



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV
Curso de Medicina Veterinária

**ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NOS CASOS DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA ATENDIDOS NO HVET-
UNB**

Gabriella Munitor Cardoso Cunha
Orientadora: Profa. Dra. Giane Regina Paludo

BRASÍLIA – DF
JULHO/2019



GABRIELLA MUNITOR CARDOSO CUNHA

**ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NOS CASOS DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA ATENDIDOS NO HVET-
UNB**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Giane
Regina Paludo

BRASÍLIA – DF
JULHO/2019

Cunha, Gabriella Munitor Cardoso

Alterações laboratoriais nos casos de Leishmaniose Visceral Canina atendidos no HVET-UnB/Gabriella Munitor Cardoso Cunha. Orientação de Profa. Dra. Giane Regina Pauludo. – Brasília, 2019.

63 p.: il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Gabriella Munitor Cardoso Cunha

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Alterações laboratoriais nos casos de Leishmaniose Visceral Canina atendidos no HVET-UnB

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Gabriella Munitor Cardoso Cunha

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: CUNHA, Gabriella Munitor Cardoso

Título: Alterações Laboratoriais nos casos de Leishmaniose Visceral
Canina atendidos no HVET - UnB

Trabalho de conclusão de curso
apresentada para a conclusão do curso
de Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília.

Aprovado em: 10 / 07 / 19

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Giane Regina Paludo

Julgamento: Aprovada

Instituição: UnB

Assinatura: Giane Paludo

MV. Dra. Sabrina dos Santos Costa Poggiari

Julgamento: Aprovada

Instituição: UnB

Assinatura: Sabrina Costa

M.V. Msc. Adriana Pereira Furtado

Julgamento: Aprovada

Instituição: UnB

Assinatura: Adriana Furtado

AGRADECIMENTOS

Primordialmente, agradeço a Deus que oportunizou momentos, locais, e a família certa para que eu concretizasse meu trabalho.

À minha amada família, meu porto seguro, muito obrigada pelo amor incondicional e toda compreensão. É para vocês que dedico todas as minhas conquistas!

À minha avó, professora de português favorita, você sempre foi e sempre será minha maior inspiração por ter sido uma mulher à frente de seu tempo e um grande exemplo de vida.

À minha mãe, pelo incentivo na busca de meus sonhos. Obrigada por todo carinho, consolo e sabedoria que você me proporcionou durante esta trajetória.

Às minhas irmãs, Rafaella e Manuella, por sempre estarem presentes na minha vida e por todas às vezes que leram e corrigiram este trabalho.

À minha prima, Fátima, pelo suporte e apoio durante toda minha graduação.

Às minhas filhas de quatro patas, Meg, Cindy, Fiona e Dorothy. Obrigada por todo o amor!

Aos meus amigos da Veterinária Débora Martins, Gabriela Dantas, Guilherme Marques, Monique Ribeiro e em especial, Thais Lettieri pela ajuda nas formatações deste trabalho. Agradeço por todos os momentos de descontração. Vocês fizeram com que a graduação fosse uma etapa inesquecível em minha vida.

Às residentes do laboratório de patologia clínica do HVET pela disposição em ajudar tirando dúvidas e aumentado meu conhecimento.

À professora Giane, minha orientadora, agradeço a paciência e a ajuda imprescindível na concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos epidemiológicos	3
2.2 Agente etiológico e ciclo de vida	4
2.3 Vetor	6
2.4 Leishmaniose Visceral Canina	8
2.5 Análise Laboratorial	10
2.6 Diagnóstico	12
2.6.1 Diagnóstico Clínico.....	12
2.6.2 Diagnóstico Parasitológico.....	12
2.6.3 Diagnóstico Molecular.....	13
2.6.4 Diagnóstico Sorológico.....	14
2.7 Tratamento	16
2.8 Controle e Prevenção	17
3 OBJETIVOS	19
4 METODOLOGIA	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
RELATÓRIO DE ESTÁGIO	45
ANEXOS	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular média

DF - Distrito Federal

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPP - Teste Imunocromatográfico Rápido de Duplo Percurso

DRC – Doença Renal Crônica

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

HB - Hemoglobina

HE – Hemácias

HVET- UnB – Hospital Veterinário da Universidade de Brasília

IFI - Imunofluorescência Indireta

IL - Interleucina

IMHQ - Imunohistoquímica

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RA - Região Administrativa

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

VCM - Volume corpuscular médio

VG - Volume globular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da LV urbana no Brasil de 1981 a 2009	
Fonte: Harhay et al. (2011).....	4
Figura 2 - Ciclo de vida da Leishmania infantum. Adaptado de Kaye, P. e Scott, P. (2011).....	6
Figura 3 - Fêmea de flebotomíneo ingurgitada. Adaptado de MAROLI et al., (2013).....	7
Figura 4 - Interação da resposta imune mediada por células Th1 e Th2 na LVC. Adaptado de BANETH et al., (2008).	9
Figura 5 - Distribuição percentual das principais alterações observadas no grupo dos casos confirmados.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos analisados nos grupos de casos confirmados e de casos suspeitos.....	24
Tabela 2 - Achados bioquímicos do grupo de casos confirmados e de casos suspeitos	27
Tabela 3 - Principais alterações laboratoriais encontradas no grupo dos casos confirmados.....	28
Tabela 4 - Região Administrativa do Distrito Federal dos cães do grupo de casos confirmados.....	30
Tabela 5 - Potenciais fatores de risco identificados no grupo dos casos confirmados.....	32

RESUMO

Protozoários do gênero *Leishmania* spp. são responsáveis por doenças chamadas leishmanioses. No Brasil, a leishmaniose visceral é uma zoonose provocada pela *L. infantum* e transmitida pela picada da fêmea de flebotomíneos. O cão é considerado o principal reservatório peridomiciliar devido à alta susceptibilidade à infecção e ao estreito relacionamento com seres humanos. O diagnóstico da LVC ainda é complexo e consiste na associação da avaliação clínica com métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. O quadro clínico dos cães infectados é bastante variável, de forma que, podem estar clinicamente saudáveis ou severamente comprometidos, dependendo da resposta imune de cada animal. Foi realizado um estudo retrospectivo dos cães com diagnóstico positivo de LVC atendidos no HVET no período de março de 2017 a março de 2019 com o intuito de avaliar as principais alterações hematológicas e bioquímicas. Por meio de uma pesquisa na ata da clínica médica de pequenos animais, os cães foram divididos em casos (1) confirmados (n=54), positivos na PCR, sorologia, citopatologia, e/ou IMHQ, e (2) casos suspeitos (n=8), positivos apenas no DPP. As principais alterações laboratoriais encontradas nos casos confirmados foram: anemia normocítica normocrômica (57%), hiperproteinemia (70%), hiperglobulinemia (74%) e hipoalbuminemia (72%). Com relação a sintomatologia, os sinais clínicos mais frequentes foram alterações cutâneas (70%), mucosas pálidas (56%) linfadenomegalia (33%) e alterações oculares (22%). As Regiões Administrativas com os maiores número de casos foram Sobradinho (13%), Jardim Botânico (13%) e Lago Norte (13%). Por fim, foi demonstrado que cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Com o auxílio da mediana das proteínas séricas totais, podemos concluir que valores próximos de 8,4 g/dL são um forte indicativo de infecção.

Palavras chave: LVC, diagnóstico, anemia normocítica/normocrômica, hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia.

ABSTRACT

Protozoa of the genus *Leishmania* spp. are responsible for a group of diseases called leishmaniasis. In Brazil, visceral leishmaniasis is a zoonosis caused by *L. infantum* and transmitted by the bite of female sand flies. The dog is considered the main peridomestic reservoir due to the high susceptibility to infection and the close relationship with humans. The diagnosis of LVC is complex and based on the association of clinical evaluation with parasitological, serological and molecular methods. The clinical picture of the infected dogs is quite variable, so that they may be clinically healthy or severely compromised, depending on the immune response of each animal. A retrospective study of dogs with positive LVC diagnosis was carried out at HVET from March 2017 to March 2019 aiming the evaluation of hematological and biochemical alterations. The dogs were divided into (1) confirmed cases (n = 54), positive in PCR, serology, cytopathology, and / or IMHQ, and (2) suspected cases (n = 8), positive only in DPP. The main laboratory abnormalities found in the confirmed cases were normocytic normochromic anemia (57%), hyperproteinemia (70%), hyperglobulinemia (74%) and hypoalbuminemia (72%). The most frequent clinical signs were skin changes (70%), pale mucous membranes (56%), lymphadenomegaly (33%) and ocular alterations (22%). Administrative Regions with the highest number of cases were Sobradinho (13%), Jardim Botânico (13%) and Lago Norte (13%). Finally, it was demonstrated that dogs naturally infected by *L. infantum* present alterations in hematological and biochemical parameters. With the median of total serum proteins, we can conclude that values close to 8.4 g / dL are a strong indicator of infection.

Keywords: LVC, diagnosis, normocytic / normochromic anemia, hyperproteinemia, hyperglobulinemia and hypoalbuminemia

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças provocadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* spp. De acordo com a sintomatologia clínica, as infecções podem ser agrupadas em leishmaniose visceral (LV), leishmaniose tegumentar e leishmaniose mucocutânea (CECCARELLI et al., 2014).

Nas Américas, a LV é zoonótica e a transmissão do agente etiológico, *Leishmania infantum*, ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos. (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). No Brasil, diversas espécies de mamíferos silvestres, domésticos e sinantrópicos foram registrados como hospedeiros ou reservatórios *Leishmania* spp. (CARDOSO et al., 2015). Entretanto, o cão doméstico é considerado o principal reservatório do parasito, contribuindo para a manutenção da infecção no meio urbano e periurbano. Desse modo, a presença de cães infectados pode aumentar o risco de infecção da população humana (DE ALMEIDA et al., 2012; MENDONÇA et al., 2017). Atualmente, o Distrito Federal (DF) é considerado uma região endêmica devido à autoctonia de casos humanos (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010).

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) consiste na avaliação das alterações clínicas e utilização de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Apesar da grande variedade de técnicas, o diagnóstico ainda é complexo em razão da grande variedade de sinais clínicos e da dificuldade em conseguir estabelecer métodos altamente específicos e sensíveis (SILVA et al., 2014)

O quadro clínico dos cães infectados é bastante variável, de forma que podem estar clinicamente saudáveis ou severamente comprometidos (REIS et al., 2009). O desenvolvimento de sinais clínicos está relacionado ao predomínio de uma resposta imune humoral, reponsável pela produção exacerbada de anticorpos que levam à formação de imunocomplexos circulantes, capazes de aderir a parede dos vasos sanguíneos provocando vasculites, poliartrites, uveítes e glomerulonefrites (BANETH, 2008; ROCH, et al. 2017). Além disso, outros sinais clínicos como onicogribose, esplenomegalia, linfadenomegalia,

lesões de pele, uveíte e ceratoconjuntivite também podem ocorrer em diferentes estágios da doença (PESSOA et al., 2019).

As manifestações clínicas são acompanhadas por alterações hematológicas e bioquímicas como anemia normocítica/normocrômica, e aumento das proteínas séricas totais com redução da taxa albumina/globulina (RIBEIRO et al., 2013). Dessa forma, esses parâmetros são importantes para a compreensão da patogenia da LVC e representam uma importante ferramenta na avaliação clínica do animal.

Portanto, considerando a relevância epidemiológica da enfermidade no DF e o potencial diagnóstico das alterações laboratoriais, os objetivos desse estudo foram: (1) avaliar as principais alterações hematológicas e bioquímicas dos cães infectados por *Leishmania* spp., (2) descrever os principais sinais clínicos observados, (3) identificar as Regiões Administrativas do DF com os maiores números de casos e (4) evidenciar potenciais fatores de risco à infecção dos cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (HVET – UnB).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos

A LV é a manifestação clínica mais severa e uma das doenças mais negligenciadas no mundo, sendo frequentemente associada a situações de pobreza, desnutrição, migração populacional e condições precárias de habitação. Essa afecção representa um importante problema de saúde pública nas regiões endêmicas, especialmente, no norte e o leste da África, subcontinente indiano e América do Sul (BELO et al., 2014; WHO, 2015).

Os casos de LV que ocorrem no Brasil, em Bangladesh, na Índia, na Etiópia, no Sudão, no Sudão do Sul e no Nepal são responsáveis por mais de 90% dos casos registrados anualmente em todo mundo (TEDLA et al., 2018). Antes de 1980, a LV estava concentrada nas áreas mais pobres da região Nordeste, contudo, devido a processos migratórios provocados por pressões econômicas ou sociais, ocorreu uma intensa urbanização gerando crescimento desordenado e o aparecimento de epidemias em cidades como Belo Horizonte, Campo Grande e Natal. O intenso fluxo populacional para as grandes cidades propiciou a formação de condições precárias de moradia, que somadas a presença do vetor da infecção nesses locais, levaram ao estabelecimento de ciclos domésticos e peridomésticos da doença (ROMERO & BOELAERT, 2010; MAROLI et al., 2013). Na Figura 1, observa-se a mudança do perfil epidemiológico no território brasileiro durante os últimos quarenta anos, evidenciada pela expansão da incidência da afecção nos grandes centros urbanos de cidades do centro-oeste e sudeste. Esse fenômeno de urbanização do ciclo da LV também foi observado em países como Itália, Irã, México e Marrocos (HARHAY et al., 2011).

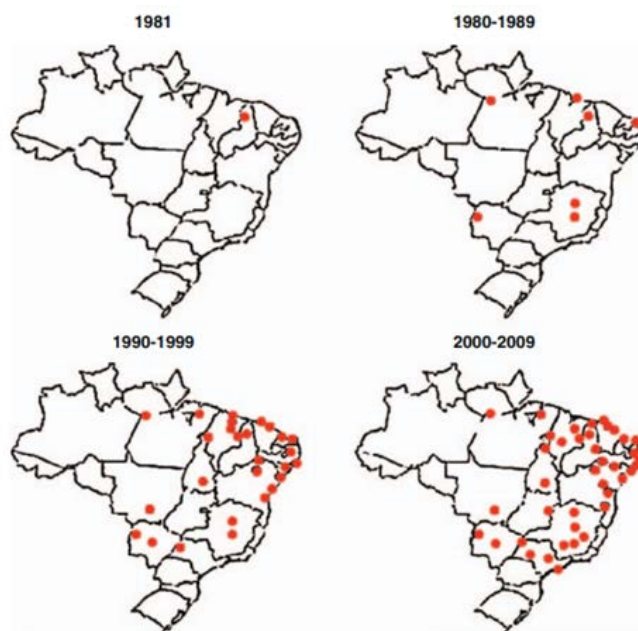


Figura 1 - Distribuição geográfica da LV urbana no Brasil de 1981 a 2009 Fonte: Harhay et al. (2011).

A LV já foi descrita em todas as regiões do Brasil, porém, no Sul do país, ocorrem apenas casos esporádicos. De acordo com o Ministério da Saúde, no DF, há registros de casos da doença desde 2000, todavia esses pacientes eram de estados vizinhos como Bahia, Minas Gerais e Goiás. Em julho de 2005, foi registrado o primeiro caso autóctone e, atualmente, a doença é endêmica na região. A introdução da afecção no DF pode ter se desenvolvido em virtude de fenômenos migratórios, como o ocorrido na região da Fercal, que levou à inclusão de cães infectados oriundos de estados vizinhos, onde já existiam registros da doença (CARRANZA-TAMAYO et al., 2010). Entre os anos de 2017 e 2018, foram registrados dois casos autóctones residentes das Regiões Administrativas (RA) do Lago Sul e da Fercal, sendo que este último veio a óbito (BRASIL, 2018).

2.2 Agente etiológico e ciclo de vida

No Brasil, a LV é uma zoonose provocada pela *Leishmania infantum* (sinonímia chagasi), protozoário da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (SILVA, 2007).

O ciclo biológico da *Leishmania infantum* é do tipo heteroxênico, ou seja, são necessários dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. No primeiro encontram-se as formas amastigotas e no segundo, as promastigotas metacíclicas. As formas amastigotas não possuem um flagelo exteriorizado e parasitam as células do sistema monocítico fagocitário. As formas promastigotas são flageladas e passam por várias etapas de diferenciação até se transformarem em promastigotas metacíclicas, forma infectante. o (MICHALICK, 2004).

A infecção do flebotomíneo ocorre quando as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingerindo macrófagos e monócitos parasitados com as formas amastigotas. No intestino do flebótomo, essas sofrem divisão binária e se diferenciam em formas promastigotas procíclicas. Posteriormente, ocorre a diferenciação em formas promastigotas metacíclicas na válvula estomodeal do vetor, o que possibilita a transmissão para um hospedeiro suscetível durante novo repasto sanguíneo. Assim, as formas infectantes são liberadas na epiderme do hospedeiro e fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, onde diferenciam-se em formas amastigotas que, então, se replicam provocando a ruptura da célula hospedeira e a reinfecção de novos fagócitos (KAYE & SCOTT, 2011).

Além da transmissão vetorial, a infecção também pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea, transmissão congênita, transmissão sexual e através de agulhas infectadas em usuários de drogas (MAROLI et al., 2013).

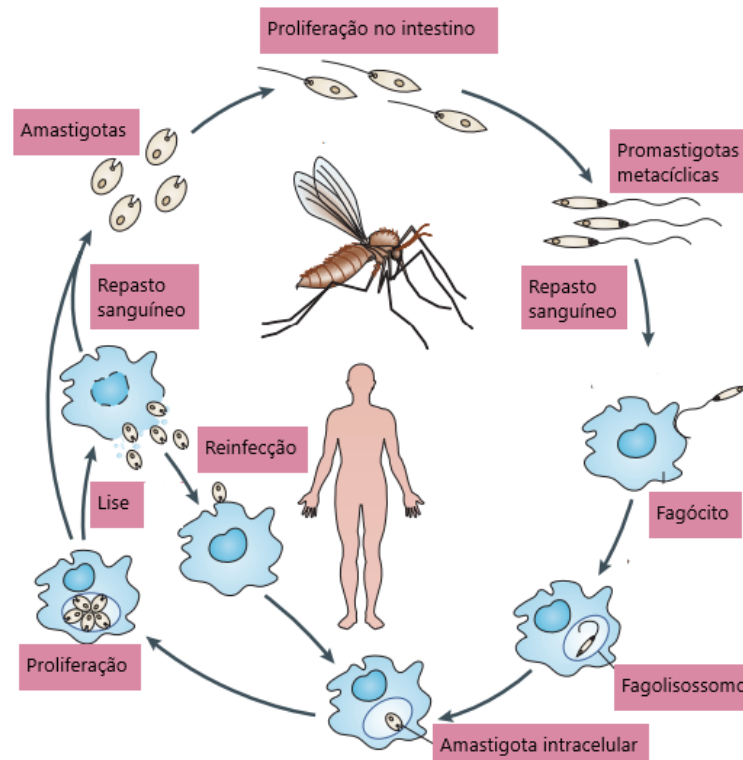


Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania infantum*. Adaptado de Kaye, P. e Scott, P. (2011).

2.3 Vetor

Os vetores responsáveis pela transmissão são fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos, dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (REGO et al., 2015). Na África, Ásia e Europa, as espécies que atuam como vetores são do gênero *Phlebotomus sp.* Nas Américas, são encontradas espécies do gênero *Lutzomyia sp.* (BATES et al., 2008).

No Brasil, a principal espécie de flebotomíneos é a *Lutzomyia longipalpis*. Contudo, há registros da *Lutzomyia cruzi* atuando como vetor no estado do Mato Grosso do Sul (SILVA et al., 2015). A distribuição geográfica da *Lu. longipalpis* ocorre do México até a Argentina, assim, essa espécie é capaz de se adaptar a diferentes condições climáticas, sendo encontrada tanto em áreas de climas semi-árido como locais de clima mais úmido (SOUZA & BORGES, 2008).

A *Lu. longipalpis* é um inseto pequeno, de 1 a 3 mm de comprimento, recoberto por pequenos pelos castanhos (Figura 2), que está amplamente distribuído no território brasileiro, sendo encontrada em quase todas as regiões geográficas, com exceção da região sul (BRASIL, 2014). Desde o final da década de 80, o intenso processo de urbanização, associado ao desmatamento e ao intenso fluxo migratório, foi responsável pelo aumento da densidade vetorial devido a adaptação do inseto ao ambiente urbano e periurbano (MAROLI et al., 2013).



Figura 3 - Fêmea de flebotomíneo ingurgitada. Adaptado de MAROLI et al., (2013).

Esses flebótomos possuem hábitos crepusculares e costumam voar em pequenos saltos, pousando com as asas abertas. Na fase adulta, a *Lu. longipalpis* se adapta facilmente a diferentes temperaturas, podendo ser encontrada em ambientes intradomiciliares e nos abrigos de animais domésticos como em galinheiros, chiqueiros e canis. Na fase larval, é necessário um ambiente úmido com baixa luminosidade e rico em matéria

orgânica para que as larvas possam se desenvolver. O ciclo biológico da *Lu. longipalpis* compreende quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estágios), pupa e adulto. Conforme as variações de temperatura, o desenvolvimento do ovo ao inseto pode durar de 30 a 40 dias. (BARATA et al., 2005; BRASIL, 2014).

2.4 Leishmaniose Visceral Canina

O cão é considerado o principal reservatório peridomiciliar da LV devido à alta susceptibilidade a infecção e ao estreito relacionamento com seres humanos. A grande quantidade de formas amastigotas na pele do animal e a presença de cães assintomáticos também são importantes na manutenção e expansão do ciclo de transmissão do parasito (SILVA et al., 2015; ARRUDA et al., 2016).

Em virtude dos diversos mecanismos patogênicos e das diferentes respostas imunes do hospedeiro, os cães com LVC podem ser assintomáticos ou apresentar uma forma progressiva de sinais clínicos. O predomínio de resposta imune mediada por linfócitos T helper 2 (Th2) representa susceptibilidade à infecção, enquanto a resposta orientada por linfócitos T helper 1 (Th1) está relacionada à resistência. (PROVÉRPIO et al., 2014; FREITAS et al., 2012)

O mecanismo de resistência à infecção ocorre quando macrófagos e células dendríticas apresentam os antígenos de *L. infantum* para células TCD4+, produzindo um tipo de resposta imune orientado por células Th1 (Figura 4). Esse tipo de resposta está associado à produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), interleucina (IL)-2 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), que estimulam a fagocitose de macrófagos e produzem óxido nítrico, que possui atividade leishmanicida e proporciona controle da disseminação parasitária (MORENO et al., 2014; SRIVASTA et al., 2016; PRIOLO et al., 2019). A resposta mediada por linfócitos Th2 está associada a um alto nível de anticorpos e à produção de citocinas regulatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e o fator de crescimento beta (TGF β), que levam à inibição da resposta imune

celular, por meio do bloqueio da produção de óxido nítrico por macrófagos e da diminuição na produção de IFN- γ e TNF (COSTA-PEREIRA ET AL 2015; PRIOLO et al., 2019).

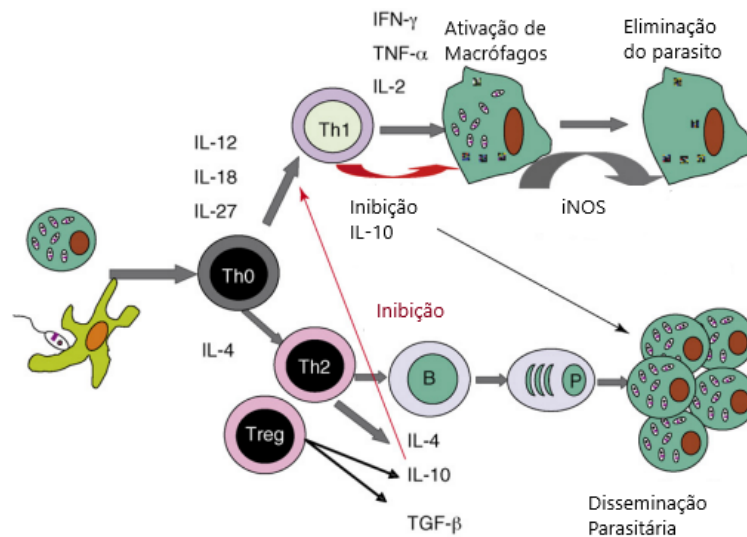


Figura 4 - Interação da resposta imune mediada por células Th1 e Th2 na LVC. Adaptado de BANETH et al., (2008).

A LVC possui um período de incubação que pode variar de um mês a quatro anos e o parasito pode se disseminar via vasos linfáticos ou sanguíneos, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodos, fígado e baço, assim como rins e trato gastrointestinal. Em contrapartida, em humanos, o parasita é normalmente limitado à medula óssea, baço e fígado (ALVAR et al., 2004; REIS et al., 2006). O achado histopatológico típico é uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença das formas amastigotas de leishmania em macrófagos (BANETH et al., 2008).

Os sinais clínicos mais comuns incluem lesões de pele, linfadenopatia generalizada, caquexia, atrofia muscular, intolerância ao exercício, apetite reduzido, letargia, esplenomegalia, lesões oculares e onicogribose (MICHELIN et al., 2018).

2.5 Análise Laboratorial

O diagnóstico de leishmaniose em cães deve ser baseado numa abordagem integrada, considerando o histórico e os achados clínicos e laboratoriais (PALTRINIERI et al., 2010). Os principais testes incluem a realização de um hemograma e perfil bioquímico (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Os cães infectados por leishmania apresentam diversas alterações bioquímicas e hematológicas. Os principais achados incluem anemia e aumento dos níveis séricos de proteínas totais (REIS et al., 2006). A anemia normocítica é frequente na LVC ocorrendo, principalmente, em virtude do processo inflamatório responsável pela diminuição dos valores séricos de ferro e aumento da ferritina (DIAS, 2008; Silva et al., 2008). Além disso, outros fatores como perdas sanguíneas, hemólise, eritropoiese diminuída e aplasia ou hipoplasia medular também estão envolvidos. As perdas sanguíneas estão associadas a sinais clínicos, como epistaxe, e a distúrbios da coagulação, enquanto, a hemólise é promovida pela produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos. A eritropoiese diminuída pode estar relacionada a redução na produção de eritropoietina, provocada pela deposição de imunocomplexos nos rins ou a própria anemia crônica do processo inflamatório. Os danos provocados pela ação direta do parasito na medula óssea são responsáveis pelo desenvolvimento de aplasia ou hipoplasia medular (DIAS, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Os distúrbios hemostáticos descritos na LVC incluem anormalidades na agregação plaquetária promovendo disfunção plaquetária, baixo número de plaquetas, diminuição das atividades dos fatores de coagulação e fibrinólise (ALVAR et al., 2004).

Com relação ao leucograma, a literatura ainda apresenta muitas divergências, porém, de acordo com BOURDOISEAU et. al (1997) na LVC, inicialmente, é possível observar leucocitose por neutrofilia e, em estágios mais avançados, pode-se constatar leucopenia por linfopenia.

As alterações bioquímicas estão ligadas a resposta imune humoral policlonal, que leva a produção de imunoglobulinas e consequente hiperproteinemia. Isso pode ser observado pelo aumento das proteínas séricas totais, caracterizado por hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, levando à diminuição da relação albumina/globulina (REIS, 2006). A hiperglobulinemia ocorre, principalmente, devido ao aumento da gama-globulina. A hipoalbuminemia foi atribuída à inflamação aguda e à patologia renal, hepática e intestinal (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Os cães infectados por leishmania com comprometimento renal apresentam níveis elevados de ureia e creatinina, especialmente aqueles com o quadro clínico mais avançado (CIARAMELLA et al., 1997; REIS et al., 2006; FREITAS et al., 2012). Os níveis de creatinina e de ureia são indicadores indiretos da função renal. A creatinina é considerada o marcador mais específico, pois sofre alterações somente pela eficiência da filtração glomerular. A ureia é resultante do metabolismo das proteínas e é eliminada pelos rins, com reabsorção de até 40% nos túbulos renais, podendo sofrer interferência de fatores fisiológicos, como idade e dieta (RIBEIRO, 2007a).

A hepatomegalia é frequentemente um achado patológico da LVC decorrente de infiltrado inflamatório, hipertrofia / hiperplasia de células residentes e possivelmente congestão passiva (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014). A determinação da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) é utilizada para avaliar a ocorrência de lesões hepáticas em cães e gatos. Além de ser encontrada na mitocôndria dos hepatócitos, a AST também está presente nas musculaturas esquelética e cardíaca, por isso seu aumento pode ser interpretado como consequência de lesões hepáticas, desde que se excluam lesões musculares e cardíacas. A ALT é uma enzima considerada hepato-específica, pois as elevações nos níveis de sua atividade sérica são observadas, principalmente em casos de degeneração ou necrose hepatocelular. A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima mitocondrial encontrada em vários tecidos, utilizada para confirmar colestase em cães, já que nesta espécie ocorre aumento considerável em caso de obstrução dos canalículos biliares (ZANETTE, 2006).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é extremamente importante para o controle e a vigilância da disseminação da *L. infantum*. É baseado em uma associação entre sinais clínicos e testes laboratoriais (WHO, 2014).

2.6.1 Diagnóstico Clínico

A avaliação clínica é complexa devido à ampla variedade de sinais clínicos e semelhança com outras afecções, como a babesiose e erlichiose. Ademais, a imunossupressão provocada pela infecção pode gerar infecções secundárias que complicam o diagnóstico (FARIA & ANDRADE, 2012).

PARADIES et al. (2010) sugerem que o curso clínico do cão, sintomático ou assintomático, depende de vários fatores como a ocorrência e número de flebotomíneos, a espécie de *Leishmania* envolvida, a predisposição genética do hospedeiro e a resposta imune. Isso, somado com a ampla gama de sinais clínicos que esses animais podem exibir, dificulta ainda mais a utilização da sintomatologia como critério diagnóstico. Desse modo, o diagnóstico deve ser complementado com exames laboratoriais que podem ser divididos em métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares.

2.6.2 Diagnóstico Parasitológico

Os testes parasitológicos consistem na visualização microscópica de formas amastigotas do parasito na medula óssea, nos linfonodos ou na escarificação de lesões (BRASIL, 2014). As formas amastigotas são identificadas por seu formato ovóide com núcleo arredondado (ZANETTE, 2006).

As técnicas mais utilizadas incluem o exame citopatológico direto — realizado por meio de *imprints* de lesões de pele ou aspirados de medula

óssea, baço e linfonodos — e o exame histopatológico — efetuado com fragmentos de tecido ou pele coletados em biopsias ou necropsias. (FARIA & ANDRADE, 2012).

Os testes parasitológicos são considerados a técnica padrão-ouro no diagnóstico da LVC, com uma especificidade de 100%. Entretanto, a sensibilidade normalmente é reduzida, variando de acordo com a técnica e a carga parasitária. As técnicas de imunoistoquímica (IHQM) possibilitam um aumento na sensibilidade e especificidade do diagnóstico parasitológico por apresentarem uma fácil execução e alto grau de contraste entre os parasitas e as células hospedeiras (PESSOA et al., 2019). Entretanto, essa técnica é dispendiosa e mais demorada que o exame histopatológico. Ademais, os laboratórios devem ter todas as etapas de realização padronizadas a fim de evitar erros na interpretação dos resultados. (ABRANTES, 2012; GUERRA et al. 2012)

2.6.3 Diagnóstico Molecular

O principal método utilizado no diagnóstico molecular da LVC é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na identificação de uma região de DNA do parasito, denominada alvo, que é amplificada por meio de oligonucleotídeos iniciadores (FARIA & ANDRADE, 2012).

As três técnicas de PCR geralmente utilizadas são a PCR convencional (PCR), a “nested” PCR (nPCR) e a PCR em tempo real (qPCR) (PALTRINIERI, 2010). A PCR convencional é uma técnica qualitativa, de forma que o resultado do teste classifica o cão como infectado ou não infectado. A principal desvantagem desta técnica é a necessidade da análise eletroforética dos produtos em gel de agarose ou poliacrilamida. A nPCR é similar a PCR, porém, na primeira, são realizadas duas amplificações consecutivas com oligonucleotídeos internos, tornando-a mais sensível que a PCR e menos específica, já que a adição de etapas em sua execução, favorece a contaminação. Já a qPCR promove a quantificação do DNA alvo, permitindo monitoração da carga parasitária, sendo essa a principal vantagem em relação

a PCR convencional. Além disso, a qPCR é uma técnica mais rápida e com menores chances de contaminação pois não há necessidade de análise eletroforética dos produtos (PALTRINIERI et al., 2010; SOLCÀ, 2012).

A sensibilidade e especificidade da PCR variam de acordo com o tipo de oligonucleotídeos iniciadores, o método de extração de DNA, o tipo de amostra e o protocolo utilizado. Com o auxílio da PCR, o diagnóstico de LVC melhorou consideravelmente, demonstrando uma sensibilidade entre 89% a 100% em cães sintomáticos ou com diagnóstico parasitológico positivo (ALVAR et al., 2004).

2.6.4 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico da LVC ocorre por meio da detecção de anticorpos específicos IGG anti-*Leishmania*. É amplamente utilizado devido a intensa resposta humoral específica provocada pela infecção (BRASIL, 2014). Diversos testes podem ser utilizados tais como fixação de complemento, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta (IFI) e imunoenensaio enzimático (ELISA) (ALVES & BEVILACQUA, 2004; CIARAMELLA & CORONA, 2003).

Os exames sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde até 2011 eram ELISA, como teste de triagem, e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), como confirmatório. A partir de 2012, o Ministério da Saúde emitiu uma nota técnica orientando a utilização de um teste imunocromatográfico rápido de duplo percurso (DPP) como triagem e ELISA como teste confirmatório da doença (BRASIL, 2011)

De acordo com a OMS, a RIFI é considerada o método padrão ouro do diagnóstico sorológico devido à alta sensibilidade e especificidade observadas em diversas áreas endêmicas. A técnica consiste na aplicação de múltiplas diluições séricas em lâminas revestidas com as formas promastigotas. A ligação específica dos anticorpos ao parasito da lâmina e sua concentração relativa (titulação de anticorpos) são reveladas pelo uso de anticorpos

fluorescentes. A avaliação da intensidade da fluorescência pela microscopia é subjetiva, representando uma limitação (PALTRINIERI et al., 2010).

O ELISA é baseado na reação de anticorpos séricos com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*. O soro diluído é adicionado ao antígeno do parasito e absorvido em microplacas. Quando um resultado é soropositivo, aparece uma reação colorimétrica que pode ser quantificada por espectrofotometria (BRASIL, 2014; TRAVI et al., 2018). A sensibilidade e especificidade de ELISA variam de acordo com o tipo de antígeno empregado. Por um lado, os antígenos brutos (extratos de parasitos inteiros) são sensíveis para a detecção de infecções caninas subclínicas ou clínicas, contudo fornecem uma especificidade um pouco menor (FERREIRA et al., 2013). Por outro lado, o ELISA com peptídeos recombinantes é muito específico, mas a sensibilidade para a detecção de infecção em cães clinicamente saudáveis pode estar reduzida, dependendo do antígeno empregado (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Os métodos imunocromatográficos são muito utilizados em estudos de campo devido à sua simplicidade e rapidez, permitindo a intervenção imediata do veterinário (ALVAR, 2004). Diversos kits comerciais estão disponíveis para a execução de testes rápidos de imunocromatografia, de forma que cada kit possui antígenos e reagentes diferentes (PALTRINIERI et al., 2010).

O DDP é um imunoenensaio cromatográfico rápido desenvolvido pelo Instituto Biotecnológico, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, (Bio-Manguinhos). O teste fornece um resultado qualitativo que utiliza uma combinação dos antígenos recombinantes rK9, rK26 e rK39 de *L. infantum*, constituindo o antígeno rK28. As principais vantagens do ensaio em relação aos métodos sorológicos convencionais são uma maior precisão, interpretação simplificada e uso de volumes mínimos de amostra (SCHUBACH et al., 2014). No entanto, diversos estudos comprovam que o DPP é um teste satisfatório nos casos em que ocorre uma sintomatologia clínica, mas possui baixa sensibilidade na detecção de cães assintomáticos, podendo gerar muitos animais falso-negativos (SILVA et al., 2014).

A principal limitação dos testes sorológicos é a possibilidade de resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada com outros agentes infecciosos como o *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma caninum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii* (MARCONDES & DAY, 2019). Além disso, podem falhar na detecção de cães infectados no período pré-patente ou antes da soroconversão, promovendo resultados falso-negativos. Da mesma forma, alguns cães nunca fazem a soroconversão ou podem se converter soronegativos, mesmo infectados. A presença de anticorpos maternos também pode afetar o diagnóstico sorológico, portanto cães com menos de três meses não devem ser avaliados através da sorologia, pois podem apresentar resultados falso-positivos (ZANETTE, 2006).

2.7 Tratamento

Apesar da disponibilidade de diversos protocolos terapêuticos, o tratamento da LVC é complexo devido à localização intracelular do parasita e seu metabolismo, que o protege do sistema imunológico do hospedeiro e da maioria das terapias (MIRO et al., 2009). Em cães, os objetivos do tratamento consistem na redução geral da carga parasitária e tratamento dos danos teciduais provocados pelo parasito (OLIVA et al., 2010).

Os medicamentos utilizados no tratamento da doença são capazes de melhorar temporariamente os sinais clínicos ou curar clinicamente os cães, mas nenhum elimina completamente a infecção. Dentre os fármacos mais indicados, destacam-se antimoniato de n-metilglucamina, alopurinol, miltefosina, anfotericina B, domperidona, pentamidina e aminosidina (MIRO et al., 2009; ARAÚJO, 2018). Além disso, fluorquinolonas, como a marnofloxacina, foram apontadas como alternativas efetivas no tratamento da LVC. (FARCA et al., 2012). As terapias mais eficazes consistem na combinação de antimoniato de meglumina com alopurinol ou miltefosina com alopurinol (MANNA et al., 2015).

No Brasil, a Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008 proíbe os médicos veterinários de realizarem tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA). Todavia, em 2016, o MAPA emitiu uma nota técnica autorizando a utilização do Milteforan (princípio ativo Miltefosina) no tratamento da LVC. (BRASIL, 2016)

2.8 Controle e Prevenção

Os cães são considerados o principal reservatório urbano da LV e o controle dos animais infectados é a base da prevenção da doença (WHO, 2014).

A estratégia mais eficaz para prevenção da LVC é evitar o contato entre o vetor infectado e o cão, por isso medidas de controle contra o vetor devem ser adotadas no ambiente e nos cães. É recomendado adotar medidas de limpeza como retirada de matéria orgânica excessiva e aplicação de inseticidas ambientais, especialmente, nos canis. Além disso, pode ser feito o uso de plantas repelentes de insetos, como a citronela (RIBEIRO, 2007b). Nos cães, a prevenção pode ser realizada com o uso coleiras impregnadas com inseticida ou aplicação de produtos “spot-on” (deltametrina, permetrina, flumetrina, fipronil). Ademais, o risco de desenvolvimento da doença pode ser reduzido pela vacinação. No Brasil, a Leishtec® é a vacina que possui a autorização do MAPA para ser comercializada (BRASIL, 2014).

O Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral institui medidas de controle que incluem diagnóstico e tratamento dos casos humanos, controle do vetor com inseticidas e eutanásia dos cães positivos na triagem sorológica, a qual consiste no DPP seguido de ensaio imunoenzimático (EIE-LVC) para confirmação dos resultados. Apesar dessas medidas, o número de casos humanos, no Brasil, em um período de 21 anos, aumentou de 1944 em 3894. (COURA-VITAL et al., 2013).

Diversos pesquisadores questionam a eficácia da eutanásia de cães infectados como estratégia para o controle da LV, pois esses animais serão substituídos por filhotes, adultos suscetíveis ou cães já infectados, contribuindo para a manutenção da infecção (COURTENAY et al., 2002; MOREIRA et al.,

2004; NUNES et al., 2008). MELO et al. (2018) constataram que a implementação de programas educacionais que promovem a posse responsável de cães seria uma medida governamental mais ética e menos dispendiosa que a triagem sorológica e a eutanásia dos cães infectados.

3 OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram: (1) avaliar as principais alterações hematológicas e bioquímicas dos cães infectados por *Leishmania* spp., (2) descrever os principais sinais clínicos observados, (3) identificar as Regiões Administrativas do DF com os maiores números de casos e (4) evidenciar potenciais fatores de risco à infecção

4 METODOLOGIA

O estudo foi realizado através de uma pesquisa na ata da clínica de pequenos animais do HVET - UnB com o intuito de selecionar os casos suspeitos de LVC atendidos no período de março de 2017 a março de 2019. Posteriormente, verificou-se quais prontuários atendiam os seguintes critérios:

- 1) suspeita clínica de leishmaniose descrita na ficha clínica ou ficha de retorno;
- 2) solicitação de exames laboratoriais de rotina (Ex. hemograma, testes bioquímicos);
- 3) solicitação de exames específicos, que confirmassem o diagnóstico de LVC;
- 4) Não estar recebendo nenhum tipo de tratamento.

Desses prontuários foram analisados os seguintes dados: número do registro no Hvet - UnB (RG), sexo, ano de nascimento, dados do proprietário, região de moradia, data da consulta, motivo da consulta, exame dermatológico, outros sinais, suspeita clínica, hemograma, testes bioquímicos, exames específicos para leishmaniose (citopatologia, ELISA, RIFI, PCR) e diagnóstico final.

Os cães foram divididos em 2 grupos:

- Casos confirmados: Cães positivos na PCR, Sorologia (IFI, diluição total, e ELISA), Citopatológico ou Imunohistoquímica.
- Casos suspeitos: Cães positivos no DPP e sem outros testes confirmatórios.

Os dados foram organizados e analisados em um banco de dados no programa EXCEL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período do estudo, foram analisados 302 prontuários e, destes, 62 (20,5%) foram positivos em algum método diagnóstico, dentre eles, 8 somente no DPP (Anexo 1). De acordo com os *guidelines* da LeishVet a respeito do Manejo Prático da LVC, os testes qualitativos imunocromatográficos não fornecem um diagnóstico completamente seguro, sendo necessário realizar técnicas sorológicas quantitativas para a obtenção de um diagnóstico definitivo (SOLANO GALLEGO et al. 2011). Portanto esses 8 cães não foram considerados com diagnóstico positivo de LVC. Desse modo, os 62 cães foram divididos em casos confirmados (n = 54) e casos suspeitos (n=8).

Dos 54 cães infectados, 39 foram positivos no exame sorológico, 25 no molecular e 19 no parasitológico. No Anexo 1, encontra-se o prontuário do HVET – UnB de cada animal e os testes em que foram positivos. É possível notar que grande parte dos animais foi positivo em mais de uma técnica, com exceção de um cão positivo somente na IHQM.

O diagnóstico sorológico dos cães atendidos no HVET consistiu em RIFI diluição total e ELISA. Os métodos sorológicos são mais utilizados no diagnóstico da LVC, porém sua especificidade e sensibilidade dependem do antígeno, do protocolo utilizado, do tempo de infecção e da soroconversão (SILVA et al., 2014).

A técnica molecular empregada foi a qPCR de medula óssea, especialmente por proporcionar a avaliação da carga parasitária, viabilizando o monitoramento do tratamento dos cães infectados. A PCR é apontada como uma potente ferramenta no diagnóstico de infecções subclínicas e no complemento de testes sorológicos com diagnósticos inconclusivos. Também é muito versátil, uma vez que diversos tipos de amostras podem ser utilizadas, incluindo aspirados de medula óssea e linfonodos, urina, sangue e *swab* conjuntival.(FERREIRA et al., 2013; SOLCÀ et al., 2014). Entretanto, a sensibilidade pode ser altamente variável dependendo do tipo de amostra e oligonucleotídeos iniciadores (FARIA et al., 2012).

Dos 19 cães positivos no diagnóstico parasitológico, 18 foram positivos no exame citopatológico e um na IHQM. Esse último animal foi negativo em todos os outros métodos diagnósticos empregados (Anexo 1). A amostra da IHQM foi obtida por meio da biópsia de uma lesão de pele no plano nasal do animal, já as amostras do exame citopatológico foram coletadas por meio de punção aspirativa com agulha fina (PAAF), sendo que apenas em um dos cães foi feita coleta dos linfonodos poplíteos, nos 17 restantes foram obtidas amostras de medula óssea. Os exames parasitológicos, apesar da alta especificidade, dependem das habilidades do examinador e da densidade parasitária do tecido avaliado, podendo gerar falsos negativos (SARIDOMICHELAKIS, 2009). A IHQM vem sendo utilizada no diagnóstico da LVC, pois é uma técnica mais sensível que o exame histopatológico corado com hematoxilina-eosina, possibilitando maior contraste entre os parasitos e o tecido do hospedeiro (SANTOS, 2011).

COURTENAY et al. (2002) constataram que quanto maior a carga parasitária de um cão, maior é o grau de infectividade. Do mesmo modo, a presença de sinais clínicos está associada a uma alta titulação de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e a uma maior probabilidade de detectar o DNA do parasita na PCR. Portanto, quanto mais sintomático for o cão, mais fácil será o diagnóstico pelas diferentes técnicas disponíveis.

A sensibilidade das técnicas diagnósticas também pode ser alterada durante o curso da infecção e de acordo com a resposta individual de cada cão. No período que antecede a soroconversão ou o desenvolvimento de sinais clínicos, métodos parasitológicos e técnicas moleculares, como a PCR, provavelmente serão mais sensíveis, visto que consistem na visualização direta do parasito, ao contrário dos testes sorológicos, dependentes da detecção de anticorpos. À medida que a infecção progride, uma parcela dos cães infectados com *L. infantum* torna-se clinicamente doente, com altos títulos de anticorpos e resposta imune celular suprimida, enquanto outros são assintomáticos, dispondo de uma intensa resposta celular sem o desenvolvimento de anticorpos detectáveis (QUINNEL et al., 2001). No Anexo 1, é possível verificar que, com exceção de três animais, todos os outros cães em que a sorologia foi empregada demonstraram um resultado positivo. Esse dado, provavelmente,

está relacionado à associação entre a manifestação dos sinais clínicos e a produção de anticorpos já que, por se tratar de um estudo realizado em serviço veterinário, todos os cães apresentavam algum grau de sintomatologia e, conseqüentemente, deveriam demonstrar uma alta titulação de anticorpos.

A progressão da LVC pode ser associada a diversos fatores, como: aumento da carga parasitária, resposta imune humoral exacerbada e deficiência de resposta celular T específica. A resistência à infecção é mediada por IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF α , citocinas responsáveis por aumentar a eficiência de células fagocíticas e linfócitos citotóxicos (IKEDA, 2004; LEAL, 2013). Com relação ao cão positivo apenas na IHQM, uma resposta imune orientada por essas citocinas pode ter restringido a infecção apenas aos locais da picada do flebotomíneo ou ainda, é possível que mesmo após a disseminação parasitária, a infecção tenha sido revertida e, por isso, o animal não foi sororeagente ou positivo na PCR.

Os valores obtidos (média \pm desvio padrão) a partir das contagens de hemácias (HE), da concentração de hemoglobina (HB), do volume globular (VG) e dos índices hematimétricos — volume corpuscular médio (VCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) — dos casos confirmados e dos casos suspeitos estão expressos na tabela 1. As médias dos dois grupos de cães demonstram anemia, devido à redução dos valores de HE, HB e VG, que pode ser classificada como normocítica normocrômica, uma vez que os valores do VCM e CHCM estão dentro do intervalo de referência. Não houve diferença significativa dos valores analisados nos dois grupos de cães. Na tabela 3, é possível observar que 57% dos cães infectados apresentaram anemia normocítica/normocrômica arregenerativa. Esse achado é compatível com os estudos de CIARAMELA et al. (1997), KOUTINAS et al. (1999), REIS et. al (2006), RIBEIRO et al. (2013) e NICOLATO et al. (2013), em que se observou a ocorrência de anemia em 50 a 70% em cães sintomáticos. A anemia provocada pela LVC é decorrente de diversos fatores, de forma que a anemia da doença crônica (anemia da doença inflamatória) é a causa mais relevante. Entretanto, a patogênese em cães com LVC também inclui outros mecanismos, como redução da síntese de eritropoietina devido à insuficiência renal. Hemorragia, hemólise, hipoplasia ou aplasia da medula

óssea, e diminuição da fluidez lipídica da membrana dos eritrócitos são outras condições que também podem favorecer o desenvolvimento da anemia (PALTRINIERI et al., 2016; MELENDEZ-LAZO et al., 2018).

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos analisados nos grupos de casos confirmados e de casos suspeitos

Parâmetros Analisados	Casos	Casos Confirmados Mediana	Casos	Casos Suspeitos Mediana	Valores de Referência *
	Confirmados Média ± Desvio Padrão		Suspeitos Média ± Desvio Padrão		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	4,6 a ±1,5	4,5	4,2 a ± 1,0	4	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	10,2 a ± 3,3	10	9,5 a ± 2,4	8,5	12-18
VG (%)	30,2 a ± 10,2	29	26,9 a ± 6,1	25,5	37-55
VCM (fL)	65,2 a ± 5,5	65	64,4 a ± 4,2	64	60-77
CHCM (fL)	33,3 a ± 1,8	33	34,1 a ± 1,45	34,1	32-36
Plaquetas	224.396,3 a ± 131.929,3	215.000	196.625 a ± 76.142	171500	200.000-500.000
Leucócitos (x 10 ³)	9,4 a ± 3,6	8,6	6,5 a ± 1,7	6,1	6,0 – 17,0
Bastonetes	0	0	0	0	Raros
Neutrófilos	6877,4 a ± 3109,7	6038,5	4415 b ± 1793,3	3104,1	300.000 - 11.500
Linfócitos	1677,4 a ± 16142	1084	1097 a ± 1158,6	552,5	1.000 - 4800
Monócitos	506,9 a ± 817,8	318	448,1 a ± 264,5	398,5	150 – 1350
Eosinófilos	320,1 a ± 313,1	206	165 a ± 142,3	153,6	100 – 1250
Basófilos	0	0	0	0	Raros

*Fonte: Adaptado de JAIN, (1986).

Valores em uma mesma linha seguidos de letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) pelo teste T.

Apesar da média dos dois grupos de cães estarem dentro dos valores de referência, a mediana dos valores de plaquetas no grupo dos casos suspeitos encontra-se reduzida (Tabela 1). Essa alteração não foi observada nos casos confirmados, provavelmente porque o número de indivíduos deste grupo é consideravelmente maior. Todavia, 41% dos cães do grupo de casos confirmados apresentaram trombocitopenia (Tabela 3). A trombocitopenia leve a moderada é considerada um achado frequente em cães com LVC sem infecções concomitantes, sendo que a presença de anticorpos antiplaquetários nos cães infectados parece ser a principal causa. A formação de imunocomplexos, sequestro esplênico e supressão da medula óssea também são outros fatores que podem estar relacionados. Quando a trombocitopenia é acentuada, outras causas devem ser consideradas, como, por exemplo, a coinfeção com *Ehrlichia canis* (IKEDA, 2004; PALTRINIERI et al., 2016), o que pode ter sido a causa da trombocitopenia nos casos suspeitos.

Com relação ao leucograma, nos dois grupos não foram observadas alterações significativas referentes ao número total de leucócitos. Entretanto, os casos confirmados apresentaram valores absolutos de neutrófilos significativamente maiores que os casos suspeitos ($p > 0,05$). A mediana dos valores absolutos de linfócitos nos casos suspeitos demonstrou-se abaixo dos valores de referência. Nos casos confirmados, essa alteração não foi evidenciada, possivelmente devido à diferença entre o número amostral dos dois grupos. No entanto, 41% dos casos confirmados apresentaram linfopenia (Tabela 3). A linfopenia pode ser decorrente da natureza imunossupressiva da doença, da disfunção da medula óssea ou do aprisionamento leucocitário em diversos tecidos (FARD et al., 2015). Apesar de alguns autores considerarem as alterações leucocitárias achados incomuns da LVC (COSTA-VAL et al., 2007; RIBEIRO et al., 2013), IKEDA et al. (2003) realizaram um estudo retrospectivo das alterações hematológicas em cães infectados, em que se observou tanto a linfocitose quanto a linfopenia. Além disso, NICOLATO et al. (2013) constataram que neutrofilia, eosinopenia, monocitopenia e linfopenia são achados hematológicos associados à LVC. Tais alterações não foram evidenciadas no presente estudo.

Na análise bioquímica, as médias e medianas, em ambos os grupos, demonstraram aumento dos níveis séricos de proteínas totais e globulinas, assim como redução das concentrações de albumina. (Tabela 2). A hiperproteinemia é um dos achados bioquímicos mais relevantes na LVC e está associada à hiperglobulinemia e à hipoalbuminemia. A hiperglobulinemia é decorrente de uma resposta imune humoral policlonal de linfócitos B com produção elevada de anticorpos anti *Leishmania* spp. A hipoalbuminemia pode ser provocada por perdas renais, redirecionamento da síntese proteica para globulinas, doenças hepáticas e desnutrição (DIAS, 2008). Além disso, pode ser ocasionada pelo processo inflamatório, tendo em vista que a albumina é uma proteína de fase aguda negativa (SILVA et al., 2008). MELENDEZ-LAZO et al. (2018) também constataram que hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia são achados frequentes em cães com LVC. FREITAS et al. (2012), em um estudo realizado no Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza, reportaram que 53% dos cães sintomáticos apresentaram hiperproteinemia, 62%, hiperglobulinemia e 58%, hipoalbuminemia. Já neste trabalho, a frequência dessas alterações foi maior, de forma que hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia foram observadas em 70%, 74% e 72% dos cães, respectivamente. (Tabela 3).

As médias dos valores de ALT e FA estavam dentro dos valores de referência, entretanto 20 % dos cães infectados apresentaram ALT elevada e 21%, FA aumentada. As alterações hepáticas ocorrem devido à multiplicação das formas amastigotas no interior dos macrófagos e podem estar relacionadas à evolução da doença (CASTRO et. al., 2012). TORRECILHA et al. (2016) encontraram ALT, AST E FA aumentadas em 31% dos cães infectados, uma frequência maior que o observado neste estudo.

As médias dos valores de uréia apresentaram aumento tanto no grupo dos casos confirmados, como no dos casos suspeitos. Porém, a média dos valores de creatinina estava elevada somente no grupo dos casos suspeitos (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre valores dos parâmetros bioquímicos de ambos os grupos. A deposição de imunocomplexos promove a formação de uma nefropatia proteinúrica, caracterizada por danos tubulares e glomerulares, levando ao desenvolvimento de doença renal crônica (DRC). Os

estágios avançados da DRC são caracterizados por azotemia e podem ser associados à hipertensão arterial sistêmica, ambos os fatores contribuindo para comorbidade em cães com leishmaniose (BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010). Contudo, as determinações da concentração sérica de uréia e creatinina não são sensíveis na detecção de lesões iniciais, por isso a urinálise é um dos primeiros exames de função renal que deve ser realizado (IKEDA, 2004). A análise realizada por RIBEIRO et al. (2013) demonstrou que azotemia foi um achado frequente em cães sintomáticos. FREITAS et al. (2012) também encontraram níveis elevados de ureia em cães sintomáticos, sendo que 45% apresentaram valores de ureia elevados e 17%, de creatinina aumentada. No presente estudo, 28% dos cães apresentaram azotemia (Tabela 3).

Tabela 2 - Achados bioquímicos do grupo de casos confirmados e de casos suspeitos

Parâmetros Analisados	Casos Confirmados	Casos Confirmados Mediana	Casos Suspeitos	Casos Suspeitos Mediana	Valores de Referência*
	Média ± Desvio Padrão		Média ± Desvio Padrão		
Ureia (mg/dL)	96,4 a ± 166,9	40	133,6 a ± 132,7	50,5	21,4-59,92
Creatinina (mg/dL)	1,5 a ± 1,5	0,9	1,9 a ± 2,0	0,9	0,5-1,5
ALT (UI/L)	64,2 a ± 86,40	35	35,6 a ± 30,5	23	21-73
FA (UI/L)	94,6 a ± 93,6	64,5	64,7 a ± 63,9	32	20-156
Proteínas Totais (g/dL)	8,5 a ± 2,0	8,4	8,4 a ± 2,2	9,3	5,4-7,10
Albumina (g/dL)	2,3 a ± 0,7	2,2	1,8 a ± 0,4	1,7	2,6-3,3
Globulina (g/dL)	6,0 a ± 2,3	6,1	6,6 a ± 2	7,3	2,7-4,4

Fonte: Adaptado de KANEKO et al., (1997).

Valores em uma mesma linha seguidos de letras diferentes diferiram ($p < 0,05$) pelo teste T.

Tabela 3 - Principais alterações laboratoriais encontradas no grupo dos casos confirmados.

Principais Alterações	Número de Casos Confirmados (N)	Percentual de Casos Confirmados (%)
Hiperglobulinemia	40	74%
Hipoalbuminemia	39	72%
Hiperproteinemia	38	70%
Anemia Normocítica/Normocrômica	31	57%
Linfopenia	24	44%
Trombocitopenia	22	41%
Azotemia	15	28%
ALT Aumentada	11	20%
FA Aumentada	10	19%

A concordância entre os achados laboratoriais dos dois grupos de cães sugere que os casos suspeitos, possivelmente seriam positivos em outros métodos diagnósticos que fornecessem um diagnóstico definitivo de LVC. GRIMALDI et al. (2012) comprovaram que, apesar da baixa sensibilidade do DPP na detecção de cães assintomáticos, o teste é satisfatório nos casos em que ocorre uma sintomatologia clínica.

Na figura 5, observam-se os principais sinais clínicos encontrados nos casos confirmados. Neste trabalho, as alterações mais frequentes foram as lesões cutâneas, presentes em 78% dos animais. De forma semelhante, TORRECILHA et al. (2016) e ALMEIDA et al. (2005) reportaram essas alterações ocorrendo em frequências de 80% e 75,7%, respectivamente. As alterações dérmicas dos cães com LVC são caracterizadas, principalmente por dermatites esfoliativas, dermatites ulcerativas, dermatites nodulares e onicogribose (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Essas lesões não são necessariamente provocadas por uma resposta inflamatória à presença física de parasitos, pois a pele sem alterações cutâneas também abriga uma grande quantidade de parasitas em cães sintomáticos. (BANETH et al., 2009).

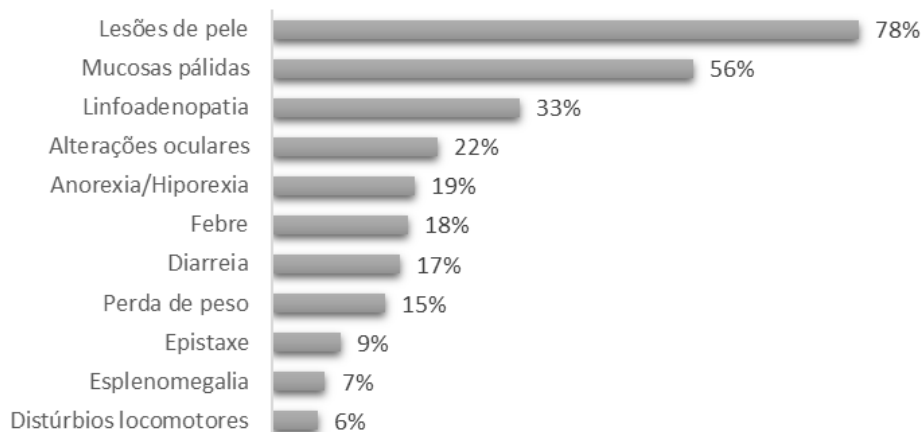


Figura 5 - Distribuição percentual das principais alterações observadas no grupo dos casos confirmados

A palidez de mucosas pode ser considerada uma consequência da anemia severa (SILVA, 2010) e, neste trabalho, ocorreu em 56% dos cães (Figura 5). Similarmente, em um estudo realizado no DF, DIAS (2008) observou mucosas pálidas em 59,3 % dos cães.

A linfadenomegalia, local ou generalizada, é resultado de uma hiperplasia reativa linfóide provocada pela disseminação parasitária (KOUTINAS et al., 1999). BARBOSA et al. (2010) realizaram um inquérito epidemiológico em cães domiciliados de São Luís, no qual verificou-se linfadenopatia localizada em 96 % dos animais. Em contrapartida, neste trabalho, a linfadenopatia ocorreu em apenas 33% dos cães infectados (Figura 5).

As afecções oculares podem ser as primeiras ou únicas alterações aparente da LVC e são decorrentes da infiltração inflamatória granulomatosa e linfoplasmocitária, que envolve diversas estruturas do olho, como conjuntiva, limbo, corpo ciliar, íris, córnea e esclera. A uveíte anterior pode ser considerada a manifestação ocular mais comum da LVC. De importância semelhante, é a ceratoconjuntivite seca, que também pode aparecer como manifestação única em alguns cães infectados (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999). Enquanto DI PIETRO et al. (2016) observaram alterações oculares em 71% dos cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp., CIARAMELLA et al. (1997) evidenciaram uma frequência de apenas 17%. Em concordância com

esse último trabalho, foram observadas alterações oculares em 19% dos cães infectados (Figura 5).

CARRANZA-TAMAYO et al. (2010) concluíram que a LV se tornou endêmica no DF devido a autoctonia de casos humanos, contudo a prevalência da afecção é variável nas diferentes regiões administrativas (RA). HERENIO et al. (2014) calcularam as prevalências da doença em cada RA por meio de dados coletados no Centro de Controle de Zoonoses do DF (CCZDF), constatando as maiores prevalências em Sobradinho (19,3%), no Lago Norte (18,3%), na Fercal (17,3%), no Jardim Botânico (17,2%) e no Lago Sul (8,48%). Corroborando esses resultados, a maior parte dos cães infectados atendidos no HVET- UNB foram procedentes de Sobradinho, Jardim Botânico, Lago Norte e Lago Sul (Tabela 4).

Tabela 4 - Região Administrativa do Distrito Federal dos cães do grupo de casos confirmados.

Região Administrativa	Número de Casos Confirmados (N)	Porcentagem de Casos Confirmados (%)
Sobradinho	15	28%
Lago Norte	7	13%
Jardim Botânico	7	13%
Lago Sul	6	11%
Asa Norte	3	6%
Ceilândia	3	6%
Asa Sul	2	4%
Jardim Mangueiral	2	4%
Águas Claras	1	2%
Águas Lindas	1	2%
Brazlândia	1	2%
Cruzeiro Novo	1	2%
Gama	1	2%
Guará	1	2%

Região Administrativa	Número de Casos Confirmados (N)	Percentagem de Casos Confirmados (%)
Lago Oeste	1	2%
Paranoá	1	2%
Recanto das Emas	1	2%

As idades dos cães infectados variaram de 6 meses a 17 anos completos. De acordo com BELO et al. (2013), a idade dos cães não está associada à infecção, entretanto a alta frequência em cães mais velhos pode ocorrer em virtude do longo período de latência sorológica após a infecção. Da mesma forma, o fato de cães adultos permanecerem por mais tempo no ambiente externo das residências também é um fator que pode contribuir para a infecção. Na tabela 5, é possível observar que 87% dos cães infectados moravam em casas, o que também favorece essa última hipótese.

Com relação ao sexo dos cães, alguns trabalhos, como AMÓRA et al. (2006), observam que número de fêmeas infectadas foi maior, enquanto outros, como os de MEDEIROS et al. (2008) e SEIXAS et al. (2012), identificaram os machos como os mais predispostos à infecção, porém o sexo não parece ser um fator de risco para infecção por *Leishmania* (ALMEIDA et al., 2005). Neste estudo, a proporção de machos e fêmeas no grupo dos cães foi semelhante (Tabela 5). Ademais, os dados relacionados a idade e ao sexo dos cães estão em conformidade com o inquérito epidemiológico realizado por NASCIMENTO et al. (2011) nas RA do Lago Norte e Sobradinho II.

Tabela 5 - Potenciais fatores de risco identificados no grupo dos casos confirmados.

Residência	Casa	47	87%
	Apartamento	7	13%
Sexo	Macho	28	52%
	Fêmea	26	48%
Idade	< 1ano	5	9%
	1 a 7 anos	38	70%
	>7 anos	11	20%

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam como principais alterações: anemia normocítica normocrômica, hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. Merece destaque que os valores de proteínas séricas totais próximos a 8,4 g/dL, em cães com suspeita de infecção por *Leishmania* spp., são um forte indicativo de LVC.

Os sinais clínicos mais frequentes foram as alterações cutâneas (78%), mucosas pálidas (56%), linfadenopatia (33%) e alterações oculares (22%). As Regiões Administrativas com os maiores números de casos foram: Sobradinho (28 %), Jardim Botânico (13%), Lago Norte (13%) e Lago Sul (11%).

. Os cães que residiam em casas (87%) foram mais propensos à infecção, provavelmente devido à maior exposição ao vetor. O sexo e a idade dos cães não representaram fatores de risco à infecção, contudo a grande quantidade de animais adultos (90%) acometidos por essa afecção pode ser explicada tanto pelo longo período de latência sorológica, como pela maior permanência desses animais no ambiente externo das casas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, T. R. **Avaliação clínica e laboratorial de cães domésticos em Itaipuaçu – Maricá, estado do Rio de Janeiro, área de ocorrência de casos de leishmaniose visceral canina**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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

ALVES W.A, BEVILACQUA P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993 – 1997. **Cadernos Saúde Pública**, Rio de Janeiro, V.20 n.1 p.259-65, 2004.

ALMEIDA, A.B.P.F; MENDONÇA, A.J; 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, 2010.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUZA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E. A.; ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 127, p. 227-232, 2005.

AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; DA COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J. ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, 2006.

ARAÚJO, Camila de Melo Costa. **Uso da miltefosina como terapia combinada em Leishmaniose Visceral Canina - relato de caso**. 2018. 11 f. **Trabalho de Conclusão de Residência** (Especialização/ Residência Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

ARRUDA, M. M.; FIGUEIREDO, F. B.; MARCELINP, A. P.; BARBOSA, J. R.; WERNECK, G. L.; NORONHA, E. F.; ROMERO, E.F. Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.111, n.3, p.168-73, 2016.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an

expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.24, n.7, p.324-30, 2008.

BARATA, R. A.; FRANÇA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; SILVA, J. C.; PRATA, A.; LOROSA, E. S.; FIÚZA, J. A.; GONÇALVES, C. M.; PAULA, K. M.; DIAS, E. S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, n.5, v.38, p.421- 425, 2005.

BARBOSA, D. S; et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à Leishmaniose visceral canina em área endêmica no Município de São Luis, Maranhão, Brasil. **Revista Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n.3, p. 653-659, 2010.

BATES, P. A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v.11, n.4, p. 340-4, 2008.

BELO, V. S., STRUCHINER, C. J.; BARBOSA, D. S.; NASCIMENTO, B. W.; HORTA, M. A.; DA SILVA, E. S.; WERNECK, G. L. Risk factors for adverse prognosis and death in American visceral leishmaniasis: a meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, V.8, n.7, p. e2982, 2014.

BELO, V. S., STRUCHINER, C. J.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; DE OLIVEIRA; R. B.; NETO, R. G.; DA SILVA, E. S. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with Leishmania infantum infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, V.195, n.1-2, p.1-13, 2013.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1.ed. Brasília: MS, 2014, 122p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Informativo Epidemiológico Leishmanioses**. Ano 10, nº 4, dezembro de 2018. Disponível em: <<http://www.saude.df.gov.br/wp-conteudo/uploads/2018/05/Informativo-Epidemiol%C3%B3gico-das-Leishmanioses-n%C2%BA-4-2018.pdf>>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários. **Nota Técnica Nº Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, de 1 de setembro de 2016**. Autorização do registro do produto importado Milteforan (princípio ativo Miltefosina) no tratamento de Leishmaniose Visceral Canina

2016. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>. Acesso em: 15 de maio de 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica N° 48/2011, de 19 de setembro de 2011**. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. 2011. Disponível em: <<http://www.saude.ms.gov.br/controle/ShowFile.php?id=113354>> Acesso em: 15 de maio de 2019.

CARDOSO, R. M.; ARAUJO, N. N.; ROMERO, G. A.; SOUZA, T. T.; DIETRICH, A. G.; MENDES, J. D.; REIS, M. L.; FERREIRA, J. B.; HECHT, M. M.; GURGEL-GONÇALVES, R. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**, Londres, v.8, n.1, p.171-179, 2015.

CARRANZA-TAMAYO, C. O.; CARVALHO, M. S. L.; BREDT, A.; BOFIL, M. I. R.; RODRIGUES, R. M. B.; SILVA, A. D.; CORTEZ, S. M. F. C.; ROMERO, G. A. S. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n.4, p. 396-399, 2010.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; DE MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P. G.; PAULA, M. B. C.; DE PAJUABA NETO, A. A.; MEDEIROS, A. A. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, 2012.

CECCARELLI, M.; GALLUZZI, L.; MIGLIAZZO, A.; MAGNANI, M. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. **Public Library of Science One**, São Francisco, v.9, n.2, p.e88845, 2014.

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

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, Londres, v.141, n.21, p.539-43, 1997.

COSTA-PEREIRA, C.; MOREIRA, M. L.; SOARES, R. P.; MARTELETO, B. H.; RIBEIRO, V. M.; FRANÇA-DIAS, M. H.; CARDOSO, L. M.; VIANA, K. F.; GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; ARAÚJO, M. S. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated

against visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, Londres, v.11, n.11, p.92-102, 2015.

COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDRE, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, Londres v.174, n.3, p.636-43, 2007.

COURA-VITAL, W. ; REIS, A.B. ; FAUSTO, M.A.; LEAL, G.G. ; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO M. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. **Public Library of Science One**, São Francisco, v.8, n.8, p.e71833, 2013.

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

DE ALMEIDA F. S.; LEITE R.S.; ITUASSU L.T.; ALMEIDA G.G.; SOUZA D.M.; FUJIWARA, R.T; DE ANDRADE, A. S. R.; MELO, M. N. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 6, n. 4, p. e1596, 2012.

DI PIETRO, S.; BOSCO, V.R.F.; CRINÒ, C.; FRANCAVIGLIA, F.; GIUDICE, E. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary World**, Rajkot, V. 9, n.6, p. 633-637, 2016

DIAS, C. A. **Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no Distrito Federal**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FARCA, A. M., MINISCALCO, B., BADINO, P., ODORE, R., MONTICELLI, P., TRISCIUOGGIO, A., & FERROGLIO, E. Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, Berlim, v. 110, n. 6, p. 2509–2513, 2012.

FARD, R. M.; HEIDARPOUR, M.; SHOJAEI, A.; ZAEEMI, M.; JAVDANI, G.; GOLSHAH, H. A case report of typical leishmaniasis in dog. **Journal of Parasitic Diseases**, Lucknow, v. 39, n. 2, p. 339–341, 2015.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Belém, v.3, n.2, p.47-57, 2012.

- FERREIRA, S. A.; ALMEIDA, G.G; SILVA, S.O.; VOGAS, G.P.; FUJIWARA, R.T.; DE ANDRADE, A. S.; MELO, M.N. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 7, n. 4, p. e2150, 2013.
- FREITAS, J. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; NETO, B. E. L.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.45, n.1, p.24-29, 2012.
- GRIMALDI, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS C. B.; PINTO I. S.; 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.106, p. 54–59, 2012.
- GUERRA, G. M.; FERNANDES, N. C. C. D. A.; KIMURA, L. M.; SHIRATA, N. K.; MAGNO J. A; ABRANTES, M. F; FERNANDES, K. R.; SILVA, M. M. R.; BARBOSA, J. E. D. R.; TANIGUCHI, H. H.; HIRAMOTO, R. M.; NONOGAKI, S.; TOLEZANO, J. E. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. **Revista do Instituto Adolfo Luiz**, São Paulo, v. 75, p. 1686, 2012.
- HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, C. H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.27, n.9, p.403-409, 2011.
- HERENIO, E. M.; FORTES, R. C.; RINCON, G. R. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, São Paulo v.32, n.2, 2014.
- IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba - SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, v.8, n.47, p.42-48, 2003.
- IKEDA, Fabiana Augusta. **Avaliação hematológica, bioquímica e parasitológica de cães, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, submetidos a diferentes protocolos de tratamento**. 2004. 180 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

- JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 1221.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego:Academic, 1997. 932p
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, n.8, p.604-615, 2011.
- KOUTINAS, A. F., POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **The Journal of the American Animal Hospital Association**, South Bend, V.35, n.5, p. 376-383, 1999.
- KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary pathology**, Nova York, v.51, n.2, p.527-38, 2014.
- LEAL G. G. A. **Biomarcadores de resistência e suscetibilidade à Leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) infantum provenientes de Área Endêmica**. 2013. 110f. Tese (mestrado em imunobiologia de protozoários) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W A.; SOUSA-GOMES, M. L. D.; SENA, JOANA M. D.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n.12, p.2941-2947, 2008.
- MANNA, L.; CORSO, L.; GALIER, G.; CERRONE, A.; MUZZI, P.; GRAVINO, A. E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, Londres, v.8, n.1, p. 289-298, 2015.
- MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in veterinary science**, Oxford, v.123, p.261-272, 2019.
- MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD L.; CHARREL, R.N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**, Oxford, v.27, n.2, p.123-147, 2013.
- MEDEIROS, C.F.O.; MELO, A.G.C., LIMA, A.K.F; SILVA, I.N.G.; OLIVEIRA, L.C; SILVA, M.C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal** V.18, n.1, p.33-40, 2008.

MELLENDEZ-LAZO, A., ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; PASTOR, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in veterinary Science**, Londres, V.117, n.1, p.18-27, 2018.

MELO, S.N.; TEIXEIRA-NETO, R.G.; WERNECK, G.L.; STRUCHINER, C.J.; RIBEIRO, R.A.N.; SOUSA, L.R.; DE MELO, M.O.G.; CARVALHO JÚNIOR, C.G.; PENAFORTE, K.M.; MANHANI, M.N.; AQUINO, V.V.; SILVA, E.S.; BELO V.S. Prevalence of visceral leishmaniasis in A population of free-roaming dogs as determined by multiple sampling efforts: A longitudinal study analyzing the effectiveness of euthanasia. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdam, v.161, p.19-24, 2018.

MENDONÇA, I. L.; BATISTA, J. F.; SCHALLIG, H2; CRUZ, M. D. S. P. E.; ALONSO, D. P.; RIBOLLA, P. E. M. ; COSTA, D. L. ; COSTA, C. H. N. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 59, p. e39, 2017

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. Brasil, Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. cap.7, pg.41-46.

MICHELIN, A. F.; MACIEL, M. O. S.; OKAJIMA, M.; NUNES, C. M.; PERRI, S. H. V.; BONFIETTI, L. X. Factors associated with positivity for canine visceral leishmaniasis in an endemic area in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Amsterdam, v.12, p.13-16, 2018.

MIRÓ, G.; OLIVA G.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C.; MORTARINO, M.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. **Veterinary dermatology**, Oxford, v.20, n.5-6, p.397-404, 2009.

MOREIRA, E. D.; SOUZA, V. M.; SREENIVASAN, M.; NASCIMENTO, E. G.; CARVALHO L. P. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.122, n.4, p. 245–252, 2004.

MORENO, J.; VOULDOUKIS I.; SCHREIBER P.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D.; GUEGUEN, S.; CUISINIER, A. M. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.158, n.3-4, p.199–207, 2014

NASCIMENTO, G. S. M. **Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina nas Regiões Administrativas Lago Norte e Sobradinho II do Distrito Federal – DF**. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia.

NICOLATO, R.D.C.; DE ABREU, R. T.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, L. E.; CARVALHO, M.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, V.8, n.12, p. e82947, 2013.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M. F.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E. F.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.153, n.1-2, p.19-23, 2008.

OLIVA, G.; ROURA, X.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; CASTAGNARO, M.; GRADONI, L.; LUBAS, G.; PALTRINIERI, S.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.236, n.11, p.1192-1198, 2010.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, 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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v.236, n.11, p.1184-1191, 2010.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary clinical pathology**, Columbia, V.45, n.4, p.552-578, 2016.

PARADIES, P.; SASANELLI, M.; DE CAPRARIIS, D.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; LIA, R.P.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The veterinary journal**, Londres v. 186, n. 3, p. 370-373, 2010.

PESSOA, E. S. R.; VAITKEVICIUS-ANTÃO, V.; DE ANDRADE, T.A.S.; DE OLIVEIRA SILVA, A.C.; DE OLIVEIRA, G.A.; TRAJANO-SILVA, L.A.M.; NAKASONE, E.K.N.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental parasitology**, Nova York, v. 199, p. 9-16, 2019.

PRIOLO, V.; ORELLANA, P. M.; PENNISI, M. G.; MASUCCI, M.; PRANDI, D.; IPPOLITO, D.; BRUNO, F.; CASTELLI, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmania infantum-specific IFN-gamma production in stimulated blood from cats living in areas where canine leishmaniasis is endemic. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 12, n. 1, p. 133-142, 2019.

PROVERBIO, D.; SPADA, E.; BAGNAGATTI DE GIORGI, G.; PEREGO, R.; VALENA, E. Relationship between Leishmania IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. **BioMed research international**, Nova York, v.2014, n.412808, 2014.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J, SHAW, M.A, DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, Londres v.122, p.53-61, 2001

REGO, F. D.; RUGANI, J.M.; SHIMABUKURO, P.H.; TONELLI, G.B.; QUARESMA, P.F.; GONTIJO, C.M. Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriaba Indigenous Reserve, Brazil. **Public Library of Science One**, São Francisco, v.10, n.4, p.e0122038, 2015.

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

RIBEIRO, C. R. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão no 34 Distrito Federal-DF, Brasil.** 2007a. 63f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RIBEIRO, R. R. DA SILVA, S. M.; FULGÊNCIO, G.D.O.; MICHALICK, M.S.; FRÉZARD, F.J. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 373-378, 2013.

RIBEIRO, V.M. **Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle.** **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.12, n.71, p.66-76, 2007b.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v.5, p.272, 2014.

ROCH, I.; OFRI, R.; BANETH, G. Epistaxis and Retinal Bleeding in Dog with Visceral Leishmaniosis Concurrent Epistaxis, Retinal Bleeding and Hypercoagulability in Dog with Visceral Leishmaniosis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. Israel, v. 72 p. 39-48, 2017.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v.4, n.1, p.e584, 2010.

SANTOS, I. B. **Comparação Entre A Citopatologia, Histopatologia, Imunocitoquímica e Imuno-Histoquímica em Diferentes Amostras**

Biológicas 46 no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2011.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary dermatology**, Oxford, v.20, n.5-6, p.471-89, 2009.

SCHUBACH, E. Y. P.; FIGUEIREDO, F. B.; ROMERO, G. A. S. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.108, n.9, p.568-574, 2014.

SEIXAS, M.M; JUNIOR MAGALHÃES, J.T.; FRANKEB, C.R; BARROUIN-MELO, S. M. positividade para leishmaniose visceral canina: existem fatores caninos que contribuem? **Revista Baiana de Saúde Pública**. Salvador, v.36, n.2, p.358-367, 2012.

SILVA, D. A.; MADEIRA MDE, F.; FIGUEIREDO, F. B. GEOGRAPHICAL EXPANSION OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL. **Revista Instituto Médico Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.57, n.5, p.435-438, 2015.

SILVA, D. T. D.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.179-186, 2014.

SILVA, F. T. S; SANTO J. T; MARTINS NETTO, ED; BAVIA, ME; NAKATANI, MARIA; SOUZA, F. D. P; CARDIM, L. L.; CARNEIRO, D. D. M. T. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina no distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Revista baiana saúde pública**, Salvador, v.34, n.4, p.783-795, 2010.

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, V.1, n. 1, p. 20, 2007

SILVA, R.; LOPES A.; FARIA, R. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica **Revista Médica de Minas Gerais**. Belo Horizonte, V.18, p. 116-122, 2008.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracelular molecules as a drug target. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.40, n.2, p.139-149, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, Londres, v.4, n.1, p.86-102, 2011.

SOLCÀ, M. S. **Uso de PCR no diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma abordagem comparativa de diferentes protocolos e tecidos.** 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador.

SOLCÀ, M.D.A.; BASTOS, L.A.; GUEDES, C.E.; BORDONI, M., BORJA, L.S., LARANJEIRA, D.F; DA SILVA ESTRELA; TUY, P.G, AMORIM, LD; NASCIMENTO, E.G; DE SÁ OLIVEIRA, G.G; DOS-SANTOS W.L; FRAGA, D.B; VERAS P.S. Evaluating the Accuracy of Molecular Diagnostic Testing for Canine Visceral Leishmaniasis Using Latent Class Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

SOUZA, C. F.; BORGES, M. A. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) in Timoteo, Minas Gerais State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 6, p.1454-1455, 2008.

SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, Londres, v.9, n.1, p.277-292, 2016.

TEDLA, D. G.; BARIAGABR, F. H.; ABREHA, H. H. Incidence and Trends of Leishmaniasis and Its Risk Factors in Ethiopia, Western Tigray. **The Journal of Parasitology Research**, Berlim, v.3, p.1-9, 2018.

TORRECILHA, R. B. P.; UTSUNOMIYA, Y. T.; BOSCO, A. M; ALMEIDA, B. F.; PEREIRA, P. P.; NARCISO, L. G.; PEREIRA, D. C. M.; BAPTISTIOLLI, L.; CALVO-BADO, L.; COURTENAY, O., NUNES, C. M; CIARLIN, P. C. I. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdã, V.132, p.83-87, 2016.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v.12, n.1, p.e0006082, 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Global Health Observatory Data – Leishmaniasis [online], 2014. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 15 de maio de 2019.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 70 f. Tese (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2006.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. INTRODUÇÃO

Para concluir o curso de Medicina Veterinária, no último semestre, os alunos da Universidade de Brasília (UnB) devem cursar a disciplina Estágio Curricular Supervisionado, com carga horária de 480 horas. É responsabilidade do aluno escolher o local do estágio de acordo com a sua área de interesse.

A primeira etapa do estágio foi realizada no Laboratório de Análises Veterinárias (LAVET), sob a supervisão da médica veterinária Wanessa Aparecida Carlos. O início foi no dia 13 de março de 2019 e o término, no dia 26 de abril de 2019, totalizando 264 horas. A segunda etapa, que teve início no dia 29 de abril de 2019 e término no dia 13 de junho de 2019 – totalizando 216 horas -, ocorreu no laboratório de Patologia clínica do Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVET) da UnB, sob supervisão da professora Giane Regina Paludo, das residentes e das técnicas do laboratório.

2. PRIMEIRA ETAPA

2.1 Estrutura Física:

O LAVET possui estrutura, equipamentos e reagentes necessários para: realização de hemogramas, contagem de reticulócitos, pesquisas de hemoparasita, análises bioquímicas, urinálises, análises de derrames cavitários e líquido, exames diretos de fezes e pesquisas de sarnas, de fungos e de bactérias em raspados de pele e em citologias auriculares. Os principais equipamentos necessários para a realização desses exames são: dois contadores hematológicos (ABX Micros ESV 60; Vet abc animal blood conter), uma centrífuga Micro Hematócrito (MH Celm), dois analisadores bioquímicos semiautomáticos (Bioplus Bio 2000) e cinco microscópios (3 Olympus CX40; Olympus BX41; Olympus CH20; 1 Leica DM500).

2.2 Atividades Desenvolvidas

As atividades desenvolvidas pela estagiária foram divididas em: Pia, processamento de amostras, microscopia e bioquímicos.

Pia: Nessa área, era atribuída à estagiária a função de realizar a coloração das lâminas de esfregaço sanguíneo no Panótico e a coloração dos raspados de pele na coloração de Gram. Para a pesquisa de sarnas, os raspados de pele e as citologias auriculares eram processados com óleo de imersão. Além disso, ficava a cargo da estagiária o processamento das amostras de urina e fezes.

Processamento de amostras: a estagiária estava responsável por verificar a identificação das amostras e analisar a ocorrência de hemodiluição, de fibrina ou de coágulos. Posteriormente, eram feitas as lâminas de esfregaço sanguíneo e o preenchimento dos capilares para a leitura do volume globular (VG) e das proteínas séricas totais (PPT).

Microscopia: Nesse setor, era realizado leitura das lâminas de esfregaço sanguíneo, sedimentoscopia das urinas, análises de derrames cavitários e líquido, pesquisas de parasitos nas fezes e pesquisas de sarnas, fungos ou bactérias nos raspados de pele.

Bioquímico: Nessa função, a estagiária teve a oportunidade de compreender o funcionamento do Analisador Bioquímico semiautomático Bioplus 200 e os procedimentos necessários para as diferentes análises bioquímicas.

2.3 Exames Realizados

Não foi possível realizar um levantamento do número de exames realizados durante o período do estágio pois o sistema operacional não disponibilizava essa informação.

3. SEGUNDA ETAPA

3.1 Estrutura Física

O Laboratório de Patologia Clínica do HVET é encarregado de realizar os exames laboratoriais, tanto do setor de pequenos e grandes animais, quanto

do setor de silvestres. Os exames incluem hemogramas, contagem de reticulócitos, pesquisas de hemoparasitas, análises bioquímicas, urinálises, assim como análises de derrames cavitários e líquido. Além disso, existe um outro setor destinado aos exames moleculares.

Os principais equipamentos utilizados na realização desses exames incluem: 6 microscópios (2 Olympus CX40; Olympus BX41; Olympus CH20; 2 Leica DM500), 2 contadores hematológicos (ABX Micros ESV 60; Vet abc animal blood conter), uma centrífuga de tubos (Hettich Zentrifugen – EBA20), uma centrífuga de Microhematócrito (Quimis), uma centrífuga citológica (CIENTEC) 2000D), um analisador bioquímico automático (Cobas C111) e dois analisadores bioquímicos semiautomáticos (Bioplus Bio 2000).

3.2 Atividades Desenvolvidas

As atividades desenvolvidas pela estagiária foram divididas em: bancada, microscopia, bioquímico e volante.

Bancada: Nesse setor, a estagiária estava encarregada de receber as amostras, verificando sua identificação e a presença de fibrinas ou coágulos. Posteriormente, as amostras adequadas para o processamento (sem coágulos) eram registradas na ata e identificadas com número da rotina. Na presença de fibrina, era necessário fazer diluições para as contagens manuais na câmara de newbauer. Para diluição de hemácias utilizava-se 10 µl de sangue para 2000 µl de líquido de Hayen, já na diluição de leucócitos, 10 µl de sangue para 200 µl de líquido de Turk. A determinação da concentração da hemoglobina era efetuada com o auxílio de um analisador bioquímico, na proporção de 10 µl de sangue para 2500 µl de líquido de Drabkin. Quando os animais estavam anêmicos, também era feita a diluição de reticulócitos, com 50 µl de sangue e 50 µl de azul de metileno. A contagem de hemácias, leucócitos e trombócitos de aves e répteis era realizada com a solução de Natt e Herrick, na proporção 10 µl de sangue para 2000 µl de diluente. A estagiária também era encarregada de fazer os esfregaços sanguíneos, corá-los com o panótico e fazer a leitura do VG e PPT com o auxílio do refratômetro.

Microscopia: Nessa função, a estagiária pode compreender as alterações morfológicas das hemácias, a diferenciação de leucócitos, a contagem de reticulócitos, a contagem de plaquetas e a contagem manual (na câmara de newbauer) de hemácias e leucócitos de mamíferos, aves e reptéis. Também foi possível observar a presença de hemoparasitos, como *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Haemogregarina* spp.

Bioquímico: A estagiária pôde acompanhar as atividades realizadas pelas residentes e pela técnica do laboratório, o que possibilitou o entendimento do analisador bioquímico automático Cobas C111.

Volante: A estagiária teve a oportunidade de efetuar o processamento e a sedimentoscopia das urinas, assim como a análise de derrames cavitário e líquido. Além disso, também foi possível acompanhar a realização de testes de compatibilidade.

3.3 Exames realizados

No laboratório de Patologia Clínica do HVET, do dia 29 de abril de 2019 até o dia 13 de junho, foram realizados 4.978 exames. Os quadros 1 e 2 demonstram, respectivamente, o tipo de exame efetuado e a espécie avaliada.

Quadro 1 - Exames realizados no laboratório de Patologia Clínica do HVET durante o período do estágio

Exame	Quantidade
Hemograma	602
Pesquisa de Hemoparasitas	79
Contagem de Reticulócitos	53
Fibrinogênio	12
Bioquímicos	4022
Eletrólitos	38
Urinalise	154
Derrames Cavitários	10
Testes de Compatibilidade	24
Líquor	9

Quadro 2 - Quantidade de espécies analisadas durante o período do estágio

Espécie	Quantidade
Cão	438
Gato	160
Ruminantes	15
Equinos	7
Aves	62
Reptéis	9
Outros Mamíferos	34

4. Conclusão

O estágio, nos dois locais, foi de extrema importância, principalmente pela oportunidade de aplicação prática de conceitos teóricos vistos durante a graduação. Por meio dessas experiências, a estagiária pôde se familiarizar com o ambiente de trabalho em que desejava se inserir, confirmando a vontade de permanecer apreendendo cada vez mais sobre a patologia clínica.

Anexo - Quadro 1- Resultados dos exames de cada cão de acordo com o prontuário do HVET-UNB. O símbolo (+) representa o resultado positivo, o (-) significa que o resultado foi negativo e o número 0 indica que o teste não foi realizado

ANEXOS

Prontuário	DPP	Sorologia	PCR	Citopatológico	Imunohistoquímica
133763	0	+	+	-	0
135882	+	0	0	0	0
135654	+	0	0	0	0
135419	0	+	-	0	0
135542	0	0	+	+	0
135516	0	0	+	+	0
135695	+	+	0	0	0
135672	0	+	+	+	0
135478	0	+	0	-	0
135083	0	+	+	+	0
135133	0	+	+	+	0
135189	+	0	0	0	0
135385	0	+	0	0	0
135419	0	+	+	-	0
135337	0	+	0	0	0
135464	0	+	-	-	0
134960	0	+	0	0	0
134792	0	+	0	+	0
134864	0	+	0	0	0
134307	0	+	0	0	0
134151	0	+	0	0	0
132725	0	+	-	0	0
132754	0	-	-	-	+

134314	0	0	+	0	0
134534	0	0	0	+	0
134565	0	0	+	+	0
132821	0	0	+	0	0
132807	0	0	+	+	0
132877	0	+	+	0	0
132415	0	+	0	+	0
133942	0	+	0	0	0
133906	+	+	0	+	0
133730	+	+	0	0	0
133738	0	+	-	-	0
133353	+	0	0	0	0
133118	0	+	0	0	0
133067	0	+	0	0	0
132941	+	+	0	+	0
132980	0	+	0	+	0
132680	0	+	0	+	0
132904	0	+	0	-	0
132915	+	0	0	0	0
132579	0	0	+	0	0
135589	0	0	+	0	0
135438	0	+	0	0	0
134787	0	+	+	0	0
135920	0	+	+	-	0
132328	+	0	0	0	0
132833	+	0	0	0	0
135559	0	+	+	0	0
134926	0	+	0	0	0
133334	0	+	0	0	0
134396	0	+	+	+	0

133810	0	+	+	0	0
134653	0	+	+	-	0
134954	-	0	+	0	0
135581	0	0	0	+	0
135045	+	0	+	+	0
132821	0	+	+	-	0
132419	0	-	+	0	0
135906	+	0	0	-	0
135936	0	-	+	+	0
Total de +	13	39	25	18	1