

SISTEMÁTICA DE VIGILÂNCIA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU-SP.

Carla Janeiro Coiro¹
Mariana Vincenzi²
Ana Paula Lopes Corrêa³
Felipe de Freitas Guimarães³
Helio Langoni²

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada uma endemia de controle prioritário no mundo. No Brasil, sua ocorrência vem aumentando devido principalmente, às alterações na estrutura agrária nas últimas décadas, como a migração populacional para os centros urbanos associada a mudanças ambientais. O município de Botucatu situa-se na rota de expansão da doença em território paulista. O presente estudo teve como objetivo desenvolver ações de vigilância para a LVC no município de Botucatu a partir do diagnóstico sorológico, utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e imunoensaio enzimático (ELISA), em animais atendidos no Ambulatório de Dermatologia da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, UNESP, Campus de Botucatu. No total, foram examinadas 516 amostras de soro canino com dermatopatias, todas com suspeita clínica de LVC, entretanto, nenhuma destas apresentou positividade.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina, RIFI, ELISA, saúde pública

SYSTEMATIC MONITORING FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE CITY OF BOTUCATU/SP.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is considered an endemia of priority control worldwide. In Brazil the incidence of the disease is increasing and expanding quickly due mainly changes in agrarian structure in recent decades, the great population migration to urban centers and also due to environmental changes. Botucatu city lies on the route of spread of the disease in Sao Paulo State. The present study aimed to develop surveillance action for CVL using the indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA) in animals attended at the Dermatology Ambulatory of Small Animals at the Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Botucatu. Were examined 516 canine serum samples from animals with dermatopathies suspected of CVL, however, no sample was positive.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, IFAT, ELISA, public health

¹ Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Correspondência. Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu

³ Doutorando do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu

EL SEGUIMIENTO SISTEMÁTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA EN BOTUCATU/SP.

RESUMEN

Leishmaniasis visceral canina (LVC) es considerada una prioridad en el control de enfermedades endémicas en todo el mundo. En Brasil, su incidencia está aumentando debido principalmente a los cambios en la estructura agraria en las últimas décadas, como la migración de la población hacia los centros urbanos, y los cambios ambientales. Botucatu se encuentra en la ruta de propagación de la enfermedad en el territorio estatal. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar actividades de vigilancia de la leishmaniasis visceral canina en Botucatu mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y inmunoensaio enzimático (ELISA) en animales de consulta en el Ambulatorio de Dermatología de la Clínica de Pequeños Animales del Hospital Veterinário de la Facultad de Medicina y Zootecnia de Botucatu, UNESP. Se examinaron 516 muestras de suero canino con enfermedades de piel, animales con sospecha clínica de LVC, sin embargo, ninguna de las muestras fue positiva.

Palabras clave: leishmaniasis visceral canina, IFI, ELISA, la salud pública

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecciosa de origem parasitária, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitida pelo mosquito flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Tratava-se de doença de caráter rural e periurbano, mas atualmente se encontra urbanizada, presente em grandes centros urbanos. Essa mudança é perceptível principalmente em áreas de periferia devido ao alto adensamento populacional humano e canino nesses locais (1).

A leishmaniose é considerada uma das seis endemias parasitárias no mundo, encontrando-se distribuída em quatro continentes, entre eles, América Latina, África, Ásia e Europa. Com relação aos casos humanos, 90% ocorrem, principalmente, em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (2). Nas Américas são registrados casos autóctones na Argentina, Bolívia, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Brasil, correspondendo a 90% dos casos que ocorrem no continente americano (3).

A sua importância em saúde pública se deve ao aumento do número de casos e à gravidade da doença. No Brasil já foi registrada em 20 estados, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (4), e os estudos de casos humanos e caninos mostram a urbanização da forma visceral da doença em grandes centros brasileiros (5). Entre os anos de 1984 a 2002, foram notificados ao Ministério da Saúde 48.455 casos da doença humana, sendo que os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí contribuíram com 66% das notificações (6).

No Estado de São Paulo, a LVC foi diagnosticada em 1998 na cidade de Araçatuba (região nordeste do estado de São Paulo) no serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Unesp (7). Neste mesmo ano, foram também detectados cães infectados no Município de Araçatuba (8). Até 2006, em 68 municípios das regiões administrativas de Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente e São João da Boa Vista encontrou-se o vetor *Lutzomyia longipalpis*, e em 45 deles constatou-se a transmissão da enfermidade em cães, e em 34 foram detectados também casos humanos (9). A alta densidade da população canina é um fator de risco para a ocorrência da leishmaniose visceral no homem (10).

A redução dos investimentos em saúde e educação, a descontinuidade das ações de controle, adaptação do vetor aos ambientes modificados pelo homem além do pouco

conhecimento sobre as variantes genéticas, hábitos alimentares e reprodutivos, os fatores imunossupressores, como a infecção pelo HIV e dificuldade de seu controle em grandes aglomerados urbanos, com problemas de desnutrição, condições precárias de moradia e saneamento básico são fatores que contribuem para a sua ocorrência (11).

A LVC apresenta três ciclos epidemiológicos: silvestre, doméstico e peridoméstico. No doméstico ou peridoméstico, os ambientes envolvidos são o rural, periurbano e/ou urbano. A *Leishmania* circula entre canídeos e gambás, que apesar de terem origem silvestre, estão adaptados ao ambiente rural e urbano (sinantrópicos). O vetor se mantém e consegue reproduzir no entorno domiciliar, transmitindo a enfermidade para o humanos e cães, mantendo a infecção (12).

Os sinais clínicos nos cães são semelhantes aos de humanos como febre e hepatoesplenomegalia. Apresentam ainda lesões de pele como eczema no focinho e orelhas, onicogribose e linfadenopatia. Nos casos caninos mais avançados, além das alterações de pele ocorrem também uveíte anterior, blefarite, celulite orbital, opacidade de córnea, ceratoconjuntivite seca ou não, conjuntivite, edema das patas e paresia dos membros posteriores, inanição, caquexia e morte. Entretanto, as alterações cutâneas são as manifestações mais comumente observadas na LVC (13). Em alguns animais, a doença pode permanecer latente, com raros casos de cura espontânea, ou ocorrer evolução aguda e grave, com morte em poucas semanas (4).

Na espécie canina, pode haver remissão dos sintomas por longos períodos, com posterior reaparecimento. Mais de 30% dos hospedeiros são assintomáticos, contribuindo para a manutenção da doença no ambiente (4). Os assintomáticos são um grande problema na saúde pública, pois podem não ser detectados para efetivação das medidas de controle.

O diagnóstico laboratorial da infecção canina baseia-se no exame parasitológico direto, na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e no imunoensaio enzimático (ELISA) e nesta espécie devem ser realizados inquéritos sorológicos amostrais a fim de se verificar a prevalência da doença em locais silenciosos ou com focos da doença, e censitários, para áreas com transmissão, como atividade de vigilância, uma vez que animais positivos devem ser eutanasiados, como uma das medidas para o controle da enfermidade (9).

A RIFI é preconizada pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência, juntamente com o ELISA. Resultados falso-negativos podem ocorrer no período de incubação da doença ou em fase inicial de soroconversão (14).

Em Itaipu-RJ, foi encontrada uma prevalência de 11,94% (37/310) para LVC, pela RIFI, em animais sem sinais clínicos da enfermidade (15). A soroprevalência canina no período de 1994 a 1998, em Belo Horizonte - MG foi de 3,6% (16). Esses resultados mostram a importância dos inquéritos soropidemiológicos para se avaliar o grau de risco da enfermidade no município, e para a população.

Inquérito sorológico e outras atividades de vigilância estabelecidas pela Equipe de Vigilância em Saúde Ambiental do Município de Botucatu, e pelo Hospital Veterinário da FMVZ, com encaminhamento de amostras de soro de cães com dermatopatias para diagnóstico diferencial com pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp., pela RIFI, não revelou positividade, indicando que provavelmente não há autoctonia da LVC no município (1), mas apenas a ocorrência de casos importados ou alóctones, de outras regiões (17).

O controle da leishmaniose visceral recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde a década de 70 é baseado em três pontos: diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, eliminação dos cães reservatórios e controle do vetor com aplicação de inseticidas (18). Ao longo dos anos, a aplicação, muitas vezes, parcial destas ações não proporcionou a redução da incidência da LVC (4). O controle do reservatório canino tem sido o tema mais estudado e controverso quanto sua contribuição na redução da incidência da LV humana e canina (19).

A proximidade de Botucatu com regiões endêmicas para LVC como Bauru, Marília, Araçatuba e Tupã, associadas às condições climáticas e fisiográficas propicia a manutenção da doença. A falta de controle quanto ao trânsito de cães de outras localidades, representam fatores que contribuem para o risco de introdução e disseminação desta zoonose. O controle da LVC deve ser feito de maneira estratégica, identificando-se áreas de risco e, para isso, alternativas como o inquérito sorológico canino, baseado em critérios epidemiológicos, são indicados para o seu combate e vigilância (20). A partir da análise epidemiológica realizada no município e estado, os profissionais de saúde poderão identificar e classificar as diferentes áreas e adotar as recomendações propostas para a vigilância, monitoramento e controle da leishmaniose visceral (4).

Os objetivos do presente estudo foram estabelecer ações de vigilância para LVC em Botucatu/SP capazes de monitorar a ocorrência de casos e possibilitar a determinação de sua distribuição espacial e temporal, além de obter informações para auxiliar na elaboração de um programa de saúde animal e saúde pública no Município de Botucatu.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de soro de cães suspeitos de LVC no município de Botucatu, provenientes de animais atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Veterinário da FMVZ –UNESP, campus de Botucatu/SP, durante o período, de Julho de 2008 a Julho de 2009. Estes animais deveriam atender como definição de caso:

- Suspeito I: Animal residente em Botucatu que apresentasse pelo menos três dos seguintes sintomas: linfadenomegalia, perda de peso, queda de pêlo, formação de crostas, áreas descamadas ou onicogribose.
- Suspeito II: Animal que apresentasse sorologia positiva pela RIFI e ELISA;
- Confirmado: Animal suspeito II com diagnóstico parasitológico positivo, de aspirado de linfonodo.

Quanto à população canina estudada, 284 (55,03%) e 232 (44,97%) eram machos e fêmeas, respectivamente. Quanto a procedência 463 (89,72%) nasceram em Botucatu e 14 (2,64%) eram procedentes de São Paulo, 13 (2,45%) de Pardinho, 9 (1,69%) de São Manuel, 6 (1,13%) de Bauru e 11 (2,07%) sem informação. Quanto a distribuição dos animais quanto ao local de permanência no domicílio, 70 (13,56%) no canil, 203 (39,34%) no domicílio e 243 (47,0%) no peridomicílio.

1- Reação de Imunofluorescência Indireta

A pesquisa de anticorpos anti *Leishmania* spp., foi realizada pela RIFI, segundo Camargo (21). Utilizou-se como antígeno a forma promastigota de *L. major*, mantida no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ, em meio LIT (Liver Infusion Tryptose).

2- Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA foi realizado utilizando como antígeno *Leishmania major*, cultivada em 40 mL de meio LIT, durante sete dias em garrafa de ROUX de um litro, mantida a 25°C na posição horizontal. O conteúdo da garrafa foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos em tubo falcon. O sobrenadante foi desprezado e em sequência adicionado 10 mL de PBS homogeneizando e centrifugando-se como anteriormente, repetindo-se essa operação por mais duas vezes. A seguir, o sedimento foi homogeneizado em 10 mL de PBS estéril e congelado a 20°C por 24 horas. As formas promastigotas suspensas foram mantidas a -80°C, até o momento

da sonicação. Esta foi realizada em ciclo de 50%, a 4°C por 30 segundos por seis vezes, analisando-se ao microscópio para observar se as formas promastigotas foram quebradas em pequenos fragmentos. O material obtido foi imediatamente centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos sob refrigeração a 4°C, e o sobrenadante resultante foi usado como antígeno, no qual foi adicionado PMSF (Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride) 250 mM, que é um inibidor de protease para a conservação das proteínas. O antígeno foi testado com amostras de soro de cães sabidamente positivos e negativos, para testar sua viabilidade.

Para a sensibilização das placas de ELISA, de poliestireno, de fundo chato, foram usados três microgramas de antígeno por poço totalizando 300 microgramas por placa. As mesmas foram mantidas em câmara úmida sob refrigeração, de um dia para o outro e posteriormente lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Após secagem, foram incubadas com 150 µL de PBSC (tampão bloqueio) por uma hora em estufa a 37°C. Desprezou-se o tampão e a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem e seca. Os soros testes foram diluídos em solução PBSC a 1:40 (195 µL de PBSC e 5 µL de soro). Para a diluição 1:80, foram acrescentados 50 µL de PBSC e 50 µL da diluição de 1:40. Da mesma maneira, foram diluídos dois controles positivos e quatro negativos, e dois testemunhos com 100 µL de PBSC. Após as diluições, a placa permaneceu na estufa 37°C por 30 minutos. Depois foi lavada quatro vezes com solução de lavagem para retirada do excesso de soro e secadas. O conjugado imunoenzimático usado foi uma antiimunoglobulina de cão, fração IgG, marcada com peroxidase (Sigma-Company USA), previamente titulado. Após o preenchimento de cada poço com 100 µL da solução de PBSC e conjugado, a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e em seguida lavadas com solução de lavagem por quatro vezes. Em seguida foram adicionados 100µL de substrato (5mg de -O-fenilenodiamino- OPD+ 4µL de água oxigenada a 30% + 10 mL de tampão citrato-fosfato) por orifício, e a placa mantida no escuro à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir adicionou-se 30 µL/orifício de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N para interromper a reação. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm. Os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (DO).

O ponto de corte foi calculado de acordo com a fórmula: $CO = \text{média CN} \times 2 \times X_{1,2}$, onde $CO = \text{Cut-Off}$; média CN = média da densidade óptica dos orifícios do controle negativo; 2 = fator de correção; 1,2 = número multiplicado ao valor do cut-off para embutir a zona cinza no ponto de corte.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp., em ambos os testes (RIFI e ELISA), apesar das alterações clínicas, de acordo com a tabela 1, devido a outras enfermidades ou dermatopatias, na medida em que tratavam-se de animais atendidos no Ambulatório de Dermatologia do HV.

Os resultados do inquérito sorológico sugerem que o município de Botucatu continua indene para LVC, o que já foi demonstrado em pesquisa prévia (1). Apesar dos animais apresentarem alterações sugestivas de LVC nenhum foi positivo nos testes utilizados, que são recomendados oficialmente. Enfatiza-se que casos importados de LVC já foram diagnosticados no Hospital Veterinário da FMVZ- Botucatu (4), justificando-se a importância das ações de vigilância epidemiológica e sanitárias referentes a esta enfermidade no município.

Os resultados deste estudo possibilitam também sugerir que até o momento do presente estudo o vetor, *Lutzomyia longipalpis*, não se encontra no município. Especula-se que condições climáticas, altitude ou outros fatores ambientais sejam desfavoráveis para a sua manutenção, ao se considerar a proximidade de Botucatu com municípios endêmicos e

epidêmicos, e o diagnóstico de casos importados em cães que residiam em Botucatu há algum tempo (4).

Não há nenhuma forma de controle quanto ao trânsito de cães possivelmente infectados entre áreas endêmicas e não endêmicas. A proximidade entre cidades indenes e regiões onde a doença ocorre associada às condições climáticas e fisiográficas propícias à manutenção da enfermidade, e a falta de controle quanto ao trânsito de cães provenientes de outras localidades, contribui para o risco de introdução e difusão da LVC (22), destacando-se a importância de um sistema de vigilância para a detecção precoce, no caso de sua introdução no município.

A movimentação de cães de um município para outro é um fator de risco importante na epidemiologia da LVC. No presente estudo, 53 (10,27%) dos animais eram procedentes de outros municípios e seis (11,32%) deles procediam de Bauru, onde a enfermidade ocorre de forma epidêmica (9).

Na tabela 1 pode-se observar que muitos animais apresentavam vários sinais clínicos que são clássicos na LVC como: onicogribose, emagrecimento, queda de pêlos, hepatoesplenomegalia, entre outros, porém não são específicos podendo ser comuns a outras enfermidades. A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), além de sua função de controle do reservatório canino em áreas extensas, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle é necessária (23).

Tabela 1. Alterações encontradas nos animais examinados na clínica de pequenos animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

Sinais Clínicos	N	%
Queda de pelos	428	82,94
Emagrecimento	423	81,97
Áreas de descamação	421	81,58
Crosta na pele	326	63,17
Úlceras/ferimentos crônicos na pele	299	57,94
Linfadenomegalia	192	37,20
Onicogribose	99	19,18
Hepatoesplenomegalia	89	17,24

Resultados mais práticos quanto ao controle da LVC deverão ser obtidos com o aprimoramento do conhecimento epidemiológico das características locais da enfermidade, especialmente quanto ao papel dos cães, humanos e animais silvestres, como reservatórios, para a continuidade do ciclo de transmissão da *L. chagasi* em áreas onde as medidas de controle preconizadas são corretamente executadas (23).

A relevância dos inquéritos soroepidemiológicos pode ser confirmada, pela análise da soroprevalência da LVC em cães domiciliados na zona urbana de Cuiabá com a prevalência estimada em quatro bairros estudados de 3,4%. Os autores concluíram que os principais fatores de risco identificados na ocorrência da infecção canina na cidade de Cuiabá, foram à localização dos cães no peridomicílio, bem como a proximidade das residências com matas, evidenciando mudanças na ocorrência da doença no ambiente urbano (24).

Além da importância dos inquéritos soroepidemiológicos são essenciais as atividades de educação em saúde, transmitindo para a população informações sobre a doença no cão e em humanos, envolvendo amplamente a comunidade, utilizando-se veículos de comunicação disponíveis, bem como a realização de palestras em escolas, e entidades de classe enfocando principalmente os aspectos epidemiológicos e de controle (1). É relevante ainda a utilização de coleiras repelentes em cães, principalmente nas situações com grande dispersão dos

flebotomíneos transmissores, sendo importantes ainda os inquéritos entomológicos na pesquisa de espécies de flebotomíneos presentes no município.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as ações de vigilância a partir de inquéritos soro epidemiológicos são importantes para o conhecimento da situação epidemiológica da LVC nos municípios e que apesar do resultado negativo no universo amostral pesquisado, estas ações devem ser permanentes, pois a Rodovia Marechal Rondon, considerada rota de dispersão da LVC no Estado de São Paulo, contorna grande parte do município de Botucatu. Além disso, a partir destas ações se torna possível monitorar a aparecimento de casos de maneira rápida e eficiente, obtendo desta forma informações para a elaboração de um programa de saúde animal e saúde pública no Município de Botucatu.

REFERÊNCIAS

1. Langoni H, Tome RO, Gaio FC, Generoso D, Menozzi BD. Epidemiological vigilance for canine Leishmaniasis in the country of Botucatu. *Ars Vet.* 2001;17:196-200.
2. World Health Organization. Information on leishmaniosis [Internet]. 2004 [cited 2005 Mar 22]. Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.html>
3. Vargas-Diaz E, Yépez J. Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniasis visceral en Venezuela, con especial referencia al estado Falcón. *Bol Malariol Salud Ambient.* 2004;44:9-19.
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília-DF: MS/SVS; 2005.
5. Oliveira CL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte. *Cad Saude Publica.* 2001;17:1231-9.
6. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2003.
7. Ikeda FA, Ciarlini PC, Feitosa MM. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clin Vet.* 2003;47:42-8.
8. Luvizotto MCR. Leishmaniose visceral canina autóctone no município de Araçatuba-SP. In: *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; 1999, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Anclivepa; 1999. p.24-5.*
9. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo. São Paulo: SUCEN/CCD; 2006.

10. Camargo-Neves VLF. Leishmaniose visceral americana: doença emergente no estado de São Paulo. Com Ciência – reportagens [Internet]. 2005 [acesso 2006 Jan 31]. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17.shtml>
11. Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Doenças infecciosas e parasitárias - DIP. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.398-409.
12. Genaro O. Leishmaniose visceral americana. In: Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu; 2003. p.56-72.
13. Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no centro de controle de zoonoses de Bauru-SP, com vistas ao diagnóstico da leishmaniose visceral (LV). Vet Zootec. 2009;16:343-53.
14. Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol. 2007;146:235-41.
15. Madeira MF, Serra CMB, Uchoa CMA, Duarte R, Cruz DAM, Perdomo CC. Canine leishmaniasis: a serological survey of 310 dogs in Itaipu, Rio de Janeiro, Brazil. Cad Saude Publica. 2002;16:568.
16. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;93:285-91.
17. Langoni H, Camargo LB. American visceral leishmaniasis: a case report. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2005;11:360-72.
18. Organização Panamericana de Saúde. Organização Mundial da Saúde - OPAS/OMS. Informe técnico de la 1ª Conferencia Interamericana para el control de la leishmaniasis. Mexico: Secretaria de Salud; 1987.
19. Palatnik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Mayrink A W, Genaro O. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. J Trop Med Hyg. 2001;65:510-7.
20. Oliveira CL, Morais MHF, Machado-Coelho GLL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control, Belo Horizonte, Brazil. Cad Saude Publica. 2008;24:2953-8.
21. Camargo ME. Introdução às técnicas de imunofluorescência. Rev Bras Patol Clin. 1974;10:143-69.
22. Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunocromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2352-6.
23. Julião FS, Souza BPMS, Freitas DS, Oliveira LS, Laranjeira DF, Dias-Lima AG, et al. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. Pesqui Vet Bras. 2001;27:319-24.

24. Almeida MAO, Jesus EEV, Souza-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;15:106-58.

Recebido em: 10/11/2012

Aceito em: 20/03/2013