivemos 11 lâminas e destas quatro (5,40%) eram de animais sintomáticos e sete (9,46%) oligossintomáticos. Das cinco lâminas positivas com visualização de até 100 amastigotas duas (2,70%) eram de animais sintomáticos e três (4,05%) oligossintomáticos e das nove lâminas com visualização de até 500 amastigotas, cinco (6,75%) eram de animais sintomáticos e quatro (5,40%) de animais oligossintomáticos (Figura 6).

Relacionando-se a carga parasitária com a sintomatologia clínica observou-se que tanto em relação aos *imprints* quanto punção, os animais assintomáticos

apresentaram carga parasitária de no máximo até 10, assim como os oligossintomáticos e sintomáticos apresentaram uma carga parasitária maior chegando a 1500 amastigotas em 100 campos.

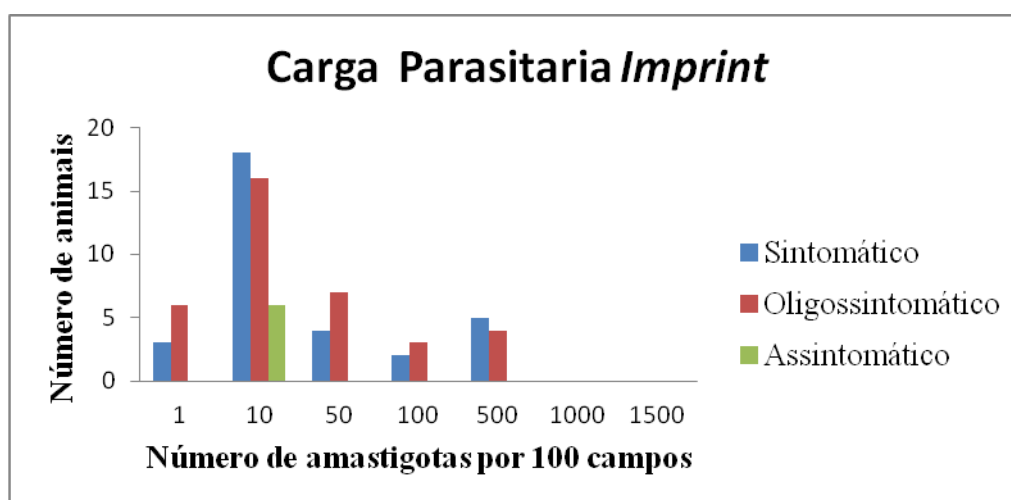


Figura 6. Carga parasitária de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, em amostras colhidas por *imprint*, Uberlândia, 2012.

SARIDOMICHELAKIS et al. (2005) ASSIS et al. (2010) relacionaram a carga parasitária com a sintomatologia clínica e citam que há uma maior sensibilidade no diagnóstico parasitológico de cães polissintomáticos já que apresentam uma maior carga parasitária, sendo portando que os sinais clínicos da doença estão diretamente relacionados a uma maior carga parasitária.

Nota-se na figura 7 em relação à medula óssea pela técnica de PAAF, que o maior número de animais sintomáticos concentraram-se com carga parasitária de 10 amastigotas em 100 campos, sendo que o mínimo foi um e o máximo foi de 1000 amastigotas. Os animais oligossintomáticos concentraram o maior número de animais com uma amastigota, enquanto que o seu máximo foi de 1500 amastigotas

em 100 campos. Já em relação aos animais assintomáticos, obtiveram apenas o máximo de uma amastigota.

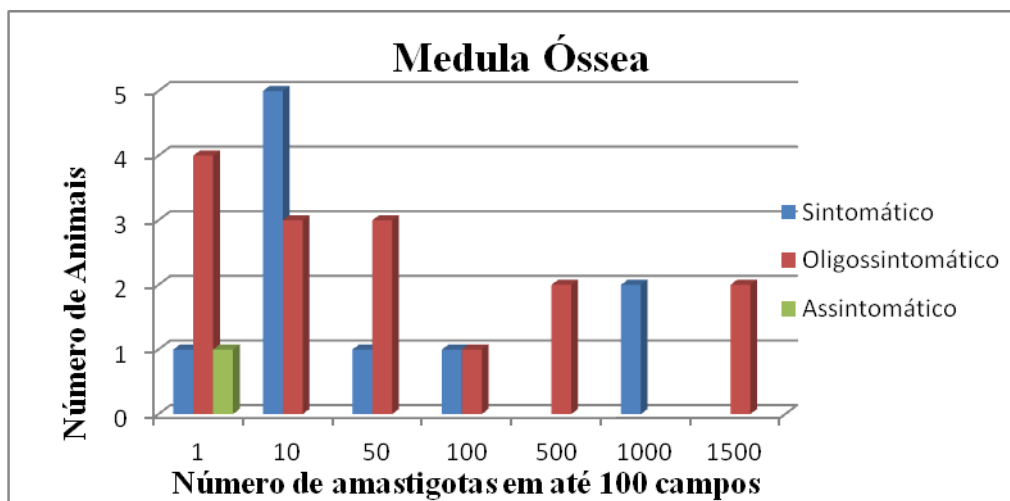


Figura 07. Carga parasitária da Medula Óssea de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, utilizando a técnica PAAF, Uberlândia, 2012.

Em relação ao linfonodo pela técnica de PAAF nota-se que os animais concentraram-se o maior número de até 10 amastigotas, sendo o mínimo de uma amastigota e no máximo 1000 amastigotas. Os animais oligossintomáticos concentraram o maior número de animais com até 10 amastigotas, sendo ainda que obteve o mínimo de um e o máximo de 1500 amastigotas. Os animais assintomáticos apresentaram um animal com uma amastigota e um com 10 amastigotas (Figura 8).

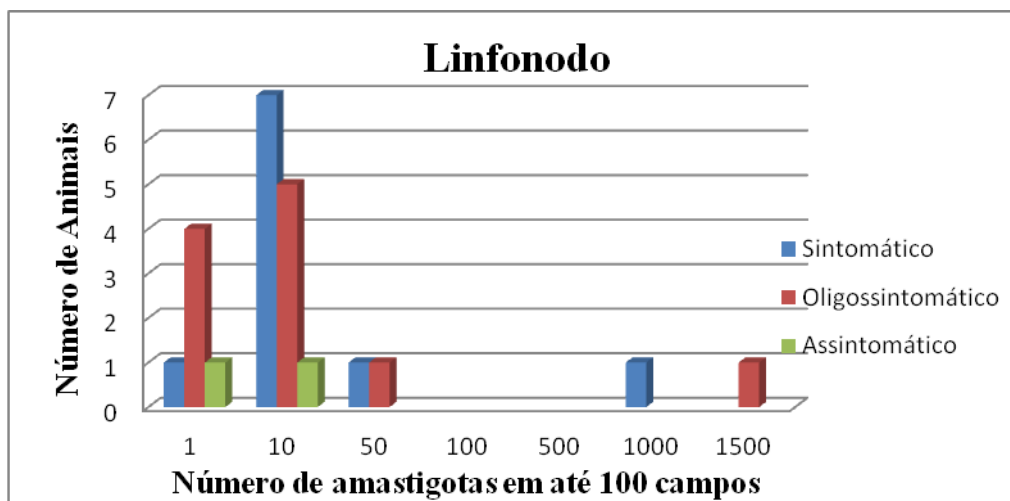


Figura 08. Carga parasitária do linfonodo de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, utilizando a técnica PAAF, Uberlândia, 2012.

Já em relação ao baço pela técnica de PAAF o maior número de animais sintomáticos concentraram-se com 10 amastigotas, sendo que o mínimo foi de uma amastigota e o máximo de 1000 amastigotas, já os animais oligossintomáticos concentraram o seu maior número com 50 amastigotas, sendo o mínimo de uma amastigota e no máximo 1500 amastigotas. Os animais assintomáticos não apresentaram número de amastigotas no baço (Figura 9).

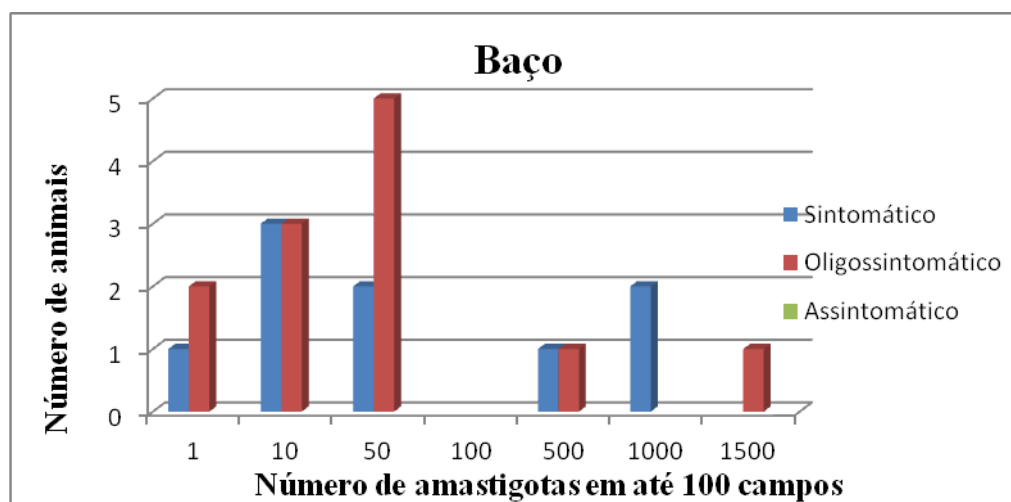


Figura 09. Carga parasitária do Baço de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, utilizando a técnica PAAF, Uberlândia, 2012.

Nota-se na figura 10 em relação à medula óssea pela técnica de *imprint*, que o maior número de animais sintomáticos concentraram-se com carga parasitaria de 10 amastigotas em 100 campos, sendo que o mínimo foi um e o máximo foi de 50 amastigotas. Os animais oligossintomáticos concentraram o maior número de animais com 50 amastigotas, enquanto que o seu máximo foi de 500 amastigotas em 100 campos. Já em relação aos animais assintomáticos, obtiveram apenas o máximo de 10 amastigotas.

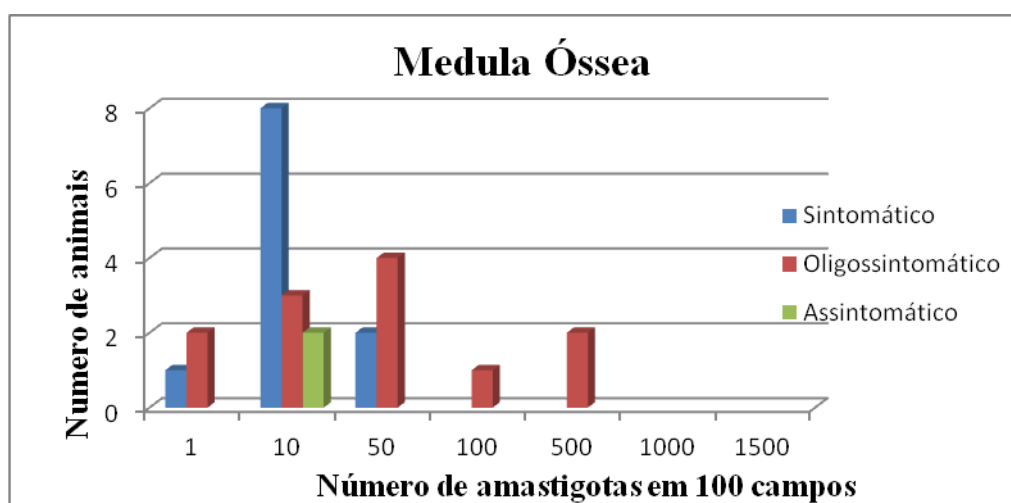


Figura 10. Carga parasitária da Medula Óssea de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, utilizando a técnica de *imprint*, Uberlândia, 2012.

Em relação ao linfonodo pela técnica de *imprint* os animais concentraram-se o maior número de animais sintomáticos com ate 10 amastigotas, sendo o mínimo de uma amastigota e no máximo 50 amastigotas. Os animais oligossintomáticos concentraram o maior número de animais com ate 10 amastigotas, sendo ainda que

obteve o mínimo de um e o máximo de 50 amastigotas. Os animais assintomáticos apresentaram o máximo de 10 amastigotas.

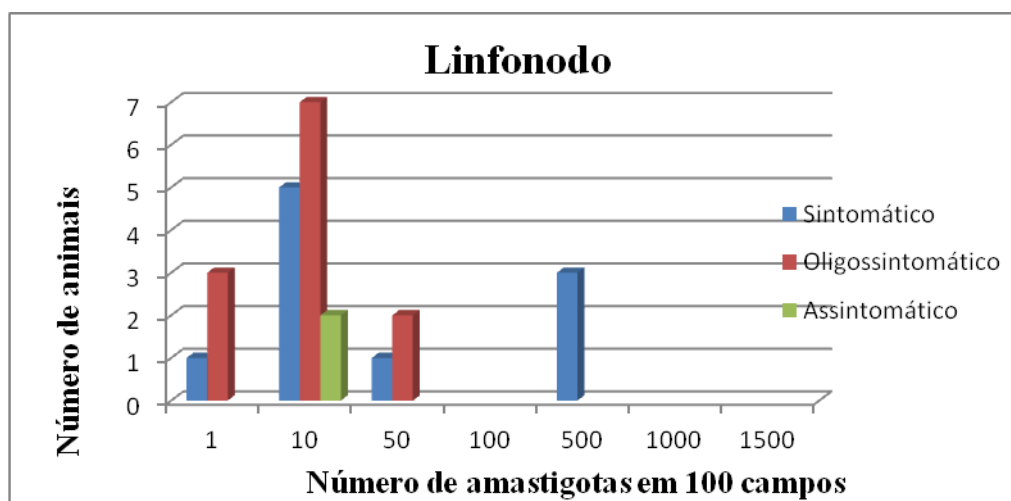


Figura 11. Carga parasitária do linfonodo de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, utilizando a técnica de *imprint*, Uberlândia, 2012.

Já em relação ao baço pela técnica de *imprint* que o maior número de animais sintomáticos concentrou-se com 10 amastigotas, sendo que o mínimo foi de uma amastigota e o máximo de 500 amastigotas, já os animais oligossintomáticos concentraram o seu maior número com 10 amastigotas, sendo o máximo 500 amastigotas. Os animais assintomáticos apresentaram número de 10 amastigotas no baço.

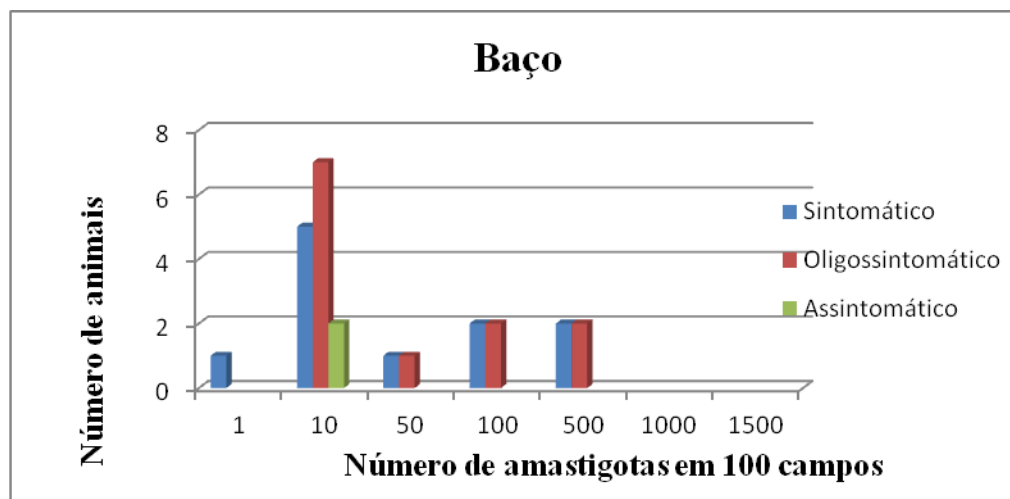


Figura 12. Carga parasitária do Baço de acordo com a sintomatologia clínica de cães sororreagentes para leishmaniose, utilizando a técnica de *imprint*, Uberlândia, 2012

Podemos notar que a relação carga parasitária com as amostras dos tecidos coletados também obtiveram o maior índice de amastigotas e sensibilidade maior quando relacionada com os animais sintomáticos e oligossintomáticos, e um índice menor de carga parasitaria quando as mesmas são provenientes de animais assintomáticos. Coutinho (2005) avaliou histopatologicamente a carga parasitária de animais infectados naturalmente por leishmania em cães com diferentes sintomatologias e relata que os cães polissintomáticos apresentam carga parasitária de intensa na análise do baço e os cães assintomáticos obtiveram carga parasitária leve. Tasca et al. (2009) analisando *imprints* de baço de cães positivos para leishmaniose obtiveram em cães assintomáticos, apenas como suspeitos e um animal com carga parasitária intensa, cães oligossintomáticos apresentaram carga parasitária moderada e os sintomáticos apresentaram carga parasitária intensa.

V. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que leitura realizada com até uma hora aumenta a sensibilidade do diagnóstico parasitológico da leishmaniose, tanto pela técnica de *imprint* e PAAF, obtendo 80% de animais positivos. A leitura com 20 minutos seja a ideal para a realização do exame parasitológico sendo ainda compatível com uma rotina clínica.

O órgão que demonstrou maior positividade para a visualização das amastigotas foi à medula óssea seguida do linfonodo poplíteo e pelo baço, sem diferença significativa entre os órgãos estudados. A medula óssea e o linfonodo apresentaram ainda maior positividade em relação à concordância de *imprint* e punção demonstrando ser uma boa opção tanto na prática da clínica, assim como diagnóstico *pos mortem*. A medula óssea e o linfonodo devem ser tidos como local de eleição para realizar a punção, já que são locais fáceis de serem puncionados, desde que haja prática em tal procedimento.

Em relação à sintomatologia clínica, o órgão e a técnica utilizada não houve diferença significativa, sendo que não há influência do tipo de tecido analisado no grupo assim como pela técnica. A carga parasitária demonstrou que a sintomatologia clínica está diretamente relacionada com o número de amastigotas encontradas, sendo, que o grupo assintomático possui uma menor quantidade de amastigotas.

Espera-se, portanto que a leitura das lâminas com o tempo de até uma hora possa demonstrar que a leitura realizada desta forma auxilie na detecção dos animais positivos chegando próximo a técnicas mais honerosas e consequentemente aumente a sensibilidade do teste parasitológico.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.B.P.F., MENDONÇA, A.J e SOUSA, V.R.F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.7, p. 1610-1615, jul, 2010.

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

ASSIS, J., QUEIROZ, N.M.G.P, SILVEIRA, R.C.V., NUNES, C.M., OLIVEIRA, T.M.F.S., JUNIOR, A.C.F.N., NEVES, M.F., MACHADO, R.Z., BUZETTI, W.A.S. Estudos comparativos dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**. Jaboticabal, v. 19, p.17-25, jan-mar. 2010.

BARROUIN-MELO, S.M., LARANGEIRA, D.F., TRIGO, J., AGUIAR, P.H.P., SANTOS, W.L.C., CSARVALHO, L.P. Comparison between Spleenic and Lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmaniachagassi* infection in Dogs. Short communication. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n.2, 195-197, Mar, 2004.

BRAZIL, R.P e BRAZIL, B. G. Biologia de flebotômíneos neotropícos. In: Rangel E. F e Lainson R. Editores. Flebotômíneos do Brasil. 20. ed. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**. Pag. 257-274. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.120p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, Brasília: Ministério da Saúde, p. 10, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde. Acessado em 10/10/2012. Nota técnica. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tec_front_br_argentina_lv_final_ses_rs.pdf, 2010.

DIAS, E.L, BATISTA, Z. SILVA., GUERRA, R. M. S. N. C., CALABRESA, K. S., LIMA, T. B., SILVA, A. L. A. Canine visceral Leishmaniasis (CVL): Seroprevalence, Clinical, Hematological and Biochemical Findings of Dogs Naturally Infected in an Endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão State, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**.v. 9, n. 3, p. 740-745, jul./set. 2008.

DIAS, FLÁVIO DE OLIVEIRA PASSOS; LOROSA, ELIAS SEIXAS; REBÊLO, JOSÉ MANUEL MACÁRIO. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**. V.19, n.5, p. 1373-1380, 2003.

COUTINHO, J. F. V. Estudo clínico e laboratorial e histopatológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com diferentes graus de manifestação física. **Dissertação**. Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2005.

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

FERRER, LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain. **Canine Leishmaniasis: an update**. Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet., p. 6-10. 1999.

FUMAGALLI, MIGUEL ANGEL CHAVEZ. Proteção contra a infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *phage display* e *spot synthesis*. 2008. 98 f **Tese (Doutorado em farmacologia)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Agosto de 2008.

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

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research, **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 230–250, 1993.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE: **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>. Acessado em 08/04/2010.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. 37, 2007.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. Artigo de revisão. **Bepa** 6 (67): 13-23. 2009.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P.J.; MARTIN., E.; MOLLEDA, M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal Veterinary Medicine**. v. 43, p. 469 -474, 1996.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 1ª Fórum sobre leishmaniose visceral canina. Jaboticabal. **Anais de fórum de leishmaniose visceral canina**. p. 15-22, 2006.

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. In: Saúde Pública. **Clínica Veterinária**, p.50-57, 2007.

MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S. Studies on canine control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspecivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, suplemento 1, 2004.

MICHALICK, M.S.M., GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: Parasitologia humana. Neves, D. P. (ed.). 11. ed. São Paulo, **Atheneu**, 2005. p. 67-83.

MOREIRA, M.A.B; LUVIZZOTO; M.C.R, GARCIA, J.F; CORBETT, C.E.P
[LAURENTIA](#) M. D. Laurentia. Comparison of parasitological, immunological molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, 2007.

MOREIRA, M.A.B., LUVIZOTTO, M.C.R., NUNES, C. M., DA SILVA, T.C.C., LAURENTI, M.D., CORBETT, C.E.P. Aplicação da Técnica de Imunofluorescência direta para o diagnostico da Leishmaniose Visceral canina em aspirado de

linfonodo. **Brazilian journal Veterinary Research Animal Science**. Vol. 39, Numero 2, São Paulo, 2002.

NETA A.V.C.; Rocha, R.D.R.; Gontijo, C.M.F.; Reis, A.B.; Martins-Filho, O.A. Citometria de fluxo no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 58, N. 54. p. 480-488, 2006.

NOGUEIRA, J. L., SILVA, M. V. M., PASSOS, C. C. AMBRÓSIO, C. E. A importância da Leishmaniose Visceral canina para a Saúde Pública: Uma zoonose reemergente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Periódico. Número 13, Julho, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Strategic direction for leishmaniasis research**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction/en/index.html> Acesso em 10 maio 2012.

PAULA, M.B.C.; RODRIGUES, E.A.S.; SOUZA, A. A.; REIS, A. A.; PAULA, F. P.; NETO, A.A.P.; LIMONGI, J. E. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Uberlândia, MG, concomitante com o relato de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** . v. 41n.3, p. 304-305, mai-jun, 2008.

QUEIROZ, N.M.G.P., et al., Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a

RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia. Vet.**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, jan.-mar. 2010.

REALE S, MAXIA L, VITALE F, GLORIOSO NS, CARACAPPA S, VESCO G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal Clinical Microbiology** 37: 2931–2935. 1999.

REIS, A.B.; et al., R. Parasite density and impaired biochemical / hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

RESENDE, S. M.; MOREIRA, F.; PINTO, I. M. Integração das redes pública e privada como instrumento na organização do diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral americana canina em Minas Gerais. **Bepa**; v. 6 n. 67,p .4-12, 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M.N., MYLONAKIS,M.E., LEONTIDES, L.S., KOUTINAS, A.F., BILLINIS, C., KONTOS, V. Evaluation of lymph node and Bone Marrow cytology in the diagnosis of canine Leishmaniasis (*Leishmania Infantum*) in symptomatic and assymptomatic dogs. **American Journal of Tropical. Medicine. Hygiene**, pág. 82–86, v. 73, 2005.

SILVA, S. M., et al. First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, March, 2009.

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

SILVA, A. K., BONELLO, F.B., BARATELLI, S.C., PINHEIRO, A. Avaliação parasitológica em amostras obtidas de linfonodos e medula óssea de cães sorologicamente positivos para Leishmaniose. **Ciências Agrárias e Saúde**. Andradina, v.7, p. 7-12, 2007.

SILVA, F. O. L. Aspectos entomológicos das leishmanioses. **Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n 65, maio de 2012.

SILVA, M. R. B., STEWART, J. M., COSTA, C.H.N. Sensitivity of bone Marrow Aspirates in the diagnosis of Visceral *Leishmaniasis*. **American Journal Tropical Medical Hyg**,v. 72(6), p. 811–814, 2005.

Sistema Informação Nacional de Agravos Notificáveis - **Sinan [base de dados na internet]**. Minas Gerais: Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais, 2000-2006. [acesso em 08 de abril de 2010]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.

SOUZA, C; B, S; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Urbana no Brasil. **Clinica Veterinária**. V. 71, p. 78. 2007.

SUNDAR S, RAI M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**; 9: 951. 2002.

TASCA, K.I., BUZETTI, W.A.S., TENORIO, M.S., PAULAN, S.C., LIMA, F.L., GUAL, N.M., QUEIROZ, P., MACHADO, R.Z., OLIVEIRA, T.M.F.S., NEVES, M.F., NORONHA JR, A.C.F., ASSIS, J. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmaniachagasi* em tecidos esplênicos de cães com Leishmaniose Visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, n. 1, p. 27-33, jan.-mar. 2009.

TRONCARELLI, M.Z., LUCHEIS, S.B., CAMARGO, J.B., MACHADO, J. G., LANGONI, H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no centro de controle de zoonoses de Bauru- SP, com vistas ao diagnóstico de leishmaniose visceral (LV). **Veterinária e Zootecnia**. v.16, n.2, p. 343-353, 2009.