



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



IX CURSO DE MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA

**ACTUALIZAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE
LEISHMANIOSE CANINA NOS CONCELHOS DE
SETÚBAL E PALMELA**

ANA TERESA SEVERINO CALDEIRA REISINHO

2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**ACTUALIZAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE
LEISHMANIOSE CANINA NOS CONCELHOS DE
SETÚBAL E PALMELA**

ANA TERESA SEVERINO CALDEIRA REISINHO

Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

Orientador: Professora Doutora Lenea Campino

2010

Agradecimentos

Tenho de começar por agradecer à Professora Doutora Lenea Campino, orientadora de todo o trabalho. A ela devo toda a organização e estruturação desta tese e a paciência para esclarecer e solucionar todas as dúvidas e entraves que se apresentaram ao longo do processo.

Ainda no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, a todas as pessoas da Unidade de Leishmanioses que me auxiliaram quer na pesquisa bibliográfica, quer na realização da parte prática laboratorial: Doutora Sofia Cortes, Doutora Carla Maia, bolsista Mónica Marques e os técnicos José Cristóvão e João Ramada. Também à Doutora Teresa Carreira da Unidade de Leptospirose, sem a qual algumas reacções de PCR não teriam sido realizadas, e ao Doutor Bruno de Sousa, do Departamento de Estatística, pela ajuda inestimável no tratamento estatístico dos dados.

Na clínica veterinária VetSet, a todas as colegas, pelo companheirismo e o auxílio impagável na realização das colheitas: Dr. Cristina Costa, Dr. Vanda Santos, Dr. Ana Lanita, Dr. Ana Maurício, Dr. Carolina Gomes e as auxiliares, Glória Rosa e Ana Cristina Rafael. Também aos proprietários dos cães que participaram na realização deste projecto.

Às voluntárias da Associação Sobreviver, pela disponibilidade e ajuda na realização das colheitas aos cães a que dão abrigo.

Por fim, não posso deixar de dar uma palavra de agradecimento à minha família, que tem sido um pilar de apoio constante ao longo de todo o meu percurso académico.

Índice geral

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	11
Objectivos	26
Materiais e métodos	27
Área do estudo.....	27
Colheita das amostras biológicas	28
Teste de aglutinação directa (DAT)	30
Material.....	30
Procedimento	30
Contra-immunoelectroforese (CIE).....	32
Material.....	32
Procedimento	32
Imunofluorescência indirecta (IFI).....	34
Material.....	34
Procedimento	35
Reacção em cadeia da polimerase (PCR).....	36
Extracção de DNA – material e reagentes	36
Extracção de DNA – procedimento	36
Reacção de PCR – material e reagentes	37
Reacção de PCR – procedimento	38

Electroforese dos produtos amplificados.....	40
Tratamento estatístico dos resultados.....	41
Resultados.....	42
Questionários.....	42
Teste de aglutinação directa (DAT).....	46
Reacção em cadeia da polimerase (PCR).....	47
Provas adicionais.....	48
Testes estatísticos.....	53
Discussão.....	55
Conclusões.....	62
Referências bibliográficas.....	63

Índice de figuras

Figura 1 - Lesões dermatológicas	15
Figura 2 - Onicogribose	15
Figura 3 - Questionário preenchido para cada canídeo envolvido no estudo.	28
Figura 4 - Papel de filtro com amostra de sangue.....	36
Figura 5 - Tubo Eppendorf com papel de filtro para extração de DNA.....	36
Figura 6 – Reacção de aglutinação directa em microplaca.....	46
Figura 7 - Resultados após electroforese dos produtos da reacção de PCR	47
Figura 8 – Contra-immunoelectroforese.....	48
Figura 9 - Citologia de medula óssea.....	51
Figura 10 - Gel de electroforese - amostras de sangue periférico e medula óssea.	52

Índice de quadros

Quadro I- Sinais clínicos observados na leishmaniose canina.....	15
Quadro II – Métodos de PCR e sequências alvo.....	38
Quadro III - Solução de reacção das PCR utilizadas	39
Quadro IV - Condições de amplificação para as PCR utilizadas.....	39
Quadro V - Proveniência dos canídeos da Clínica.....	43
Quadro VI - Resumo dos resultados dos questionários realizados no estudo.....	45
Quadro VII - Resultados dos testes realizados aos soros positivos ou duvidosos	50
Quadro VIII - Resultados obtidos nos testes de regressão linear.....	54

Resumo

A leishmaniose constitui uma das doenças tropicais mais negligenciadas em todo o Mundo. Na região Mediterrânica, a doença na forma visceral atinge preferencialmente crianças com idade inferior a três anos e adultos imunocomprometidos. É causada por protozoários da espécie *Leishmania infantum*. O cão é considerado o principal reservatório peridoméstico para a infecção humana, conferindo grande importância a esta zoonose em termos de Saúde Pública. A leishmaniose também possui elevada importância em Medicina Veterinária, por causar doença grave no cão. Não obstante, embora a infecção por *Leishmania infantum* esteja amplamente difundida na população canina das áreas endémicas, apenas uma fracção destes cães desenvolve doença clínica.

O diagnóstico e tratamento precoces da leishmaniose canina são essenciais, quer para controlar a expansão da doença, quer como parte integrante de um sistema de controlo da leishmaniose visceral humana zoonótica. Estudos realizados na Península de Setúbal na década de 1980 estabeleceram a seroprevalência da doença na população canina em 11,5% (Abranches *et al*, 1983). Outro estudo, realizado na região de Lisboa entre Dezembro de 2002 e Dezembro de 2003, estimou a prevalência da infecção por *L. infantum* em 18,4% nos cães domésticos e 21,6% nos cães sem dono (Cortes *et al*, 2007).

Neste trabalho foi efectuada uma actualização da prevalência de leishmaniose canina nos Concelhos de Palmela e Setúbal. Realizaram-se colheitas de sangue periférico a uma amostra aleatória constituída por dois grupos de cães: 100 que se apresentaram à consulta a uma clínica veterinária localizada em Palmela (representando cães com dono) e 83 cães abrigados por uma associação de defesa de animais, situada em Setúbal (considerados sem dono). O rastreio serológico foi efectuado com recurso ao teste de aglutinação directa e os soros com resultados positivos naquela reacção foram também analisados por contra-immunoelectroforese e imunofluorescência indirecta. Também

foi feita pesquisa parasitológica por PCR no sangue periférico. Determinou-se a seroprevalência total de leishmaniose de 7,1%, para a população canina estudada (5% no grupo de cães da clínica e 9,6% para o grupo de cães da associação). Utilizando o teste de qui-quadrado, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Foi preenchido um questionário no acto da colheita das amostras biológicas, para avaliar a importância de determinados factores (género, porte, proveniência, tipo de *habitat*, uso de repelentes do vector e co-habitação com outros cães) envolvidos na infecção. Embora os testes aplicados sugerissem algumas tendências, nenhum dos parâmetros avaliados se revelou como factor de risco de forma estatisticamente significativa.

Abstract

Leishmaniasis is one of the most neglected tropical diseases worldwide. In the Mediterranean Region, the disease, in the visceral form, is most important in children under three years old and immunocompromised adults. It is caused by a protozoan of the species *Leishmania infantum*. The dog is considered the main peridomestic reservoir for the human infection, which makes canine leishmaniasis a very important zoonosis as far as Public Health is concerned. Canine leishmaniasis is also highly important in Veterinary Medicine, because it can cause severe disease in canines. Nevertheless, although *L. infantum* infection is widely distributed in the canine population living in endemic regions, only a small proportion of these dogs will develop clinical disease.

Early diagnosis and treatment of canine leishmaniasis are essential to control the spread of the disease and as part of a zoonotic human visceral leishmaniasis control system. In the 1980's, studies developed at the Setúbal's Peninsula established the seroprevalence of canine leishmaniasis at 11,5% (Abranches *et al*, 1983). In another study, developed in Lisbon area between December 2002 and December 2003, determined the prevalence of canine infection by *Leishmania infantum* as 18,4% for domestic dogs and 21,6% for stray dogs (Cortes *et al*, 2007).

In the present study, the author intended to perform an update in the prevalence of canine leishmaniasis in Setúbal and Palmela regions. Blood was sampled from a random sample made of a hundred dogs that attended a veterinary practice in Palmela (representing dogs with owner), and 83 dogs from an animals' shelter, located in Setúbal (considered stray dogs). The serum was used to perform direct agglutination test for leishmaniasis. Samples with positive results in this test were also analyzed through counter-immunoelectrophoresis and indirect immunofluorescence test. Polymerase chain reaction was also performed in peripheral blood samples. Total seroprevalence was 7,1% for the studied population (5% for the group of dogs from the veterinary practice and 9,6% for the group of dogs from the shelter). Based on chi-square test, there are no statistical

significant differences between the studied samples. A quiz was filled, by the time of biological sample collection that allowed the author to evaluate the impact of some factors (such as origin, habitat, application of insecticides effective against the vector of the disease and living with other dogs) involved in this infection process. Although the tests suggested a few tendencies, none of the studied subjects proved to be a risk factor in a statistically significant manner.

Introdução

A doença causada por protozoários do género *Leishmania* constitui uma das doenças tropicais mais negligenciadas. Estima-se em doze milhões o número de pessoas infectadas, sendo registados anualmente dois milhões de novos casos de leishmaniose humana em todo o Mundo. O número de indivíduos considerados em risco de contrair a infecção está avaliado em 350 milhões (Alvar *et al*, 2008). Estes valores tornam a leishmaniose na terceira doença transmitida por vectores mais importante, após a malária e as filarioses linfáticas (Solano-Gallego *et al*, 2009). Na Europa Meridional, o agente é da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicole, 1908, que causa leishmaniose cutânea e visceral. Esta forma clínica ocorre preferencialmente em crianças com idade inferior a 3 anos e em adultos imunocomprometidos (Campino, 1991; Farrel, 2002).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico/peridoméstico para a infecção do Homem, o que confere a esta zoonose uma marcada importância em termos de Saúde Pública. Na verdade, sob o ponto de vista meramente epidemiológico, alguns autores afirmam que a leishmaniose canina reveste-se de maior importância que a doença humana (de Freitas *et al*, 2006). A leishmaniose canina é endémica em mais de 70 países da Europa Meridional, África, Ásia e América Central e do Sul (Solano-Gallego e Baneth, 2008). O número de cães infectados na região sudoeste da Europa está estimado em 2,5 milhões (Baneth *et al*, 2008), num universo de sete milhões de cães considerados em risco de contrair a parasitose nesta região (Maia *et al*, 2009). Em Portugal, um estudo realizado na região de Lisboa, entre Dezembro 2002 e Dezembro 2003, estimou a prevalência da infecção por *L. infantum* em 18,4% nos cães domésticos e 21,6% nos cães sem dono (Cortes *et al*, 2007). Estudos anteriores (Abranches *et al*, 1983) realizados na península de Setúbal haviam estabelecido a seroprevalência de leishmaniose canina em 11,5%. Têm sido realizados diversos estudos para avaliar o risco representado pela infecção canina para a população humana da região. Os resultados obtidos revelam que:

- Aumentos na prevalência de leishmaniose canina estão associados a aumentos na incidência da doença nos humanos;
- Baixas condições socioeconómicas constituem factores de risco para a associação entre a infecção canina e a humana;
- A elevada densidade da população canina e a posse de cães infectados podem constituir factores de risco para a leishmaniose humana infantil (Solano-Gallego e Baneth, 2008).

No entanto, apesar de ser consensual a relação directa entre a prevalência de leishmaniose nas populações humana e canina, na prática tem sido difícil demonstrá-la. Apenas foi possível estabelecer relação entre a posse de cães infectados e a infecção humana num estudo desenvolvido no Irão por Gavvani *et al* (2002). Estes autores realizaram testes serológicos e parasitológicos a crianças com idade inferior a 10 anos e a cães, com e sem dono, habitantes de uma região endémica para a infecção por *L. infantum*. Verificaram que a seroprevalência da infecção nas crianças era significativamente mais elevada: nas localidades com maiores populações caninas, em localidades com rácios cão/ humano mais elevados e em habitações onde havia um cão. Deste modo, estabeleceram a posse de cães como factor de risco para a infecção humana por *Leishmania infantum* naquela região do Irão. Na Europa, os estudos realizados não permitem estabelecer este tipo de relação, pelo que se considera que a presença dum cão infectado na habitação não aumenta o risco de infecção por este parasita para os proprietários que vivam em regiões endémicas (Solano-Gallego *et al*, 2009).

A ausência de associação entre a detenção de um cão portador de *Leishmania infantum* e a doença humana está, provavelmente, relacionada com as características do ciclo biológico do protozoário.

O parasita *Leishmania* é bifásico, completando o seu ciclo de vida em dois hospedeiros:

- Um mamífero, no qual desenvolve a forma amastigota intra-celular, em células do sistema mononuclear fagocitário;

- Um insecto, da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. No hospedeiro invertebrado, o protozoário adquire a forma promastigota extra-celular (Solano-Gallego *et al*, 2009; de Freitas *et al*, 2005). Na Europa, o principal vector de *L. infantum* é da espécie *Phlebotomus perniciosus* (Miró *et al*, 2007), embora a infecção também possa ser transmitida por flebótomos da espécie *Phlebotomus ariasi*, naquela região (Solano-Gallego *et al*, 2009).

Há registo de algumas formas de transmissão não vectorial de *Leishmania* entre cães, nomeadamente a transmissão venérea (Silva *et al*, 2009), por transfusão sanguínea (de Freitas *et al*, 2006) e, potencialmente, transmissão vertical (Rosypal *et al*, 2005). No entanto, é provável que o impacto destas formas de transmissão seja muito limitado em termos de epidemiologia e da infecção nas regiões endémicas, face à importância da transmissão vectorial do parasita (Solano-Gallego *et al*, 2009).

Considerando a inoculação através da picada do insecto vector a principal forma de transmissão de *L. infantum* entre cães e para o Homem, tem sido estudada a aplicação de agentes insecticidas ou repelentes (coleiras impregnadas com deltametrina e associações de permetrina com imidaclopride para aplicação tópica por unção punctiforme), como forma de controlar a transmissão da infecção, quer no seio da população canina, quer em relação à comunidade humana co-habitante dos canídeos tratados (Miró *et al*, 2007; Mazioumi Gavgani *et al*, 2002). Ambas as formulações provaram ser eficazes na prevenção da picada do flebótomo vector (Miró *et al*, 2007).

A leishmaniose canina tem elevada importância em Medicina Veterinária e é uma das principais zoonoses a nível mundial, causando doença grave no cão (Solano-Gallego *et al*, 2009). Embora a infecção por *L. infantum* esteja amplamente difundida na população canina das áreas endémicas, apenas uma pequena fracção destes animais desenvolve doença clínica (Baneth *et al*, 2008). De facto, a leishmaniose canina pode ser associada a um vasto espectro de respostas imunes e manifestações clínicas. Nos dois pólos deste espectro observam-se:

- Imunidade protectora, mediada por células T;
- Susceptibilidade à doença multissistémica grave, associada a uma produção marcada de anticorpos não protectores e uma imunidade celular deprimida ou reduzida (Solano-Gallego *et al*, 2008).

Na leishmaniose canina, a diferença entre infecção e doença tem sido evidenciada em numerosos trabalhos, nomeadamente, mediante o recurso a técnicas de diagnóstico molecular (Baneth *et al*, 2008). De facto, vários estudos realizados na região Mediterrânica revelam que os cães seropositivos representam apenas uma fracção dos cães efectivamente infectados, uma vez que é possível detectar a presença de DNA parasitário em amostras biológicas obtidas a partir de cães seronegativos para *L. infantum* (Maia *et al*, 2006; Solano-Gallego e Baneth, 2008). Apesar de a prevalência de infecção poder atingir valores elevados, a prevalência de doença clínica nas regiões endémicas é, por regra, inferior a 10% (Solano-Gallego *et al*, 2009).

O diagnóstico de leishmaniose canina é complexo, devido a:

- Elevada percentagem de animais infectados assintomáticos, ou com infecção subclínica;
- Grande diversidade de achados clínicos nos cães doentes (Blavier *et al*, 2001);
- Existência de numerosas doenças (infecciosas e auto-imunes) caracterizadas por achados clínicos semelhantes (Solano-Gallego e Baneth, 2008).

A leishmaniose canina é uma doença sistémica, na qual é possível o envolvimento de qualquer órgão, tecido e/ou fluido biológico do cão infectado. Na forma clássica da doença, os achados clínicos incluem: lesões cutâneas (alopécia, descamação furfurácea, ulceração a nível das proeminências ósseas, lesões nodulares ou papulares – Fig.1), linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, anorexia, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia associadas a falência renal crónica, lesões oculares (conjuntivite, blefarite, uveíte anterior e queratoconjuntivite), epistaxis, onicogribose (Fig.2), claudicação, vómito e/ou

diarreia (Maia e Campino, 2008). A frequência destes achados clínicos é variável entre os cães doentes (Quadro I).



Figura 1 - Lesões dermatológicas (cão inserido no estudo)



Figura 2 - Onicogribose (cão inserido no estudo)

Quadro I- Sinais clínicos observados na leishmaniose canina (adaptado de Baneth *et al*, 2008)

Sinal clínico	Porcentagem de cães sintomáticos
Falência renal crônica	78 – 91%
Linfadenomegalia	62 – 90%
Lesões cutâneas	81 – 89%
Alterações oculares	16 – 81%
Esplenomegalia	10 – 53%
Caquexia	10 – 48%
Alterações músculo-esqueléticas	45%
Onicogribose	20 – 31%
Epistaxis	6 – 10%

Estes sinais clínicos podem surgir isoladamente ou em associação de dois ou mais. Ocasionalmente, observam-se formas clínicas atípicas na leishmaniose canina (Blavier *et al*, 2001). As alterações associadas a estas formas clínicas raras incluem lesões nas mucosas (nódulos, úlceras), poliartrite erosiva e não erosiva, lesões ósseas osteolíticas ou osteoproliferativas, hepatite crónica, colite crónica recorrente, doença neurológica, miosite ou polimiosite e doença cardiovascular – pericardite, vasculite sistémica, tromboembolismo e síndrome de hiperviscosidade sérica (Blavier *et al*, 2001; Solano-Gallego *et al*, 2009).

O diagnóstico e tratamento precoces da leishmaniose canina são essenciais, quer para controlar a expansão da doença, quer como parte integrante dum sistema de controlo da leishmaniose visceral humana zoonótica (Maia e Campino, 2008). Apesar do desenvolvimento de diversas técnicas de diagnóstico parasitológico, serológico e molecular, a identificação da infecção canina por *L. infantum* continua a constituir um desafio pela diversidade de apresentações clínicas possíveis para a doença, bem como pela elevada percentagem de portadores assintomáticos do parasita (Baneth e Aroch, 2008). A identificação destes últimos tem importância em termos do controlo da doença, uma vez que se comprovou também serem infectantes para o vector, embora em menor grau que os cães sintomáticos para a infecção (Noli, 1999; Maia e Campino, 2008). Deste modo, um diagnóstico fidedigno de leishmaniose canina exige uma abordagem integrada, que inclua dados obtidos na história pregressa, exame físico, perfil analítico de rotina e testes laboratoriais específicos que proporcionem evidência directa ou indirecta da infecção.

As provas laboratoriais disponíveis para o diagnóstico de leishmaniose canina incluem:

- O exame microscópico de amostras obtidas por biopsia ou punção aspirativa, para pesquisa da presença de formas amastigota de *L. infantum*;
- Testes serológicos, para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes (dos quais foram utilizados neste estudo o teste de aglutinação directa, a contra-immunoelectroforese e a imunofluorescência indirecta);

- Técnicas moleculares para demonstração da presença de DNA parasitário nos tecidos (Baneth e Aroch, 2008; Solano-Gallego *et al*, 2009).

É possível efectuar um diagnóstico conclusivo de leishmaniose mediante a observação de formas amastigota de *Leishmania* em esfregaços obtidos por punção de medula óssea, linfonodo, pele, baço ou, ocasionalmente, em amostras de fluidos orgânicos – sangue periférico, líquido sinovial, fluido cérebro-espinhal ou líquido ascítico (Maia e Campino, 2008; Solano-Gallego e Baneth, 2008). Embora o diagnóstico citológico proporcione resultados rápidos, apresenta baixos valores de sensibilidade (60 – 75% para os esfregaços de medula óssea, 30 – 50% para os de linfonodo – Maia e Campino, 2008) e especificidade, inclusivamente em pacientes com doença clínica declarada, devido à presença de pequeno número de formas parasitárias nos tecidos (Baneth e Aroch, 2008). Por esta razão, diversos autores consideram que o exame microscópico não é útil para a detecção de *Leishmania* em cães portadores assintomáticos. Os esfregaços são corados pelo método de Giemsa, de Leishman ou de Wright modificado (Maia e Campino, 2008; Solano-Gallego e Baneth, 2008). As formas amastigota do parasita podem surgir em posição extra-celular ou no interior de monócitos, macrófagos ou neutrófilos do hospedeiro mamífero. Têm forma oval ou redonda, com 2 a 4 µm de diâmetro. O citoplasma observa-se corado de azul claro e o núcleo, proporcionalmente grande, cora de vermelho. O cinetoplasto surge na forma duma pequena estrutura com forma de bastonete, em localização perpendicular ao núcleo, e também corada de vermelho (Maia e Campino, 2008).

Têm sido desenvolvidos diversos métodos de diagnóstico serológico de leishmaniose canina, como sejam os testes de imunofluorescência indirecta, ELISA, aglutinação directa, *western blotting*, contra-immunoelectroforese e dispositivos imunocromatográficos para diagnóstico rápido (Miró *et al*, 2008). Embora o diagnóstico serológico seja aplicado frequentemente, a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* subestima a taxa de infecção da população canina das regiões endémicas (Maia e Campino, 2008). O facto está relacionado com a resposta imune à infecção por *Leishmania*, na qual

uma resposta humoral marcada indica falha no controlo da infecção (Baneth *et al*, 2008). Assim, enquanto a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* é possível em 88 – 100% dos cães sintomáticos, a seropositividade só é evidente em 30 a 60% dos indivíduos assintomáticos (Miró *et al*, 2008), dado que a produção de anticorpos é baixa, durante a fase inicial da infecção por *L. infantum* (Maia e Campino, 2008). Alguns autores justificam a seronegatividade observada numa fase avançada da doença pela imunodepressão associada à infecção (Ikonomopoulos *et al*, 2003). Por outro lado, a mera detecção de anticorpos anti-*Leishmania* não é suficiente para estabelecer um diagnóstico conclusivo de leishmaniose canina. A seropositividade pode ser confirmada mediante a realização de mais de um método de diagnóstico serológico e da repetição dos testes num intervalo de três meses (Maia e Campino, 2008). Na região Mediterrânica, é possível ocorrerem resultados falso positivos na serologia, por reacção cruzada com pacientes infectados por *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis* ou *Rickettsia* sp. (Gomes *et al*, 2008; Maia e Campino, 2008). Não obstante as limitações apresentadas pela serologia, diversos autores salientam a importância da aplicação destes métodos de diagnóstico por rotina, no âmbito de inquéritos epidemiológicos, para avaliar a transmissão de *L. infantum* num determinado território, uma vez que os canídeos podem ser usados como sentinela para a avaliação do risco de transmissão de leishmaniose a segmentos mais susceptíveis da população humana, nomeadamente indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (Scalone *et al*, 2002).

A contra-immunoelectroforese (CIE) foi aplicada pela primeira vez no diagnóstico de leishmaniose visceral humana por Barbosa *et al*. em 1973. Este método serológico qualitativo associa a electroforese à imunodifusão (Campino, 1991). Utiliza um suporte na forma de gel de agar tamponado, sobre o qual é colocado o antigénio (com carga eléctrica negativa) e a amostra de soro a analisar. O sistema é submetido a uma corrente eléctrica e o ponto de ligação dos complexos imunes é visualizado na forma de um ou mais arcos de precipitação, que traduzem um resultado positivo (Campino, 1991; Maia e Campino, 2008). A técnica tem a vantagem de apresentar uma

execução rápida, usando equipamento simples e pouco dispendioso. É adequada para aplicação em inquéritos epidemiológicos ou para diagnóstico de leishmaniose em laboratórios de pequenas dimensões (Maia e Campino, 2008). A contra-immunoelectroforese proporciona resultados estatisticamente idênticos ao método adoptado como referência para o diagnóstico serológico desta infecção: a imunofluorescência indirecta (Campino, 1991). Os valores de sensibilidade e especificidade da técnica são elevados. Num estudo realizado em 143 cães provenientes de canis municipais, foram obtidos, para esta técnica de diagnóstico, valores de sensibilidade e especificidade de 85,4% e 94,7%, respectivamente, usando a cultura como método de referência (Maia *et al*, 2009). No entanto, um estudo realizado em 1988 por Mancianti e Meciani verificou que a sensibilidade é superior nos cães clinicamente doentes (96,1%) em relação aos portadores assintomáticos do parasita (72,7%). Do mesmo modo, a especificidade varia entre 100% para os cães saudáveis e 90,5% nos cães com outros processos patológicos (Maia e Campino, 2008).

O teste de imunofluorescência indirecta (IFI) é considerado por muitos autores o método de referência para o diagnóstico serológico da leishmaniose canina. É um método semi-quantitativo, que tem aplicação em inquéritos epidemiológicos, no diagnóstico clínico e para monitorização da terapêutica (Maia e Campino, 2008). A técnica baseia-se na detecção da ligação de anticorpos presentes no soro do paciente ao antígeno do teste, mediante o uso dum anticorpo anti-immunoglobulina da espécie em estudo (neste caso, canina), que foi previamente marcado com um fluorocromo. A visualização do resultado é efectuada com recurso a um microscópio de luz ultravioleta. Para o diagnóstico de leishmaniose, utiliza-se a totalidade do parasita (forma promastigota ou amastigota) como antígeno. São consideradas positivas as amostras em que se observa uma fluorescência verde homogénea. Caso se observem áreas avermelhadas, a amostra é considerada negativa. O soro do paciente é submetido a diluições seriadas e o resultado é dado pela mais alta diluição em que é possível observar uma reacção positiva. Este valor designa-se título de anticorpos. O valor a partir do qual se considera que o paciente está infectado designa-se título

limite, ou valor crítico do teste, e deverá ser determinado pelo laboratório que o realiza (Campino, 1991; Maia e Campino, 2008). A imunofluorescência indirecta foi desenvolvida por Waller e Coons, em 1954, e aplicada pela primeira vez ao diagnóstico de leishmaniose visceral humana em 1963, por Oddo e Cascio (revisto por Campino, 1991). A realização de diluições seriadas dos soros e a necessidade de utilizar material específico e dispendioso (em particular o microscópio de iluminação ultra-violeta) limita a aplicação da imunofluorescência indirecta quando se pretende analisar um grande número de amostras, como é o caso dos inquéritos epidemiológicos. Os valores reportados para a sensibilidade desta prova variam entre 21,6 e 100% (Maia e Campino, 2008). A especificidade varia entre 52 e 100% (Campino, 1991; Ferreira *et al*, 2007). O antigénio utilizado para a realização das provas de imunofluorescência indirecta pode ser obtido a partir duma suspensão de formas promastigota presentes em meios de cultura, ou de formas amastigota retiradas de tecidos de vertebrados infectados (Campino, 1991). O uso de formas amastigota proporciona uma prova de imunofluorescência indirecta mais sensível para a detecção de indivíduos com títulos baixos de anticorpos, mantendo o mesmo nível de especificidade (Maia e Campino, 2008). Deste modo, é possível realizar um diagnóstico serológico mais precoce, em cães assintomáticos. A técnica de imunofluorescência indirecta que utiliza formas amastigota como antigénio provou ser comparável à que utiliza formas promastigota, em termos de monitorização da evolução clínica dos cães infectados e dos pacientes submetidos a terapêutica (Fernández-Perez *et al*, 1999).

Outro método de diagnóstico serológico de leishmaniose canina é o teste de aglutinação directa (DAT), desenvolvido por Allain e Kagan (1975) e modificado posteriormente por Harith *et al*, em 1988 (revisto por Meredith *et al*, 1995). O teste utiliza como antigénio formas promastigota de *Leishmania donovani*, liofilizadas ou em suspensão aquosa, coradas pelo azul de Coomassie (Maia e Campino, 2008; Meredith *et al*, 1995). São realizadas diluições seriadas do soro em análise em placas de microtitulação com poços de fundo cónico. Na presença de anticorpos anti-*Leishmania*, os imunocomplexos formam uma rede, que se observa macroscopicamente numa tonalidade azul

difusa, ocupando todo o fundo do poço. Nos soros negativos, o antigénio corado precipita no vértice do fundo cónico, o que se observa na forma duma pequena mancha azul intensa (Meredith *et al*, 1995; Schallig *et al*, 2002). A prova é de execução simples e o desenvolvimento dum antigénio liofilizado torna-a adequada para aplicação sob condições ambientais rigorosas, sem exigir acesso à refrigeração. Como inconvenientes, registam-se um período de incubação longo (18 horas) e a necessidade de proceder a diluições seriadas das amostras, tornando a DAT laboriosa e pouco adequada para a testagem dum número elevado de soros (Maia e Campino, 2008; Schallig *et al*, 2002). Para contornar estas desvantagens, foi desenvolvida uma adaptação da técnica, que utiliza uma única diluição do soro e possui um período de incubação de apenas três horas. Esta adaptação do teste de aglutinação directa, designada FAST (*fast agglutination screening test*), permite testar um grande número de amostras num curto espaço de tempo, mantendo valores elevados de sensibilidade e especificidade. A elevada sensibilidade da FAST (93,6%) torna a técnica adequada à realização de inquéritos epidemiológicos, à testagem no âmbito de programas de controlo da leishmaniose canina e ao despiste da infecção em bancos de sangue (Schallig *et al*, 2002). No que respeita à realização de estudos epidemiológicos, alguns autores advogam o uso inicial da FAST, como teste preliminar qualitativo para o despiste da infecção, seguido da realização do teste de aglutinação directa (DAT), como prova quantitativa e forma de confirmar os resultados do teste inicial. Esta abordagem é justificada por uma especificidade da FAST inferior à da DAT (respectivamente 89,0% e 96,7%), o que corresponde ao aparecimento de um maior número de resultados falso positivos na técnica rápida (Cardoso *et al*, 2004; Schallig *et al*, 2002). Ferreira *et al*. (2007) efectuaram um estudo comparativo das provas de imunofluorescência indirecta, ELISA e aglutinação directa para o diagnóstico de leishmaniose canina e recomendam esta última para o diagnóstico serológico da doença; estes autores justificam-no por a DAT apresentar valores de reprodutibilidade (0,92), sensibilidade (93%) e especificidade (95%) superiores à

imunofluorescência indirecta (respectivamente, 0,72, 72% e 52%), que é a prova mais utilizada por rotina para o diagnóstico clínico de leishmaniose canina.

As dificuldades apresentadas pelo diagnóstico clínico e laboratorial da leishmaniose canina têm levado ao desenvolvimento de numerosas metodologias para a pesquisa de DNA parasitário em diversas amostras biológicas. Vários autores têm desenvolvido protocolos de PCR (*polymerase chain reaction*) convencional, *nested* e em tempo real, usando *primers* dirigidos ao DNA do cinetoplasto, bem como a diferentes sequências de DNA genómico, de que são exemplo regiões intragénicas (ITS) e o gene que codifica para a subunidade pequena de RNA ribossomal (18SrRNA) (Francino *et al*, 2006; Pilatti *et al*, 2009). Estas técnicas podem ser aplicadas a sangue total, camada flogística (*buffy coat*), medula óssea, linfonodo, pele e conjuntiva palpebral. Mais raramente, também podem utilizar-se amostras de baço, fígado, pulmão, coração, órgãos genitais masculino e feminino, sémen, placenta, rim, intestino, leite e urina (Maia e Campino, 2008; Solano-Gallego *et al*, 2001). A eficácia da reacção de PCR para o diagnóstico de leishmaniose canina é função de diversos factores, entre os quais se destacam os *primers* utilizados, o número de cópias da sequência alvo no genoma do parasita, o protocolo de extracção de DNA, a amostra biológica utilizada e o protocolo de PCR utilizado (Maia e Campino, 2008).

No que diz respeito à sequência-alvo da reacção de PCR, os protocolos baseados no DNA do cinetoplasto apresentam uma sensibilidade superior (Cortes *et al*, 2004; Pilatti *et al*, 2009). O genoma de *L. infantum* é constituído por 36 cromossomas (Reale *et al*, 1999). Adicionalmente, o parasita apresenta material genético mitocondrial, condensado numa estrutura que se designa cinetoplasto. Trata-se duma molécula de DNA circular (conhecida pela designação kDNA), que representa cerca de 20% do material genético de *L. infantum*. O kDNA está organizado numa rede de milhares de pequenos discos interligados (designados minicírculos), que constituem até 95% da sua estrutura. Cada minicírculo de kDNA de *Leishmania* spp. possui uma região conservada, com 120 a 200 pares de bases, e uma região variável. A primeira apresenta três zonas altamente

conservadas, que podem ser utilizadas como alvos para a reacção de PCR, inclusivamente para discriminar grupos de *Leishmania* spp. (Gomes *et al*, 2008). A superioridade das técnicas baseadas em kDNA deve-se à presença de cerca de dez mil minicírculos por parasita, enquanto as sequências-alvo dos protocolos baseados no gene que codifica para a 18SrRNA ou as regiões intragénicas possuem cerca de 200 cópias por parasita (Cortes *et al*, 2004; Pilatti *et al*, 2009).

Considerando um mesmo protocolo de reacção de PCR, grupos de trabalho diferentes apresentam valores díspares de sensibilidade para esta técnica. O facto pode ser justificado pela distribuição heterogénea das formas parasitárias em cada tecido, ou por a carga parasitária em cada órgão ser influenciada pelo tropismo de cada estirpe de *Leishmania* e a resposta imune local (Maia e Campino, 2008). De facto, os resultados desta prova podem ser diferentes para um mesmo animal, usando como amostra tecidos diferentes. Por exemplo, num estudo realizado em 100 cães da Ilha de Maiorca, a prevalência da infecção por *Leishmania infantum* determinada por PCR foi de 17,8% em biopsia de medula óssea, 32% em conjuntiva ocular e 51% em pele (Solano-Gallego *et al*, 2001). Vários autores têm desenvolvido protocolos de PCR sensíveis, usando amostras obtidas de forma minimamente invasiva, de modo a fomentar o acompanhamento e monitorização da eficácia terapêutica na prática clínica (Lachaud *et al*, 2002). Entre estas, encontram-se as amostras obtidas por zaragatoa conjuntival em cães infectados, que provaram ser adequadas para a detecção de DNA de *Leishmania infantum* (Ferreira *et al*, 2008; Strauss-Ayali *et al*, 2004). Em alguns estudos, a PCR aplicada a amostras obtidas por zaragatoa de ambas as conjuntivas constituiu uma prova mais sensível que a PCR aplicada a amostras de sangue periférico, para o diagnóstico de leishmaniose canina (Ferreira *et al*, 2008). Strauss-Ayali *et al* (2004) obtiveram valores de 92% para a sensibilidade e 100% para a especificidade desta prova, utilizando amostras obtidas em 98 canídeos com infecção natural e experimental.

Na infecção do cão por *L. infantum*, não é conhecida a duração, constância nem intensidade da parasitemia. Pensa-se que estas possam ser razões para os frequentes resultados negativos nos testes

de PCR realizados em sangue total, especialmente em pacientes assintomáticos (Maia e Campino, 2008). No entanto, dada a facilidade de acesso a esta amostra biológica na prática clínica, vários investigadores têm-na utilizado para estabelecer um protocolo sensível e exequível para o diagnóstico de leishmaniose canina (Lachaud *et al*, 2002; Maia *et al*, 2006; Reale *et al*, 1999; Silva *et al*, 2001; Strauss-Ayali *et al*, 2004). Os resultados obtidos nestes estudos nem sempre são coincidentes. Por exemplo, Lachaud *et al* utilizaram a camada flogística obtida por centrifugação de 4,5 ml de sangue periférico e compararam seis protocolos de PCR. Foi possível detectar a presença de DNA parasitário em 100% dos pacientes sintomáticos e/ou seropositivos, usando protocolos baseados em kDNA. Por outro lado, só foram obtidos resultados positivos em 62% destes indivíduos, usando protocolos dirigidos ao DNA genómico (Lachaud *et al*, 2002). Outros trabalhos foram aplicados a amostras de sangue periférico conservado em papel de filtro. Em cães com serologia positiva, foram obtidos testes de PCR positivos em 17% das amostras biológicas usando DNA genómico – ITS1 (Strauss-Ayali *et al*, 2004), e em 81,1%, usando kDNA (Maia *et al*, 2006). Apesar da falta de consenso nos resultados obtidos, a aplicação da técnica de PCR a amostras de sangue periférico colhidas em papel de filtro apresenta como vantagens:

- Tratar-se de um método de colheita minimamente invasivo;
- Uso de um pequeno volume de sangue;
- Possibilidade de envio da amostra para um laboratório distante;
- Uso de material biológico colhido anteriormente e de conservação fácil, à temperatura ambiente ou sob refrigeração, a + 4°C, durante até 36 semanas (Maia *et al*, 2006).

Actualmente, diversos autores recomendam o recurso à reacção de PCR como complemento aos dados obtidos no exame clínico e serológico dos canídeos, em particular nas situações cuja serologia apresenta resultados duvidosos ou em caso de anergia, bem como para detectar eventuais reacções cruzadas na serologia (Reale *et al*, 1999; Solano-Gallego *et al*, 2009). Mais recentemente, têm sido desenvolvidos métodos de PCR quantitativo em tempo real para a detecção de DNA de

Leishmania spp. Esta técnica apresenta uma sensibilidade superior à da PCR convencional – possibilita a detecção de até 0,2 parasitas/ml de amostra, em contraste com a técnica convencional, que apresenta um limite de detecção de 30 parasitas/ml de amostra (Francino *et al*, 2006). Deste modo, diversos autores recomendam o recurso a técnica de PCR quantitativo em tempo real, quer para distinguir indivíduos infectados assintomáticos dos clinicamente doentes, quer como método auxiliar na monitorização da evolução clínica e da eficácia terapêutica dos pacientes (Francino *et al*, 2006; Solano-Gallego *et al*, 2009).

Objectivos

Objectivo geral: determinar a prevalência de leishmaniose na população canina da área em estudo (Concelhos de Setúbal e Palmela), recorrendo à aplicação de técnicas serológicas (teste de aglutinação directa, contra-immunoelectroforese e imunofluorescência indirecta) e métodos moleculares (PCR clássico em amostras de sangue periférico). O valor determinado baseia-se nos resultados obtidos em dois grupos de canídeos: cães com dono, assistidos numa clínica veterinária situada em Palmela e Setúbal (grupo designado por “Clínica”), e cães acolhidos por uma associação de defesa de animais, localizada em Setúbal (grupo que recebeu a designação “Associação”).

Outros objectivos:

- Avaliar se há diferença na prevalência da doença entre os dois grupos de cães em estudo;
- Determinar potenciais factores de risco para a infecção, tais como:
 - Género;
 - Peso;
 - Pelagem;
 - Local onde o cão foi adquirido;
 - Convivência com outros cães;
 - Uso de agentes repelentes do vector (piretróides);
 - Habitat (interior/exterior);
 - Presença de sinais clínicos de doença.

Materiais e métodos

Área do estudo

O trabalho foi realizado com canídeos oriundos dos Concelhos de Setúbal e Palmela. Representa uma área geográfica de 630 km², com 167 mil habitantes. De acordo com os dados fornecidos pela Divisão de Identificação Animal, Registo e Licenciamento de Explorações, da Divisão Geral de Veterinária, estão registados 1789 cães no Concelho de Setúbal e 2465 no de Palmela. No entanto, sabe-se que uma grande maioria dos proprietários não procede ao registo dos canídeos. Assim, uma estimativa mais realista do número de cães existentes na área em estudo (dada por uma média de um cão por cada quatro habitantes) será de aproximadamente 41,75 mil.

Tomando como referência os valores de dimensão da amostra usados no inquérito nacional efectuado no ano de 2009 pelo Observatório Nacional para a Leishmaniose, foi considerada adequada uma amostra aleatória constituída por 100 cães assistidos na clínica veterinária “VetSet” (grupo designado “Clínica”) e 83 cães abrigados por uma associação de defesa de animais, situada em Setúbal (grupo de cães designado “Associação”).

Colheita das amostras biológicas

Procedeu-se à colheita de amostras de sangue periférico a 100 cães, com idade superior a um ano, seleccionados aleatoriamente entre os animais que foram observados na clínica “VetSet” (grupo designado “Clínica”) em Palmela e Setúbal, entre os meses de Agosto e Dezembro, 2009 e a 83 cães existentes numa associação de defesa de animais, sita em Setúbal, no mesmo período de tempo (grupo designado “Associação”). As amostras biológicas receberam o código V1 a V100, para as colheitas efectuadas na clínica, e S1 a S83 para as amostras biológicas obtidas em cães da associação. A colheita de sangue até 2 ml foi realizada na veia cefálica, veia safena lateral ou jugular. Parte da amostra foi conservada em papel de filtro *Whatmann* nº3 e o restante foi colocado em tubo seco, para a obtenção de soro por centrifugação (1500 rotações por minuto, durante 10 minutos). As amostras foram congeladas até à sua utilização.

Para cada canídeo, foi preenchido um questionário com informação relativa ao resenho do animal, local onde foi adquirido (designado “aquisição), *habitat*, aplicação de agentes insecticidas e/ou repelentes do vector, e outros dados considerados relevantes (Fig. 3).


	IX CURSO DE Mestrado em Parasitologia Médica INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA	VetSet
Nome do Proprietário: Morada: Código Postal: Telefone: _____ Data da colheita: _____		
Nome do Cão: _____ Sexo: _____ Data de Nascimento: _____ Raça: _____ Peso: _____ Cor: _____ Pelagem: <u>curta</u> média longa lisa ondulada cerdosa		
Aquisição: rua criador particular outro: Uso de anti-parasitário externo: Qual? _____ Frequência da aplicação: _____ Habitat: interior misto só exterior-canil só exterior-quintal Coabitação com outros cães: sim não Deslocações: em Portugal..... Não estrangeiro Sinais clínicos: ausentes dermatológicos linfadenomegalia viscerais Conhecimento da doença pelo proprietário: sim não		

Figura 3 - Questionário preenchido para cada canídeo envolvido no estudo.

O soro foi utilizado para realização de teste de aglutinação directa. Os soros com resultados positivos para esta prova foram submetidos a contra-immunoelectroforese, re-congelados e posteriormente submetidos a imunofluorescência indirecta. Os três cães da clínica com serologia positiva, que não estavam a ser submetidos a terapêutica para leishmaniose canina, foram sujeitos a punção medular e zaragatoa de conjuntiva palpebral. Com cada amostra de medula óssea procedeu-se a preparação em esfregaço e observação microscópica. A restante amostra biológica foi conservada em papel de filtro para posterior extracção de DNA e realização de PCR, utilizando *primers* dirigidos a diferentes localizações do genoma do parasita: minicírculos de kDNA (designado método DNA cinetoplastideal – Vortes *et al*, 2004), gene que codifica para a subunidade pequena de RNA ribossomal (com a designação método 18SrRNA – Van Eys *et al*, 1992) e região não codificante transcrita, situada entre os genes que codificam para as subunidades grande e pequena de RNA ribossomal (designado método ITS – El Tai *et al*, 2000). Procedeu-se igualmente a extracção de DNA das amostras biológicas de conjuntiva palpebral, para realização de PCR. Nos cães seropositivos da associação não foi possível realizar a colheita de amostras de medula óssea nem conjuntiva palpebral, por o espaço disponível não reunir condições que permitissem a realização do procedimento com segurança para humanos e cães envolvidos.

O sangue periférico conservado em papel de filtro foi utilizado para extracção de DNA e reacção de PCR, utilizando *primers* dirigidos aos minicírculos de kDNA. Dois cães da associação com serologia negativa apresentaram reacção de PCR positiva no sangue periférico. A estes canídeos, procedeu-se a uma segunda colheita de sangue periférico (em Fevereiro, 2010), para repetição de todas as provas serológicas e moleculares.

Teste de aglutinação directa (DAT)

Material

- Amostras de soro de canídeo, após descongelação;
- Placa de microtitulação, com poços de fundo cónico (Grenier 96k, V-form, 651101);
- Pipeta multicanal (2 – 200 µl);
- Micropipeta (1 – 10 µl);
- Ponteiras plásticas para micropipeta;
- Líquido de diluição – soro fisiológico (NaCl 0,9%) contendo 0,2 M 2-mercaptoetanol;
- Antígeno de *Leishmania donovani* (MHOM/SD/68/15) liofilizado (KIT Biomedical Reseach, Amsterdam), contendo 5×10^7 promastigotas/ml após a reconstituição;
- Pipeta de vidro graduada, de 5ml;
- Estufa de incubação.

Procedimento

- Utilizando a pipeta multicanal, colocaram-se 192 µl de líquido de diluição na primeira coluna da placa de microtitulação;
- Colocaram-se 50 µl de líquido de diluição nos poços das restantes colunas;
- Usou-se a primeira linha como “Controlo do antígeno”, na qual não foi colocado nenhum soro;
- A segunda linha foi usada como controlo positivo; colocou-se 8 µl de um soro positivo no primeiro poço;
- A terceira linha foi usada como controlo negativo, na qual se colocaram 8 µl de um soro negativo no primeiro poço;

- Nas linhas restantes, adicionaram-se 8 μl de soro de canídeo a cada poço da primeira coluna (diluição 1:25);
- Usando a pipeta multicanal, transferiram-se 50 μl do conteúdo da primeira coluna para a segunda (diluição 1:50). Misturou-se três vezes e transferiu-se 50 μl da segunda para a terceira. Procedeu-se desta forma até a sexta coluna (diluição 1:800). Na última coluna, descartaram-se 50 μl ;
- Incubou-se a placa tapada, em estufa a 37°C, durante uma hora;
- Adicionaram-se 5 ml de soro fisiológico ao antigénio liofilizado, de modo a obter uma suspensão com 5×10^7 promastigotas de *L. donovani* (MHOM/SD/68/15)/ml. A suspensão foi deixada em repouso durante 5 minutos, à temperatura ambiente, antes de ser utilizada;
- Adicionaram-se 50 μl da suspensão de antigénio a cada poço;
- Incubou-se a microplaca à temperatura ambiente durante 18 horas, numa superfície plana e horizontal;
- Observaram-se os resultados contra uma superfície branca. Consideraram-se positivos os poços cujo fundo apresentava uma coloração azul difusa e negativos aqueles que apresentavam um pequeno ponto compacto, azul forte, no vértice do fundo cónico.

Contra-immunoelectroforese (CIE)

Material

- Alimentador de corrente (Sebia GD61E);
- Tina de electroforese (Sebia);
- Tiras de acetato de celulose gelificado (Cellogel) com 14 cm x 5,7 cm x 200 μ m;
- Suporte para as tiras de acetato de celulose (Sebia);
- Tinas para coloração e para descoloração;
- Soro fisiológico (NaCl 0,9%);
- Tampão barbital 0,08 mol/l, pH 8,2 (16 g barbital sódico – Merck + 1000 ml água destilada + 20 ml ácido clorídrico N);
- Solução de azul brilhante de Coomassie (5 g azul brilhante de Coomassie –Sigma + 1000 ml solução descolorante);
- Solução descolorante (500 ml metanol p.a. + 400 ml água destilada + 100 ml ácido acético glacial p.a.);
- Solução fixadora (50 ml ácido acético glacial + 1000 ml água destilada);
- Antígeno solúvel de concentração proteica 0,5 mg/ml, diluído 1:2;
- Amostras de soro de canídeo.

Procedimento

- Imergiram-se as tiras de acetato de celulose em tampão, durante a noite, a + 4°C;
- As tiras de acetato de celulose foram secas entre duas folhas de papel de filtro e colocadas em suportes;
- Colocaram-se os suportes na tina contendo tampão;

- Colocou-se 15 μ l de soro no lado do ânodo e 15 μ l de antigénio no lado do cátodo, linearmente, a uma distância de 1,5 cm. Foram colocados dois soros por tira;
- Em cada ensaio, utilizou-se um soro de controlo positivo e um negativo;
- Procedeu-se à electroforese a uma voltagem constante de 75 V/cm, durante duas horas, à temperatura de + 4°C;
- As tiras foram removidas e lavadas em banhos sucessivos de soro fisiológico, durante 60 minutos, em agitação permanente;
- Imergiram-se as tiras de acetato de celulose na solução corante, durante sete minutos, mantendo a agitação permanente;
- Ainda em agitação permanente, colocaram-se as tiras de acetato de celulose na solução descorante, até que os arcos de precipitação fossem evidentes.

Imunofluorescência indirecta (IFI)

Material

- Microscópio de iluminação ultra-violeta (Zeiss Jenamed);
- Estufa de incubação;
- Câmara húmida;
- Micropipetas de 490 µl, 350 µl, 50 µl e 10 µl;
- Pipetas de vidro graduadas de 5 ml, 2 ml e 0,1 ml;
- Caixas de vidro com suporte para lâminas de microscopia;
- Lâminas para imunofluorescência com 10 círculos (bioMérieux) sensibilizadas com o antigénio (promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/PT/88/IMT151) zimodeme MON-1), congeladas a – 80°C;
- Lamelas de 60 mm x 24 mm;
- Tampão fosfato salino – PBS (NaCl 0,15 M tamponado a pH 7,2, com fosfato 0,01M);
- Conjugado canino (anticorpo anti-imunoglobulina G canina, marcado com isotiocianato de fluoresceína), usado na diluição 1/100 em solução tamponada de azul de Evans;
- Solução tamponada de azul de Evans (1/10 000), obtida a partir de uma solução de azul de Evans 1/100;
- Glicerina bidestilada tamponada a pH 7,2;
- Acetona;
- Soro de canídeo.

Procedimento (segundo Abranches, 1984)

- As lâminas sensibilizadas com antigénio foram descongeladas e secas ao ar;
- Imergiram-se as lâminas em acetona durante dez minutos, à temperatura ambiente, após o que foram secas ao ar;
- Diluíram-se as amostras e os soros de controlo positivo e negativo em solução tampão, numa progressão geométrica de dois (1/64, 1/128, 1/256, ...);
- Colocou-se 25 µl de cada diluição no círculo respectivo da lâmina;
- Incubaram-se as lâminas em câmara húmida, em estufa a 37°C, durante 30 minutos;
- As lâminas foram lavadas em solução tampão e imersas naquela solução durante 10 minutos. As lâminas foram secas com recurso a um ventilador, à temperatura ambiente;
- Diluiu-se o conjugado em solução tamponada de azul de Evans;
- Colocou-se 25 µl de conjugado em cada círculo da lâmina;
- Repetiu-se a incubação e a lavagem das lâminas, como anteriormente;
- Colocaram-se duas gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, previamente secas;
- Procedeu-se à leitura dos resultados em microscópio de fluorescência.

Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Extracção de DNA – material e reagentes

- *Kit* comercial para isolamento de ácidos nucleicos, para PCR e *Southern Blotting* (*High Pure PCR Template Preparation Kit* – Roche Diagnostics GmbH);
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml;
- Banho-Maria;
- Micropipetas de 100 μ l e 1000 μ l;
- Ponteiras plásticas para micropipeta;
- Microcentrifugadora refrigerada;
- Amostras de sangue periférico ou de medula óssea de canídeo conservadas em papel de filtro *Whatmann 3* (Fig. 4); zaragatoa de conjuntiva palpebral.

Extracção de DNA – procedimento

- Recortou-se quatro círculos com 4 mm de diâmetro de cada papel de filtro impregnado com sangue periférico ou medular e colocaram-se os círculos recortados em tubos Eppendorf identificados (Fig.5); no caso das amostras de conjuntiva palpebral, a porção da extremidade da zaragatoa foi colocada no interior do tubo;



Figura 4 - Papel de filtro com amostra de sangue.



Figura 5 - Tubo Eppendorf com papel de filtro para extracção de DNA.

- Aplicou-se às amostras de sangue periférico, medula óssea e conjuntiva o protocolo recomendado pelo fabricante do kit para isolamento de ácidos nucleicos a partir de tecido de mamífero;
- Conservou-se os ácidos nucleicos isolados à temperatura de -20°C.

Reacção de PCR – material e reagentes

- Termociclador;
- Tubos Eppendorf de 0,5 ml e 1,5 ml;
- Micropipetas de 10 µl, 20 µl, 100 µl e 200 µl;
- Ponteiras plásticas para micropipeta;
- Água bidestilada estéril para injectáveis (Labesfal);
- Tampão de reacção (16 mM (NH₄)₂SO₄; 67 mM Tris-HCl pH 8,8);
- Solução de cloreto de magnésio (1,5 mM MgCl₂);
- Desoxinucleótidos (0,2 mM dNTP);
- O conjunto de *primers* utilizado foi seleccionado de acordo com o método de PCR aplicado (Quadro II). *Primer forward* (5 pmol) e *primer reverse* (5 pmol);
- *Taq polymerase* (1U);
- Ácidos nucleicos extraídos a partir de amostras de sangue periférico ou de medula óssea de canídeo, conservadas em papel de filtro, e de zaragatoa de conjuntiva palpebral.

Quadro II – Métodos de PCR e sequências alvo

PCR – sequência alvo	Primer	Oligonucleotido
Minicírculos de kDNA (método DNA cinetoplastideal – Cortes <i>et al</i> , 2004)	MC1 – <i>forward</i>	5’GTTAGCCGATGGTGGTCTTG3’
	MC2 – <i>reverse</i>	5’CACCCATTTTTCCGATTTTG3’
Gene que codifica para a subunidade pequena de rRNA (método 18SrRNA – Van Eys <i>et al</i> , 1992)	R174 – <i>forward</i>	5’GGTTCCTTTCCTGATTTACG3’
	R798 – <i>reverse</i>	5’GGCCGGTAAAGGCCGAATAG3’
Região intragénica ¹ (método ITS – El Tai <i>et al</i> , 2000)	L5.8S – <i>forward</i>	5’TGATACTTATCGCACTT3’
	LITSR – <i>reverse</i>	5’CTGGATCATTTTCCGATG3’

¹ – Região não codificante transcrita, situada entre os genes das subunidades grande e pequena de RNA ribossomal.

Reacção de PCR – procedimento

- Para o DNA obtido a partir de amostras de sangue periférico, apenas se realizou PCR tendo como sequência-alvo os minicírculos de kDNA. As amostras de sangue periférico correspondentes a cães seronegativos foram analisadas em *pools* de 4. As amostras biológicas obtidas em cães seropositivos foram analisadas individualmente. Ao produto de extracção das amostras de medula óssea e conjuntiva palpebral aplicaram-se as PCR usando *primers* dirigidos a três sequências-alvo distintas;
- Por cada reacção, utilizou-se:
 - 5 µl de produto da extracção de DNA (de uma amostra, ou do conjunto de 4 amostras biológicas);
 - 20 µl de solução de reacção contendo os volumes de reagente descritos no Quadro III;
- As condições técnicas de amplificação do DNA estão apresentadas no Quadro IV:

- O produto de amplificação obtido foi conservado a + 4 °C até à realização da electroforese.

Quadro III - Solução de reacção das PCR utilizadas

Método	DNA cinetoplastideal (Cortes <i>et al</i> , 2004)	18SrRNA (Van Eys <i>et al</i> , 1992)	ITS (El Tai <i>et al</i> , 2000)
Água bidestilada	5,30 µl	10,30 µl	30,30 µl
Tampão de reacção	5,00 µl	5,00 µl	10,00 µl
Cloreto de magnésio	3,00 µl	3,00 µl	2,50 µl
Desoxinucleotidos	0,50 µl	0,50 µl	1,00 µl
<i>Primer forward</i>	3,00 µl	0,50 µl	2,50 µl
<i>Primer reverse</i>	3,00 µl	0,50 µl	2,50 µl
<i>Taq polymerase</i>	0,20 µl	0,20 µl	0,20 µl

Quadro IV - Condições de amplificação para as PCR utilizadas

Método	DNA cinetoplastideal (Cortes <i>et al</i> , 2004)	18SrRNA (Van Eys <i>et al</i> , 1992)	ITS (El Tai <i>et al</i> , 2000)
Desnaturaçãoinicial	94 °C – 2 minutos	94 °C – 2 minutos	80 °C – 2 minutos
			+
			94 °C – 5 minutos
30 ciclos	Desnaturaçãoinicial	94 °C – 20 segundos	94 °C – 20 segundos
	<i>Annealing</i>	60 °C – 20 segundos	60 °C – 20 segundos
	Extensãoinicial	72 °C – 30 segundos	72 °C – 30 segundos
Extensãofinal	72 °C – 5 minutos	72 °C – 5 minutos	72 °C – 5 minutos

Electroforese dos produtos amplificados

- Preparou-se o gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml);
- Colocou-se 10 µl de produto da reacção de PCR em cada poço do gel de agarose e 5 µl do marcador de 100 pares de bases;
- Realizou-se a electroforese a 110 mV, 400 mA, durante 60 minutos;
- Observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

Tratamento estatístico dos resultados

Utilizou-se o programa SPSS Statistics, versão 17.0 para o Windows para proceder à análise estatística dos resultados obtidos.

Aplicou-se o teste de qui-quadrado para determinar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para os dois grupos de cães estudados, tendo como base a técnica de DAT.

A avaliação dos potenciais factores de risco para a infecção por *L. infantum* foi efectuada com recurso ao teste de qui-quadrado. Nos casos em que os dados não reuniram as condições de aplicabilidade do teste estatístico referido, recorreu-se a metodologias de regressão linear.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

Questionários

Para cada canídeo estudado, foi preenchido o questionário apresentado na Figura 3 (em Materiais e Métodos).

Segundo a análise dos resultados dos questionários, no que respeita aos cães provenientes da Associação, foram todos acolhidos da rua em data indeterminada. Na altura do estudo, habitavam em canil exterior, em contacto com outros cães. Em 83 canídeos, 76 eram de raça indefinida e apenas 7 aparentavam ser de raça (3 Pit Bull, 1 Border Collie, 1 Podengo Português pequeno e 1 Shar Pei). Segundo uma classificação dos canídeos de acordo com o peso em animais de pequeno porte (peso inferior a 10kg), médio (peso compreendido entre 10 kg e 25 kg) e grande (peso superior a 25 kg), foram encontrados 20 cães pequenos, 38 médios e 25 grandes. A maioria dos cães do grupo da Associação (57/83) apresentava pelagem curta, 23 possuíam pelagem de comprimento médio e apenas 3 apresentavam pelagem longa. No que respeita ao género, 48 eram fêmeas e 35 eram do sexo masculino. A idade dos cães abrigados pela Associação é desconhecida. Em apenas 9/83 se efectuava a aplicação regular de piretróides na forma de coleira impregnada ou de unção punctiforme: 6 previamente diagnosticados com leishmaniose canina, 2 usados como dadores de sangue e 1 apadrinhado por um particular. Pelo que foi observado no exame físico abreviado, 15 dos cães apresentavam sinais compatíveis com leishmaniose canina, a maioria dos quais de natureza dermatológica (12/15). Um apresentava sinais oculares de doença e 2 apresentavam sinais dermatológicos e caquexia, sugestiva de envolvimento visceral da infecção.

Os cães cuja colheita de amostras biológicas foi efectuada na Clínica foram adquiridos em condições variadas, como é apresentado no Quadro V. Dos 100 cães envolvidos no estudo, 34 tinham nascido na casa dum cidadão comum e oferecidos ao proprietário actual (designados por “Particular” no Quadro V), 29 foram comprados a criadores e 21 haviam sido acolhidos da rua.

Nove haviam nascido na mesma casa onde viviam actualmente (designados “Nascido na casa do actual proprietário” no Quadro V), quatro foram resgatados dum Canil Municipal, 2 foram adquiridos numa Associação de defesa de animais e apenas um foi comprado numa loja de comércio de animais de companhia.

Quadro V - Proveniência dos canídeos da Clínica

Aquisição	Número de indivíduos
Particular	34
Criador	29
Acolhido da rua	21
Nascido na casa do actual proprietário	9
Canil municipal	4
Associação de defesa de animais	2
Loja de animais	1

No que respeita ao tipo de *habitat* destes animais, observou-se:

- 29 cães viviam exclusivamente no interior de casa;
- 36 passavam aproximadamente tanto tempo no interior como no exterior das habitações;
- 35 eram cães exclusivamente de exterior, dos quais 21 permaneciam num quintal e 14 em canil.

Ao contrário do que se observou para os cães da Associação, no caso do grupo de cães da Clínica apenas 37 apresentavam raça indefinida. Os restantes 63 eram de raça pura. As raças mais representadas foram as raças Boxer (6 indivíduos), Caniche (5 cães), Labrador Retriever e Pit Bull (4 indivíduos de cada raça). Oito cães eram de raça nacional (Perdigueiro, Podengo Pequeno, cão de Castro Laboreiro, cão da Serra da Estrela e Rafeiro alentejano). Os restantes 36 cães pertenciam a um conjunto muito variado de 29 raças diferentes. De acordo com a classificação de porte já

referida para o grupo de cães da Associação, no grupo de cães da Clínica observaram-se 24 cães de pequeno porte, 39 cães de porte médio e 37 cães de grande porte. Neste grupo de cães, 51 apresentavam pelagem curta, 35 tinham pelagem de comprimento médio e 14 tinham de pelagem longa. Em 100 cães envolvidos no estudo, 47 eram do sexo feminino e 53 do masculino. Os cães analisados tinham idade compreendida entre 1 e 15 anos (à data da colheita), sendo a média etária da amostra populacional estudada de 6 anos. A aplicação de piretróides era efectuada em 65/100 cães da Clínica, mas em apenas 36 a aplicação era efectuada de forma a proporcionar uma protecção adequada contra a picada do flebótomo vector de *L. infantum*. Dos 100 cães observados na clínica, 22 apresentavam sinais clínicos compatíveis com leishmaniose canina: 17 cães apresentavam apenas sinais de natureza dermatológica, um apresentava sinais oculares, três tinham sinais viscerais (falência renal crónica) e um cão tinha sinais viscerais e dermatológicos sugestivos de leishmaniose canina.

Os dados obtidos mediante o preenchimento dos questionários estão sumarizados no Quadro VI.

Quadro VI - Resumo dos resultados dos questionários realizados no estudo

		Associação	Clínica
Aquisição	Acolhido da rua	83	21
	Outra	0	79
Habitat	Exterior – canil	83	14
	Exterior – quintal	0	21
	Interior	0	29
	Misto	0	36
Pelagem	Curta	57	51
	Média	23	35
	Lisa	3	14
Porte	Pequeno (< 10 kg)	20	24
	Médio (10 – 25 kg)	38	39
	Grande (> 25 kg)	25	37
Presença de sinais clínicos da doença	Sim	15	22
	Não	68	78
Raça	Indefinida	76	37
	Pura	7	63
Sexo	Feminino	48	47
	Masculino	35	53
Uso adequado de piretróides	Sim	9	36
	Não	74	64

Teste de aglutinação directa (DAT)

Considerando como positivo um título de anticorpos aglutinantes igual ou superior a 1:400 (Figura 6), obtiveram-se resultados positivos em 5/100 amostras obtidas em cães da Clínica e 8/83 amostras obtidas em cães da Associação.

Considerando estes resultados, a seroprevalência de leishmaniose canina para a amostra populacional estudada foi de 7,1%, sendo de 5,0% para o grupo de cães da Clínica (considerados com dono) e de 9,6% para o grupo de cães da Associação (considerados sem dono).

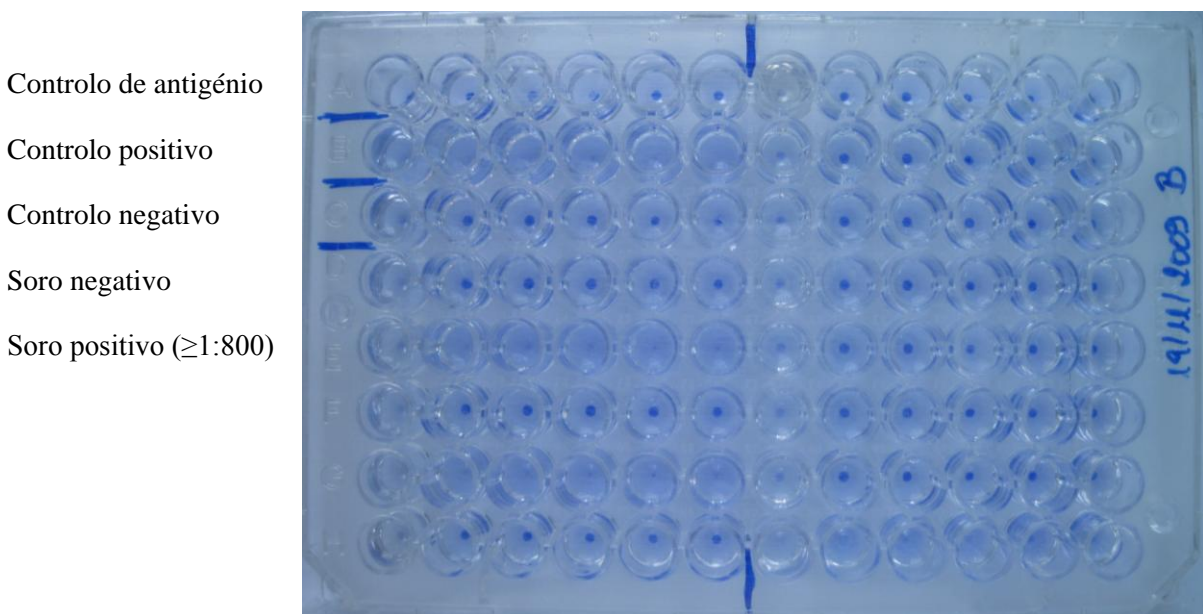


Figura 6 – Reacção de aglutinação directa em microplaca.

Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Foi detectada a presença de DNA de *L. infantum* em amostras de sangue periférico de dois canídeos da Associação (Figura 7). A colheita das amostras fora efectuada em Setembro e Outubro (meses em que ocorre transmissão da doença) e ambos os canídeos eram seronegativos pelo teste de aglutinação directa. Por outro lado, não foi possível demonstrar a presença de material genético de *L. infantum* no sangue periférico de nenhum dos cães seropositivos envolvidos no estudo. O facto poderá estar relacionado com a inconstância da parasitemia na infecção por este protozoário, que torna impossível prever quando um cão infectado apresenta parasitas circulantes.

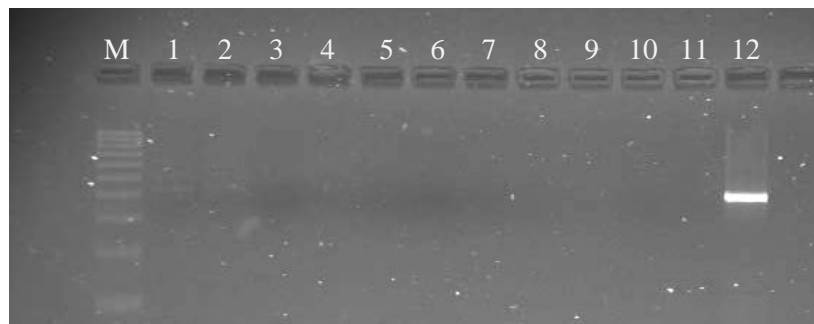


Figura 7 - Resultados após electroforese dos produtos da reacção de PCR (M – marcador de 100 pares de bases; linha 1 – amostra S23, com resultado positivo; linha 2 – amostra S61, com resultado positivo; linhas 3 a 10 – amostras S59, S60, S62, S79, S80, S81, S82, S83 com resultados negativos; linha 11 – controlo negativo; linha 12 – controlo positivo).

A colheita de amostras de sangue periférico destes pacientes foi repetida fora da época de transmissão da doença (em Fevereiro, 2010), com o objectivo de repetir os testes serológicos e moleculares. A repetição da colheita durante um período em que não se verifica transmissão de *Leishmania infantum* visou eliminar a possibilidade de contaminação das amostras biológicas analisadas com material parasitário com origem ambiental. Com efeito, verificou-se que ambos os canídeos mantiveram a seronegatividade e não foi possível detectar a presença de DNA de *L. infantum* nas amostras de sangue periférico colhidas em Fevereiro.

Provas adicionais

Os soros com resultado positivo e um com título 1:200 no teste de aglutinação directa, bem como os soros correspondentes a canídeos com PCR positivo no sangue periférico foram submetidos a contra-immunoelectroforese (CIE) e a teste de imunofluorescência indirecta (IFI).

Consideraram-se positivos na prova de contra-immunoelectroforese os soros para os quais se forma um ou mais arcos de precipitação no suporte de acetato de celulose (Figura 8).



Figura 8 – Contra-immunoelectroforese (resultado positivo à direita).

Para a imunofluorescência indirecta, foram considerados positivos os soros com títulos de anticorpos iguais ou superiores a 1:128.

Todos os testes serológicos foram negativos para os soros obtidos dos canídeos com PCR positivo em sangue periférico (amostras S23 e S61).

No que diz respeito aos cães do grupo da Clínica com resultados positivos no teste de aglutinação directa, apenas um (V55) obteve resultado positivo nas provas de contra-immunoelectroforese e imunofluorescência indirecta. Tratava-se de um cão em que tinha sido diagnosticada leishmaniose canina a 24 de Julho de 2008, por imunofluorescência indirecta (título 1:160) e encontrava-se em tratamento com alopurinol desde então. Os soros dos outros quatro cães com resultados positivos no

teste de aglutinação directa proporcionaram resultado negativo em todos os outros testes serológicos (Quadro VII).

Quanto ao grupo de cães da Associação:

- O soro S46 apresentou título 1:200 no teste de aglutinação directa (ainda considerado negativo) e resultado negativo nas provas de contra-immunoelectroforese e imunofluorescência indirecta;
- Dos 8 soros com resultados positivos no teste de aglutinação directa:
 - 3 (S9, S44 e S72) apresentaram resultado positivo em ambas as provas serológicas adicionais;
 - 3 (S34, S45 e S82) apresentaram resultado positivo na prova de contra-immunoelectroforese e negativo na de imunofluorescência indirecta;
 - 1 (S73) apresentou resultado negativo na prova de contra-immunoelectroforese e positivo no teste de imunofluorescência indirecta;
 - 1 (S67) apresentou resultado negativo em ambas as provas serológicas adicionais.

Os resultados obtidos estão resumidos no Quadro VII:

Quadro VII - Resultados dos testes realizados aos soros positivos ou duvidosos

Código	DAT	PCR	CIE	IFI
V8	≥ 1:800	Negativo	Negativo	Negativo
V47	1:400	Negativo	Negativo	Negativo (1:32)
V52	≥ 1:800	Negativo	Negativo	Negativo
V55	≥ 1:800	Negativo	Positivo	1:512
V85	≥ 1:800	Negativo	Negativo	Negativo (1:8)
S9	≥ 1:800	Negativo	Positivo	1:1024
S23	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
S34	≥ 1:800	Negativo	Positivo	Negativo (1:64)
S44	≥ 1:800	Negativo	Positivo	1:2048
S45	≥ 1:800	Negativo	Positivo	Negativo (1:8)
S46	Negativo (1:200)	Negativo	Negativo	Negativo (1:16)
S61	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
S67	≥ 1:800	Negativo	Negativo	Negativo (1:32)
S72	≥ 1:800	Negativo	Positivo	1:512
S73	1:400	Negativo	Negativo	1:128
S82	1:400	Negativo	Positivo	Negativo (1:32)

Dos cinco pacientes seropositivos da Clínica Veterinária, um (V55) encontrava-se em tratamento com alopurinol há um ano. Os restantes foram chamados para realizar punção medular e zaragatoa conjuntival, para confirmação do resultado. Apenas três compareceram (V8, V47 e V85), todos eles assintomáticos para leishmaniose canina, embora dois habitassem em casas onde já haviam sido diagnosticados casos da doença (V47 e V85).

As amostras obtidas por zaragatoa conjuntival foram analisadas por PCR e todos os resultados foram negativos.

As amostras de medula óssea foram submetidas a citologia e extracção de DNA para realização de PCR segundo os três protocolos descritos em Materiais e Métodos.

Na citologia, foram raras as imagens compatíveis com formas amastigota de *L. infantum*. Uma das amostras apresentava também microfilárias (Fig. 9).

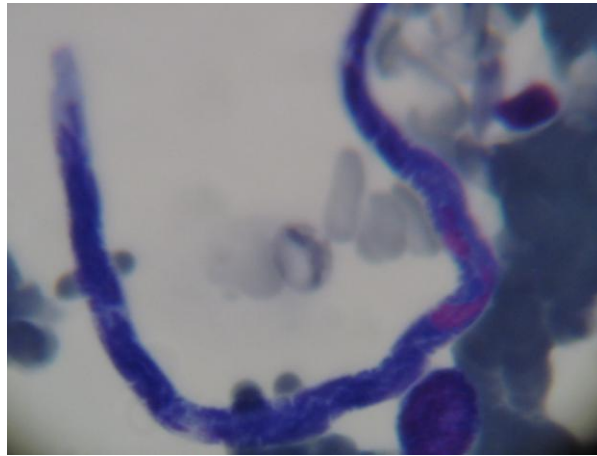


Figura 9 - Citologia de medula óssea (microfilária na amostra V47. Ampliação 1000x)

Visualizou-se a presença de DNA de *L. infantum* em amostras obtidas a partir dos três canídeos seropositivos estudados, quando aplicado o protocolo de PCR mais sensível, baseado nos minicírculos de DNA cinetoplastideal, e após a realização de uma segunda extracção de DNA a partir de amostras de medula óssea conservadas em papel de filtro, à semelhança do descrito para as amostras de sangue periférico (Figura 10). A realização da segunda extracção de DNA foi necessária devido à distribuição heterogénea dos elementos celulares na medula óssea. Deste modo, para a segunda extracção de DNA seleccionaram-se as áreas de aparência mais grumosa da amostra de medula óssea, onde a probabilidade de existirem células da linhagem mielóide (susceptíveis a infecção por *L. infantum*) é mais elevada.

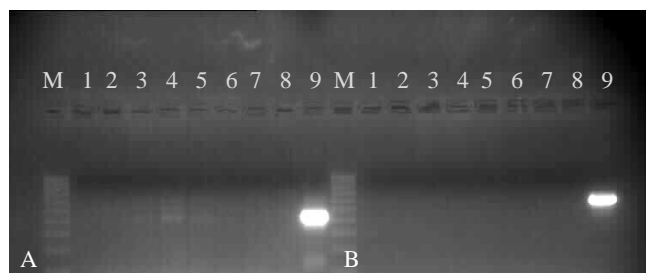


Figura 10 - Gel de electroforese - amostras de sangue periférico e medula óssea. Linhas 3, 4 e 5 da parte A com resultado positivo. (A – método kDNA; B – método 18SsRNA. M – marcador de 100 pares de bases; 1 – S23, sangue periférico 20/02/2009; 2 – S23, sangue periférico 14/02/2010; 3 – V85, medula óssea; 4 – V47, medula óssea; 5 – V8, medula óssea; 6 – S61, sangue periférico 20/02/2010; 7 – S61, sangue periférico 24/10/2009; 8 – controlo negativo; 9 – controlo positivo)

Testes estatísticos

Utilizando o programa SPSS Statistics (versão 17.0 para Windows), foram comparados os dois grupos de cães estudados relativamente aos resultados do teste de aglutinação directa, utilizando o teste de qui-quadrado. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de cães envolvidos no estudo ($p=0,224$).

Quanto à avaliação dos potenciais factores de risco, apenas foi aplicado o teste de qui-quadrado à variável “sexo”. Não foi demonstrada associação estatística entre o sexo do indivíduo e a seropositividade ($p=0,885$).

Os potenciais factores de risco “porte”, “tipo de pelagem”, “aquisição”, “*habitat*”, “coabitação com outros cães”, “uso correcto de repelentes do vector” e “presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose canina” não cumpriam os requisitos para a aplicação do teste de qui-quadrado, pelo que foram avaliados com recurso a metodologias de regressão linear. Trabalhando com um intervalo de confiança de 95%, nenhum destes factores demonstrou aumentar o risco de infecção por *L. infantum* para a amostra populacional de canídeos incluída no estudo.

Apesar de os resultados obtidos não serem estatisticamente significativos, sugerem tendências para a influência de alguns factores de risco na probabilidade de obter resultados positivos no teste de aglutinação directa. Tomando como referência do valor de razão de probabilidade (*odds ratio*, ou OR, no Quadro VIII), os factores de risco com valores de razão de probabilidade inferior a 1 consideram-se que reduzem a probabilidade de o canídeo ser positivo e os valores superiores a 1 aumentam esta probabilidade. Assim, aumentam a probabilidade de obter resultado positivo no teste de aglutinação directa os factores: peso inferior a 10 kg (OR=2,521), ou compreendido entre 10 e 25 kg (OR=1,366), pelagem curta (OR=1,120) e não co-habitar com outros cães (OR=1,398). Por outro lado, reduzem a probabilidade de obter resultado positivo naquele teste serológico os factores de risco: aquisição diferente do acolhimento da rua (OR=0,811), habitat no interior (OR=0,800) ou

misto (OR=0,309), a não aplicação de repelentes do vector (OR=0,347) e a ausência de sinais clínicos de doença (OR=0,542). Estes resultados são resumidos no Quadro VIII.

Quadro VIII - Resultados obtidos nos testes de regressão linear

Factor de risco		OR	Valor p
Aplicação de piretróides	Não	0,347	0,071
	Sim	Referência	
Aquisição	Na rua	Referência	
	Outra	0,811	0,723
Co-habitação com outros cães	Não	1,398	0,393
	Sim	Referência	
Habitat	Exterior	Referência	
	Interior	0,800	0,781
	Misto	0,309	0,270
Pelagem	Curta	1,120	0,848
	Média ou longa	Referência	
Peso	<10 kg	2,521	0,223
	10 – 25 kg	1,366	0,678
	>25 kg	Referência	
Presença de sinais clínicos	Não	0,542	0,332
	Sim	Referência	

Discussão

Utilizando no nosso estudo o teste de aglutinação directa (DAT) como referência, foi determinado o valor 7,1% para a seroprevalência de leishmaniose na amostra canina estudada. Este resultado está em conformidade com os dados obtidos no inquérito nacional realizado em 2009 pelo Observatório Nacional das Leishmanioses, que estimou uma seroprevalência da infecção em cerca de 5% para o distrito de Setúbal. O valor foi determinado por DAT, numa amostra populacional constituída por 364 cães utentes de clínicas veterinárias da região (Campino, comunicação pessoal). Por outro lado, num estudo anterior realizado na Península de Setúbal, a seroprevalência de leishmaniose canina foi determinada em 11,5% (Abranches *et al.*, 1983). Deste modo, parece ter ocorrido uma diminuição na prevalência da infecção ao longo dos últimos anos, nesta região. Estes resultados contrastam com outras regiões do país, onde se verifica uma evolução no sentido inverso. Por exemplo, na região de Trás-os-Montes, a seroprevalência de leishmaniose canina aumentou de 10,4% em 1989 para 20,4% em 1999, embora se tenha verificado uma diminuição da percentagem de cães sintomáticos (Cardoso *et al.*, 2004). Podemos sugerir alguns factores que possam contribuir para a diminuição da seroprevalência da infecção, tais como a melhoria da qualidade de vida da generalidade dos cães domésticos ou o melhor conhecimento da doença por parte dos proprietários, conduzindo à adopção de medidas preventivas da transmissão da infecção, como seja a aplicação de agentes repelentes do vector ou a colocação dos canídeos no interior durante o período de actividade do insecto. De referir que os proprietários de 62/100 cães do grupo da Clínica afirmaram ter conhecimento prévio da doença, mas apenas 36% faziam uso adequado de agentes repelentes de flebótomos. Cardoso *et al.* (2004) sugerem, ainda, que o aumento do número de portadores assintomáticos de *L. infantum* possa estar relacionado com a aplicação crescente de protocolos terapêuticos aos cães infectados. Este facto também pode ser responsável pela diminuição da seroprevalência a nível local, dado que os cães tratados tornam-se não infectantes para o vector e podem, ao fim de um período variável de

tempo, tornar-se seronegativos, embora a cura parasitológica ainda não seja possível para os canídeos, com os fármacos de que dispomos actualmente.

No nosso estudo, para o grupo de clientes da Clínica (cães com dono), foi calculada a seroprevalência de leishmaniose canina de 5,0%. Por outro lado, o valor da seroprevalência dos cães (considerados sem dono) da Associação foi de 9,6%. Apesar de se observar uma diferença de 4,6% entre os valores de seroprevalência dos dois grupos de canídeos, verificou-se que, aplicando o teste de qui-quadrado, essa diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,224$). Seria esperado que os cães do grupo da Clínica apresentasse menor prevalência da infecção, por terem melhor manejo ambiental e alimentar, bem como pelo facto de muitos proprietários procederem à aplicação de medidas profiláticas da transmissão vectorial do protozoário. À semelhança do nosso estudo, num trabalho anterior, realizado na área de Lisboa, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em termos de prevalência de leishmaniose canina entre a população de cães com e sem proprietário (Cortes *et al*, 2007).

Recorrendo ao mesmo suporte informático, foi estudada a possível influência das variáveis “género”, “porte”, “pelagem”, “uso correcto de repelentes do vector”, “aquisição”, “*habitat*”, “coabitação com outros cães” e “presença de sinais clínicos de doença” na prevalência da infecção por *Leishmania infantum*. Nenhum dos factores analisados provou constituir factor de risco para a infecção de forma estatisticamente significativa. Possivelmente, a amostra populacional utilizada no nosso estudo foi demasiado pequena para permitir a determinação de factores de risco para a infecção, na região em foco. Não obstante, os resultados obtidos sugerem algumas tendências (Quadro VIII, em Resultados). Deste modo, parece haver uma maior probabilidade de apresentarem resultados positivos no teste de aglutinação directa os cães de porte pequeno (peso inferior a 10 kg) ou médio (peso compreendido entre 10 e 25 kg), pelagem curta, aos quais os proprietários não aplicam agentes repelentes do vector, que foram adquiridos na rua, os que habitam no exterior, não co-habitam com outros cães e os que apresentem sinais clínicos compatíveis com leishmaniose

canina. Os factores de risco “pelagem curta”, “habitat no exterior” e “presença de sinais clínicos de doença” encontram-se em conformidade com trabalhos publicados anteriormente (Campino, 2004; Gálvez *et al*, 2010). Já os resultados obtidos para o factor de risco “porte” são contrários às fontes bibliográficas consultadas. Por exemplo, num estudo transversal de seroprevalência realizado na região de Madrid, entre 2006 e 2007, Gálvez *et al* estabeleceram uma relação entre o pequeno porte e uma menor incidência da infecção. No referido estudo, foram analisados 1076 cães, de 2006 a 2007. A seroprevalência determinada pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) naquela região foi de 8,1%. Outros autores referem igualmente uma maior prevalência da infecção nos cães de grande porte, nomeadamente das raças Pastor Alemão, Doberman e Boxer (Campino, 2004). Em ambos os trabalhos, sugere-se que o factor “porte” possa estar associado a um habitat no exterior e, deste modo, a uma maior exposição ao vector. No nosso estudo, verificou-se que a maioria dos cães de grande porte do grupo Clínica era de raça pura (31/37), o que não se verificou para os cães de porte pequeno e médio (apenas 32/67 destes cães eram de raça pura). É possível que os cães de grande porte, de manutenção mais dispendiosa, sejam oriundos de zonas mais privilegiadas, nas quais a adopção de medidas profiláticas da leishmaniose canina esteja mais difundida, encontrando-se menos expostos à transmissão. Por outro lado, verifica-se que os cães de pequeno porte apresentam maior longevidade. No nosso trabalho não foi possível avaliar o efeito da idade na seroprevalência da infecção, devido ao desconhecimento da idade dos cães do grupo Associação, mas diversos autores referem que constitui um factor de risco, com dois picos de incidência: cães de idade inferior a 3 anos e superior a 7 anos (Campino, 2004; Gálvez *et al.*, 2010). No nosso estudo, para os cães do grupo Clínica, 47,6% dos cães de porte pequeno e médio apresentavam idade superior a 7 anos, comparativamente a 32,4% dos cães de grande porte. Esta diferença etária poderá constituir um factor adicional, que contribua para a maior incidência de casos positivos em cães de menor porte. A percentagem de cães com idade inferior a 3 anos foi semelhante entre os cães de porte diferente (20,6% para os cães pequenos e médios e 21,6% para os cães grandes).

Apesar de a aplicação de agentes repelentes do vector de *L. infantum* ser considerada uma forma de protecção eficaz contra a transmissão da infecção (Gavvani *et al.*, 2002), no nosso trabalho os testes estatísticos sugeriram uma tendência para os cães aos quais não eram aplicados estes produtos apresentarem menor probabilidade de ser seropositivos. Embora possa parecer paradoxal, estes resultados poderão ser explicados pelo facto de os clínicos recomendarem a aplicação destes repelentes nos cães diagnosticados com leishmaniose canina, de modo a prevenir a transmissão da infecção a partir destes animais. Também nos cães do grupo Associação se verificou que as responsáveis pela entidade se preocupavam em aplicar repelentes do vector aos cães que já haviam sido previamente diagnosticados com leishmaniose canina, muitos dos quais proporcionaram resultados positivos no nosso estudo. Os outros cães não eram protegidos, por falta de recursos. Assim, na amostra populacional estudada, a aplicação de repelentes do vector parece surgir mais frequentemente após o diagnóstico da infecção, não estando ainda implementada como medida profilática para a generalidade dos cães envolvidos no trabalho (recordar que apenas 36% dos proprietários inquiridos procedia a aplicação destes produtos de forma adequada, embora 62% afirmassem ter conhecimento prévio da doença).

Gálvez *et al* (2010) salientam a inconsistência na determinação dos factores de risco da infecção canina por *L. infantum* entre inquéritos epidemiológicos diferentes. Esta falta de concordância poderá ser explicada pelo facto de não haver padronização na realização deste tipo de estudo, nomeadamente no que diz respeito à dimensão da amostra populacional, aos factores sócio-demográficos da população canina estudada e aos métodos de diagnóstico aplicados para o diagnóstico da infecção.

Os soros positivos ($\geq 1/400$) para o teste de aglutinação directa, um soro com o título de 1:200 nesta prova e os soros dos canídeos com PCR positivo em sangue periférico foram analisados por outros testes serológicos, tais como: contra-immunoelectroforese (CIE) e imunofluorescência indirecta. A realização de técnicas serológicas adicionais visou aumentar a especificidade das provas, uma vez

que há possibilidade de obter resultados falso-positivos quando se aplicam técnicas com sensibilidade muito elevada, como é o caso do teste de aglutinação directa. Os resultados obtidos não foram absolutamente concordantes entre os diferentes testes serológicos (Quadro VII, em Resultados). Dos 13 soros positivos no teste de aglutinação directa, 7 foram positivos em contra-imunoelectroforese e 5 apresentaram resultado positivo em imunofluorescência indirecta, sendo 9 (69,2%) resultados concordantes entre estes dois testes. Verificou-se que 7 (87,5%) dos 8 canídeos provenientes da Associação seropositivos em DAT apresentavam pelo menos um teste serológico adicional positivo. Por outro lado, no grupo de cães da Clínica, apenas um dos cinco canídeos seropositivos em DAT apresentou resultado positivo em ambos os testes serológicos adicionais, CIE e IFI. Os resultados da serologia estão em conformidade com estudos anteriores. Por exemplo, Ferreira *et al* (2007) determinaram um grau de concordância entre os resultados obtidos por DAT e por IFI variável entre 65% e 88%, respectivamente em cães assintomáticos e sintomáticos para leishmaniose canina. No nosso estudo, verificou-se uma elevada percentagem de cães assintomáticos para leishmaniose canina. Considerando os 13 cães com DAT positivo, 9 (69,2%) não apresentavam sintomas compatíveis com a doença, sendo apenas 4 (30,8%) sintomáticos. Do mesmo modo, dos 8 canídeos com resultados positivos em pelo menos dois testes serológicos, apenas 3 apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença, isto é 62,5% eram assintomáticos. Os 5 (100%) cães com resultado positivo apenas no teste de aglutinação directa eram assintomáticos para leishmaniose. De salientar que em três destes cães foi possível confirmar a presença de infecção por *Leishmania infantum* mediante a realização de provas moleculares em amostras de medula óssea. A existência de grande número de portadores assintomáticos de *L. infantum* tem sido evidenciada por vários autores (Blavier *et al*, 2001; Cardoso *et al*, 2004). Os cães com infecção assintomática são de difícil detecção, mas têm um papel na transmissão da parasitose. Como se verificou no nosso trabalho, é possível detectar a presença de parasitas na medula óssea destes cães.

Outros autores detectaram a presença de material genético de *L. infantum* na pele e conjuntiva de cães assintomáticos (Solano-Gallego *et al*, 2001).

Os testes moleculares realizados em amostras de sangue periférico, conservadas em papel de filtro, proporcionaram resultados aquém dos esperados. Com base na bibliografia consultada, esperava-se que pelo menos alguns dos cães seropositivos apresentassem DNA de *L. infantum* no sangue periférico. De facto, diversos autores consideram a detecção de DNA de *Leishmania infantum* no sangue periférico um método de diagnóstico com elevada sensibilidade, que permite, inclusivamente, a detecção de indivíduos portadores seronegativos (Lachaud *et al*, 2002). Outros trabalhos proporcionaram valores de sensibilidade entre 81,1% e 93,1% para a detecção de material genético de *L. infantum* em amostras de sangue periférico conservadas em papel de filtro, usando protocolos de PCR baseados em DNA cinetoplastideal (Maia *et al*, 2006; Maia *et al*, 2009). No entanto, neste estudo apenas foi detectada a presença de DNA parasitário em duas amostras de sangue provenientes de dois canídeos seronegativos (correspondentes a 1,1% do total de amostras testadas). Dado que a colheita de sangue fora efectuada nos meses de Setembro e Outubro (época de actividade do vector da doença), optou-se por realizar uma segunda colheita de sangue a estes canídeos, fora do período de transmissão de leishmaniose canina, de modo a reduzir a possibilidade de contaminação das amostras. Os testes efectuados ao sangue periférico colhido em Fevereiro apresentaram resultados negativos. Na leishmaniose canina, a parasitemia ocorre de forma intermitente e diminui ao longo da evolução da doença (Maia *et al*, 2006). A inconstância da parasitemia torna impossível prever quando um cão infectado apresenta parasitas na circulação periférica. Por outro lado, os cães sintomáticos para a infecção apresentam-se, provavelmente, numa fase tardia da infecção, o que significa que existe menor probabilidade de apresentarem *L. infantum* na circulação periférica e maior probabilidade de apresentarem títulos de anticorpos elevados. De facto, estudos longitudinais revelaram que a PCR tem sensibilidade elevada imediatamente após a transmissão. A sensibilidade diminui para cerca de 50% com a evolução da infecção. As

características da infecção por *L. infantum* poderão explicar a elevada proporção de PCR com resultados negativos obtidos neste trabalho, nomeadamente, nos cães seropositivos. Assim, este método parece ser mais útil na detecção de doença activa, enquanto a serologia é mais adequada para a detecção de infecção (Romero e Boelaert, 2010).

Nos canídeos seropositivos nos quais foi possível prosseguir o estudo, os testes moleculares detectaram DNA parasitário no material de biopsia de medula óssea. Por outro lado, em amostras biológicas obtidas por zaragatoa conjuntival não se observaram resultados positivos, apesar de vários autores considerarem este método muito sensível para o diagnóstico da leishmaniose canina (Ferreira *et al*, 2008; Pilatti *et al*, 2009). Notar que nos estudos realizados com amostras de conjuntiva palpebral, a PCR foi realizada com hibridização, procedimento que permitiu aumentar a sensibilidade da técnica. Pilatti *et al* (2009) também referem que a sensibilidade do método de diagnóstico é superior a 90% para cães sintomáticos para a infecção, não tendo determinado o valor de sensibilidade em cães assintomáticos. No nosso estudo, os três cães em que foi possível aplicar a técnica eram assintomáticos.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no teste de aglutinação directa, a seroprevalência de leishmaniose canina para a população estudada é de 7,1%. Este valor está em conformidade com os resultados do inquérito nacional realizado em 2009 pelo Observatório Nacional das Leishmanioses. Na região em estudo, observou-se uma diminuição marcada no valor da seroprevalência da infecção relativamente a estudos anteriores. Por exemplo, Abranches *et al* (1983) determinaram um valor de seroprevalência de 11,5% na Península de Setúbal. Vários factores poderão explicar esta evolução, nomeadamente, uma melhoria na qualidade de vida dos cães domésticos e uma maior adesão à profilaxia e tratamento da infecção.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de cães com e sem dono, à semelhança do que foi verificado em estudos anteriores (Cortes *et al.*, 2007).

As variáveis “sexo”, “porte”, “pelagem”, “uso correcto de repelentes do vector”, “aquisição”, “*habitat*”, “coabitação com outros cães” e “presença de sinais clínicos de doença” não provaram constituir factores de risco para a infecção por *Leishmania infantum* de forma estatisticamente significativa. No entanto, os resultados dos testes estatísticos sugeriram tendências para que as características “porte pequeno ou médio”, “pelagem curta”, “aplicação de repelentes do vector”, “aquisição na rua”, “*habitat* exterior”, “não coabitar com outros cães” e “presença de sinais clínicos de doença” possam constituir risco acrescido de infecção. É possível que alguma das variáveis analisadas se revelasse factor de risco, caso pudesse ter sido utilizada uma amostra populacional de maior dimensão no nosso estudo.

Referências bibliográficas

1. ABRANCHES, P., SANTOS-GOMES, G., RACHAMIM, N., CAMPINO, L., SCHNUR, L. F., JAFFE, C. L. 1991 – An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **13**, pp. 537 – 550
2. BANETH, G., AROCH, I. 2008 – Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, **175**, pp. 14 – 15
3. BANETH, G., KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGU, L., BOURDEAU, P., FERRER, L. 2008 – Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, **24**, (7) pp. 324 – 329
4. BLAVIER, A., KEROACK, S., DENEROLLE, P., GOY-THOLLOT, I., CHABANNE, L., CADORÉ, J. L., BOURDOISEAU, G. 2001 – Atypical Forms of Canine Leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, **162**, pp. 108 – 120
5. CABRAL, M., O'GRADY, J. E., GOMES, S., SOUSA, J. C., THOMPSON, H., ALEXANDER, J. 1998 – The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, **76**, pp. 173 – 180
6. CAMPINO, L., SANTOS-GOMES, G., RIÇA CAPELA, M. J., CORTES, S., ABRANCHES, P. 2000 – Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **92**, pp. 269 – 275
7. CARDOSO, L., SCHALLIG, H. D. F. H., NETO, F., KROON, N., RODRIGUES, M., 2004 – Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*, **91**(2004), pp. 95-100
8. CORTES, S., AFONSO, M. O., ALVES-PIRES, C., CAMPINO, L. 2007 – Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, **13**(9), pp. 1431-1432

9. CORTES, S., ROLÃO, N., RAMADA, J., CAMPINO, L. 2004 – PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**, pp. 12-17
10. EL TAI, N.O., OSMAN, O. F., EL FARI, M., PRESBER, W., SCHÖNIAN, G. 2000 – Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter papers as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**, pp. 575 - 579
11. ERTABAKLAR, H., TOZ, S. O., OZKAN, A. T., RASTGELDI, S., BALCIOGLU, I. C., OZBEL, Y. 2005 – Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum province. *Acta Tropica*, **93**, pp. 239 – 246
12. FARRELL, J.P., 2002 – *World Class Parasites: Volume 4* Leishmania, Kluwer Academic Publishers, Estados Unidos da América, pp. 45 – 57
13. FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J., MÉNDEZ, S., DE LA FUENTE, C., GÓMEZ-MUÑOZ, M. T., CUQUERELLA, M., ALUNDA, J. M. 1999 – Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61** (4), pp. 652 – 653
14. FERREIRA, E. C., DE LANA, M., CARNEIRO, M., REIS, A. B., PAES, D. V., DA SILVA, E. S., SCHALLIG, H., GONTIJO, C. M. F. 2007 – Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, **147**, pp. 235 – 241
15. FERREIRA, S. A., ITUASSU, L. T., DE MELO, M. N., DE ANDRADE, A. S. R. 2008 – Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, **152**, pp. 257 – 263

16. FRANCINO, O., ALTET, L., SANCHÉZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SÁNCHEZ, A., ROURA, X. 2006 – Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **137**, pp. 214 – 221
17. GÁLVEZ, R., MIRÓ, G., DESCALZO, M.A., NIETO, J., DADO, D., MARTÍN, O., CUBERO, E., MOLINA, R. 2010 – Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology*, **169**, pp. 327 – 334
18. GAVGANI, A.S., MOHITE, H., EDRISSIAN, G.H., DAVIES, C.R. 2002 – Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**, 511 – 515
19. GOMES, Y. M., PAIVA CAVALCANTI, M., LIRA, R. A., ABATH, F. G. C., ALVES, L. C. 2008 – Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, **175**, pp. 45 – 52
20. IKONOMOPOULOS, J., KOKOTAS, S., GAZOULI, M., ZAVRAS, A., STOITSIOU, M., GORGOU LIS, V. G. 2003 – Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, **113**, pp. 99 – 113
21. INIESTA, L., FERNÁNDEZ-BARREDO, S., BULLE, B., GÓMEZ, M. T., PIARROUX, R., GÁLLEGO, M., ALUNDA, J. M., POTÚS, M. 2002 – Diagnostic Techniques To Detect Cryptic Leishmaniasis in Dogs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9** (5), pp. 1137 – 1141
22. LACHAUD, L., MARCHERGUI-HAMMAMI, S., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J. P., BASTIEN, P. 2002 – Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **40** (1), pp. 210 – 215

23. MAIA, C., CAMPINO, L. 2008 – Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, **158** (4), pp. 274 – 287
24. MAIA, C., CRISTÓVÃO, J. M., RAMADA, J., ROLÃO, N., CAMPINO, L. 2006 – Diagnóstico da leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis de filtro – resultados preliminares. *Veterinary Medicine*, **8** (47), pp. 29 – 33
25. MAIA, C., RAMADA, J., CRISTÓVÃO, J. M., GONÇALVES, L., CAMPINO, L. 2009 – Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, **179**(2009), pp. 142-144
26. MARTÍN-SÁNCHEZ, J., PINEDA, J. A., MORILLAS-MÁRQUEZ, F., GARCÍA-GARCÍA, J., ACEDO, C., MACIAS, J. 2004 – Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction and other *Leishmania* infection markers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**(5), 2004, pp. 545-548
27. MAZIOUMI GAVGANI, A. S., HODJATI, M. H., MOHITE, H., DAVIES, C. R. 2002 – Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *The Lancet*, **360**, pp. 374 – 379
28. MEREDITH, S. E. O., KROON, N. C. M., SONDRUP, E., SEAMAN, J., GORIS, M. G. A., VAN INGEN, C. W., OOSTING, H., SCHOONE, G. J., TERPSTRA, W. J., OSKAM, L., 1995 – *Leish-KIT*, a Stable Direct Agglutination Test Based on Freeze-Dried Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**(7), pp. 1742 – 1745
29. MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., OLIVA, G., BANETH, G. 2008 – Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, **24** (8), pp. 371 – 377
30. NOLI, C. 1999 – Canine leishmaniasis. *Waltham Focus*, **9** (2), pp. 16 – 23

31. OLIVA, G., SCALONE, A., MANZILLO, V. F., GRAMICCIA, M., PAGANO, A., DI MUCCIO, T., GRADONI, L. 2006 – Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naïve Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (4), pp. 1318 – 1322
32. OTRANTO, D., PARADIES, P., DE CAPRARIIS, D., STANNECK, D., TESTINI, G., GRIMM, F., DEPLAZES, P., CAPELLI, G. 2009 – Toward Diagnosing *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in an Area Where Leishmaniasis is Endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, **16** (3), pp. 337 – 343
33. ÖZENSOY TÖZ, S., ÖZBEL, Y., ERTABAKLAR, H., YILDIZLI, N., KORKMAZ, M., ALKAN, M. Z. 2005 – Comparisons of Clinical Findings and Serological Data in the Diagnosis of Canine Leishmaniasis. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science*, **29**, pp. 269 – 273
34. PILATTI, M. M., FERREIRA, S. A., DE MELO, M. N., DE ANDRADE, A. S. R. 2009 – Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Research in Veterinary Science*, **87**, pp. 255 – 257
35. PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G., RUITENBERG, J. 1994 – Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, **62** (1), pp. 229 – 235
36. REALE, S., MAXIA, L., VITALE, F., GLORIOSO, N. S., CARACAPPA, S., VESCO, G. 1999 – Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (9), pp. 2931 – 2935
37. ROMERO, G.A.S., BOELAERT, M. (2010) – Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America – A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **4** (1), e584.doi:10.1371/journal.pntd.0000584

38. ROSYPAL, A.C., TROY, G.C., ZAJAC, A.M., FRANK, G., LINDSAY, D.S. 2005 – Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, **91** (4), 970 – 972
39. SCALONE, A., DE LUNA, R., OLIVA, G., BALDI, L., SATTÀ, G., VESCO, G., MIGNONE, W., TURILLI, C., MONDESIRE, R. R., SIMPSON, D., DONOGHUE, A. R., FRANK, G. R., GRADONI, L. 2002 – Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, **104**, pp. 275 - 285
40. SCHALLIG, H. D. F. H., SCHOONE, G. J., BEIJER, E. G. M., KROON, C. C. M., HOMMERS, M., ÖZBEL, Y., ÖZENSOY, S., DA SILVA, E. S., CARDOSO, L. M., DA SILVA, E. D., 2002 – Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*, **109**(2002), pp. 1-8
41. SILVA, E. S., GONTIJO, C. M. F., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., BRAZIL, R. P. 2001 – Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **65** (6), pp. 896 – 898
42. DA SILVA, E. S., VAN DER MEIDE, W. F., SCHOONE, G. J., GONTIJO, C. M. F., SCHALLIG, H. D. F. H., BRAZIL, R. P. 2006 – Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the Endemic Area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, by Parasite, Antibody and DNA Detection Assays. *Veterinary Research Communications*, **30**, pp. 637 – 643
43. SOLANO-GALLEGO, L., BANETH, G. 2008 – Canine leishmaniosis: a challenging zoonosis. *European Journal of Small Animal Practice*, **18**, (3) pp. 232 - 241
44. SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRO, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G., BANETH, G. 2009 – Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **165**, pp. 1 – 18

45. SOLANO-GALLEG0, L., MORELL, P., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L., 2001 – Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(2), pp. 560-563
46. STRAUSS-AYALI, D., JAFFE, C. L., BURSHTAIN, O., GONEN, L., BANETH, G. 2004 – Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *Journal of Infectious Diseases*, **189**, pp. 1729 – 1733
47. VAN EYS, G.J.J.M., SHOONE, G.J., KROON, N.C.M., EBELING, S.B. 1992 – Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **51**, pp. 133 – 142