



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

LUIZA COSTA FERREIRA

**PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM CÃES NA ILHA
DO MARANHÃO, BRASIL**

São Luís

2017

LUIZA COSTA FERREIRA

**PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM CÃES NA ILHA
DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientadora: Prof. Dra. Eloísa da Graça do Rosário Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva

São Luís

2017

Ferreira, Luiza Costa.

Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* em cães na Ilha do Maranhão, Brasil / Luiza Costa Ferreira. - 2017.

56 f.

Coorientador(a): Antônio Rafael da Silva.

Orientador(a): Eloísa da Graça do Rosário Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

1. Doenças do cão. 2. Epidemiologia. 3. Inquéritos epidemiológicos. 4. Leishmaniose visceral. I. Gonçalves, Eloísa da Graça do Rosário. II. Silva, Antônio Rafael da. III. Título.

LUIZA COSTA FERREIRA

PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Leishmania chagasi* EM CÃES NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Eloísa da Graça do Rosário Gonçalves (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente

Prof^a Dr. Antônio Rafael da Silva (Coorientador)

Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente

Dra. Zulmira da Silva Batista (Membro externo)

Médica Veterinária
Doutora em Biotecnologia – RENORBIO/UFCE

Prof^a Dra. Maria dos Remédios Freitas Carvalho Branco (Membro interno)

Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente

Prof^a Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo (Membro interno)

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciência Biológicas e da Saúde

Dedico a Deus, pelo dom da vida.
A minha mãe e noivo, pela presença
constante e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, a quem agradeço minha vida diariamente.

A minha mãe, Maria do Socorro Costa Ferreira, por me amar incondicionalmente, estar sempre ao meu lado, e se doar ao máximo em prol da minha felicidade.

Ao meu noivo Rodrigo de Melo Ghisi, pelo amor, carinho e companheirismo.

Aos amigos da 12ª turma de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da UFMA, por terem tornado estes dois anos mais que especiais, vocês foram demais!

Aos queridos Professores Eloísa Gonçalves e Antônio Rafael, pelo acolhimento e acima de tudo, por me mostrarem um lado profissional, ético e humano do cuidar do próximo, que há tempos não enxergava. A experiência vivida e compartilhada não tem preço.

A Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente e ao Centro de Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMA (CREDIP), em nome de seus funcionários e colaboradores, a quem agradeço pela disponibilidade, generosidade e parceria para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa.

Ao Conselho Regional de Enfermagem do Maranhão (Coren-MA) que possibilitou, apoiou e acreditou em minha qualificação profissional através deste programa de Mestrado.

Por fim, aos demais amigos que partilharam deste momento e que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa acadêmica.

“Em tudo quanto for fazer lembre-se de colocar Deus em primeiro lugar. Ele guiará os seus passos pelo caminho do sucesso.” cf. Pv. 36

RESUMO

O estado do Maranhão é uma região endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC). O diagnóstico é baseado em exame clínico e laboratoriais específicos, sendo também os dados epidemiológicos importantes para a suspeita diagnóstica. Esse estudo realizou inquérito soropidemiológico na população canina da Ilha do Maranhão, e buscou determinar e conhecer as regiões de maior prevalência para a infecção em cães aparentemente saudáveis, além de caracterizar o perfil clínico e epidemiológico dos animais sororeagentes e descrever os achados laboratoriais para os mesmos. Para as análises laboratoriais foram utilizados o hemograma, os valores de enzimas hepáticas (ALT), creatinina e proteínas totais e frações e para o teste sorológico, utilizado o kit teste rápido DPP® Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. A análise descritiva dos dados foi feita utilizando os programas STATA® e Epi Info®, obtendo-se médias, desvios padrões, prevalências e frequências. Foram triados 368 animais, dos quais 114 foram reagentes; a soroprevalência encontrada foi de 31% para a Ilha. Entre os municípios, Paço do Lumiar apresentou a maior prevalência para LVC, de 56,1% e o município de São Luís a menor, com 13,9%; para o perfil clínico e epidemiológico a maior parte dos animais foram machos (70,29%), sem raça definida (97,29%), com idade de seis a doze meses (37%) com peso entre 11 e 20 kg (62,38%). Em sua maioria não usavam colar anti-pulgas; 29% apresentaram ectoparasitas; 62,38% apresentaram febre e 69,38% foram considerados assintomáticos. Quanto a análise laboratorial, a anemia foi o achado mais importante. As análises laboratoriais atuam de forma complementar no diagnóstico da doença; associações de anemia em cães residentes em áreas endêmicas, devem levar à suspeita da LVC. Os resultados indicam, ainda, situação de transmissão intensa na Ilha do Maranhão e ausência de ações efetivas para o controle da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Inquéritos epidemiológicos. Doenças do Cão. Epidemiologia.

ABSTRACT

The state of Maranhão is an endemic region for canine visceral leishmaniasis (CVL). The diagnosis is based on specific clinical and laboratory tests, and epidemiological data are also important for diagnostic suspicion. This study carried out a seroepidemiological investigation in the canine population of the Island of Maranhão, and sought to determine and know the regions of higher prevalence for infection in apparently healthy dogs, besides characterizing the clinical and epidemiological profile of the seroreagent animals and to describe the laboratory findings for them. Hemogram, liver enzyme values (ALT), creatinine and total proteins and fractions were used for the laboratory analysis, and for the serological test, the Bio-Manguinhos / FIOCRUZ DPP® rapid test kit was used. The descriptive analysis was done using STATA® and Epi Info® programs, obtaining averages, standard deviations, prevalences and frequencies. 368 animals were screened, of which 114 were reagents; the seroprevalence found was 31% for the Island. Among the municipalities, Paço do Lumiar presented the highest prevalence for CVL, 56.1% and São Luís the lowest, with 13.9%; for the clinical and epidemiological profile, the majority of the animals were male (70.29%), undefined (97.29%), aged six to twelve months (37%), weighing between 11 and 20 kg (62.37%). Most did not wear anti-flea paste; 28.72% presented ectoparasites; 62.38% presented fever and 69.38% were considered asymptomatic. Regarding laboratory analysis, anemia was the most important finding. The laboratory analyzes are complementary to the diagnosis of the disease; anemia in dogs living in endemic areas should lead to the suspicion of CVL. The results also indicate an intense transmission situation in the Island of Maranhão and absence of effective actions to control the disease.

Key-words: Visceral leishmaniasis. Epidemiological surveys. Dog's disease. Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa da Ilha do Maranhão, Brasil	29
Fotografia 1	Contenção do animal	30
Fotografia 2	Coleta de sangue em veia safena	30
Fotografia 3	Tubos utilizados para armazenamento das amostras	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de cães submetidos ao teste DPP® na Ilha do Maranhão, 2012-2014.	33
Tabela 2	Descrição de variáveis analisadas segundo ficha de exame clínico de animais sororeagentes na Ilha do Maranhão, 2012-2014.	34
Tabela 3	Valores mínimos e máximos, médias e desvios padrões dos valores dos exames laboratoriais de cães sororeagentes, sintomáticos e assintomáticos, na Ilha do Maranhão, 2012-2014.	36

LISTA DE SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALUMAR	Consórcio de Alumínio do Maranhão
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DPP	<i>Dual Path Platform</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAST	<i>Fast Agglutination Screening Test</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NNN	Nivole, Novy, McNeam
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVC-LV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

RFC	Reação de Fixação do Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
TGF-β	Fator de crescimento beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TRI	Teste Rápido Imunocromatográfico
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UVZ	Unidade de Vigilância em Zoonoses

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana	15
2.2 Reservatório	16
2.3 Ciclo de transmissão	17
2.4 Aspectos patológicos e clínicos	18
2.5 Métodos diagnósticos no cão	21
2.6 Tratamento no cão	23
2.7 Medidas de prevenção e controle	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Desenho do estudo e população alvo	29
4.2 Área de estudo	29
4.3 Análise clínica e laboratorial	30
4.3.1 Exame clínico	30
4.3.2 Análises laboratoriais	30
4.3.3 Prova sorológica	31
4.3.4 Análise hematológica	31
4.3.5 Análise bioquímica	31
4.4 Análise estatística	31
4.5 Aspectos éticos e legais	32
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças zoonóticas parasitárias causadas por um grupo heterogêneo de protozoários do gênero *Leishmania spp.* A espécie *Leishmania chagasi* é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral canina (LVC) e humana no Brasil (MORAIS, 2015). A transmissão da doença se dá pela picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomya* e o cão é considerado a principal fonte de infecção no meio urbano (WERNECK, 2010).

A doença é de grande relevância para a saúde pública, pois responde por cerca de 59.000 mil óbitos anuais no mundo, resultantes de aproximadamente 500.000 mil casos novos da doença no globo, sendo considerada a segunda enfermidade de maior relevância entre as protozoonoses tropicais, segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS (2015).

Em 2014, mais de 90% dos casos novos notificados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OMS, 2015). Para Coiro et al. (2014), o Brasil é o país que mais responde por casos nas Américas.

Descrita em muitos municípios brasileiros, ao longo dos anos o ciclo da leishmaniose visceral (LV) sofreu várias mudanças; tratava-se de doença de caráter rural e periurbano, mas hoje está completamente inserida no meio urbano, dos grandes centros às periferias; nessas últimas, principalmente pelas grandes aglomerações populacionais humanas e caninas, falta de planejamento urbano e sanitário, vivência em área de mata, além da presença constante do reservatório e do vetor e, baixa ou pouca imunidade contra o parasito (BARBOSA, 2013; COIRO et al., 2014).

Outros fatores de risco nas áreas urbanas podem ser citados, como as precárias condições de vida da população e a presença do reservatório canino frequentemente no ambiente doméstico. Fatores individuais como desnutrição, fatores genéticos e coinfeção por outras doenças como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) também se revelam como agravantes na ocorrência da doença (MACHADO; SILVA; VILANI, 2016). Em particular, o estado do Maranhão possui ainda condições ambientais, relacionadas às suas características intrínsecas de região pré-amazônica, favoráveis para a perpetuação da doença, especialmente em suas regiões rurais e periurbanas de alguns municípios.

A execução de inquéritos sorológicos na população canina para avaliar os níveis de soroprevalência foi preconizado pelo Ministério da Saúde no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) como forma de acompanhar o estado de surtos e epidemias, e de avaliar a eficácia das medidas de controle aplicadas (BRASIL, 2006).

Para Abreu-Silva et al. (2008) a doença, em cães, apresenta uma situação epidemiológica peculiar, onde a presença da infecção nem sempre significa a doença ativa, e a presença de casos subclínicos está constantemente relacionada a áreas endêmicas, além de fato de casos caninos precederem temporalmente a ocorrência de casos em humanos e a prevalência da doença ser maior em cães do que em humanos.

A rápida expansão e urbanização, além da ausência de variedade de drogas apropriadas para o seu tratamento, colocam a doença como uma importante preocupação sanitária. O estudo da LV em humanos não pode ser realizado em sua completude sem perpassar pelo estudo e compressão da doença nos cães. Esse é o reservatório e principal hospedeiro do parasito, podendo ocultar a doença por muito tempo e também, ocupa posição de destaque como animal de estimação no seio familiar, havendo ainda lacunas no conhecimento a respeito de seu real papel na biologia e ciclo da doença.

Em virtude da realidade epidemiológica vivida pelo Estado, e a falta de dados atualizados no tocante à doença em cães, é essencial reunir informações para conhecer o cenário atual da epidemia de LVC, entendendo a interação entre protozoário, vetor e seus hospedeiros que permeiam de forma dinâmica a manutenção desta doença. Assim, este estudo buscou conhecer a atual situação da infecção por *Leishmania chagasi* na população canina da Ilha do Maranhão, área endêmica no Estado.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Humana

A LV em humanos é de notificação compulsória e apresenta altas taxas de incidência e letalidade; é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de cinco anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%). A razão de maior susceptibilidade das crianças se dá pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além da maior presença do vetor no peridomicílio (BRASIL, 2006).

Contudo, a infecção de adultos tem impacto na epidemiologia da doença devido a apresentação por eles de formas oligo ou assintomáticas da doença, além daquelas com expressão clínica (BRASIL, 2006). No Sudeste, a doença cresceu e quase dobrou de 2000 a 2011; porém, as regiões mais afetadas ainda são a Norte e Nordeste que, juntas, respondem pela maior parte dos casos - 71%, entre 1992 e 2011 (MONTEIRO, 2013).

No Maranhão, a capital São Luís é a principal responsável pelas notificações da doença, que se fixou de forma definitiva no ano de 1982 com a comprovação de dois casos humanos no bairro São Bernardo e quatro no São Cristóvão, seguindo-se de um surto de 32 casos nos municípios de Paço do Lumiar e São José de Ribamar (SILVA et al., 1983); a partir de então, deu-se a epidemia, com a ocorrência posterior de 1.089 casos na Ilha em um período de 15 anos, influenciado diretamente pelo deslocamento de agricultores de estados vizinhos pelo êxodo rural de famílias do interior maranhense, além da implantação de grandes empresas mineradoras como Vale do Rio Doce e Consórcio de Alumínio do Maranhão - ALUMAR (BARBOSA, 2011).

Segundo Barbosa et al. (2010), após a expansão da LV para as demais áreas da Ilha, em 1988, presenciou-se uma nova fase, onde o Estado assumiu o posto de um dos mais endêmicos para a doença. Diversos estudos revelaram índices de 20 a 60 casos/100.000 habitantes, principalmente na região metropolitana de São Luís (BARBOSA, 2011; SILVA et al., 2008; FELIPE, et al., 2011).

No período que compreendeu os anos de 2007 a 2014, 196 municípios maranhenses notificaram um total de 6.523 casos de LV em humanos (GARCES

JUNIOR, et al., 2016). Já no ano seguinte, 2015, somente no primeiro semestre, foram registrados 224 casos no Estado, dos quais 32 ocorreram na capital São Luís (MARANHÃO, 2015).

2.2 Reservatório

Até o momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença, o cão (*Canis familiaris*), sob o ponto de vista epidemiológico, é considerado o reservatório doméstico mais importante, embora estudos já tenham encontrado gatos domésticos infectados com o parasito em áreas endêmicas de vários países (VIDES, et al., 2011). Já no meio silvestre a raposa (*Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) são os principais reservatórios do parasita (BRASIL, 2006).

A importância do cão na epidemiologia da doença não reside somente no fato do mesmo apresentar altas prevalências de infecção quando comparadas à espécie humana, mas também pelo elevado número de animais assintomáticos, que pode chegar a 80% da população infectada (ALMEIDA, et al., 2010; PALTRINIERI et al., 2010). Esses servem de fonte de infecção para o vetor e, muitas vezes, deixam de ser identificados numa população devido à ausência de sintomas, ou ainda, em função de resultados falso-negativos nos exames sorológicos (MARCONDES; ROSSI, 2013).

De forma geral, os cães são afetados pela doença em todo o mundo, com exceção da Oceania, porém sua predominância é observada na América do Sul e no Mediterrâneo, onde a doença ganha novos territórios. Nessas localidades a LVC é detectada principalmente por meio de estudos de soroprevalência da infecção em cães – no sudeste da Espanha encontrou-se 20,1% de animais infectados; no sudeste da França, 14%; em Portugal 5,86%. É conhecida a existência de pelo menos 2,5 milhões de cães infectados apenas no sudoeste europeu; se considerarmos que a doença é endêmica em 88 países e que apenas 32 dispõem de serviço de notificação compulsória para a doença (OMS, 2016), existindo ainda outros hospedeiros como as raposas e marsupiais, perceberemos a relevância no contexto da saúde pública mundial que a LV ocupa (BASTOS; MADRID, 2015; CORTES et al., 2012).

Em muitas regiões brasileiras, a LVC ocorre de modo endêmico e muitos fatores podem ter corroborado para que essa realidade assim se delineasse, entre eles o

movimento de cães entre áreas endêmicas e não endêmicas, e a introdução de cães infectados em áreas não endêmicas com existência de vetores em potencial, que possivelmente geraram novos focos (DANTAS-TORRES, 2009).

A cada dia, novas pesquisas revelam taxas alarmantes para a incidência da LVC. Em Jacira, Mato Grosso, o estudo de Lazari e colaboradores (2016) encontrou 96% dos animais estudados positivos para a doença, destes, 13% assintomáticos e 85% oligossintomáticos. A pesquisa de Oliveira et al. (2015) realizada em Niterói, no Rio de Janeiro, revelou 29% dos animais estudados como assintomáticos, 29% oligossintomáticos e 15% positivos para LVC. Maia em 2013 obteve 32% de positividade para a doença nos cães participantes de seu estudo realizado em Brasília.

No Maranhão, em 2010, Barbosa et al. encontraram 67 animais positivos de um total de 100 examinados no distrito do Tirirical, município de São Luís. Felipe et al (2011) encontraram 47,8% de cães sororeagentes no município de Raposa, com alta incidência de animais assintomáticos. Braga et al. (2015) encontraram prevalência de 46% para a doença em cães em Imperatriz. Todos os estudos apenas confirmam a situação de epidemia enfrentada pelo Estado ao longo das últimas décadas.

2.3 Ciclo de transmissão

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de protozoários tripanossomídeos do gênero *Leishmania spp.* No Brasil a espécie *Leishmania chagasi* é o agente etiológico da LVC e humana, é parasita intracelular obrigatório, encontrado nas células do sistema fagocítico mononuclear de seus hospedeiros (BRASIL, 2006; WERNECK, 2010).

A transmissão se dá pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecidos genericamente por flebotomíneos. Estes insetos têm ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado desde o México até a Argentina (OVALLOS, 2011).

Conhecidos também como “cangalha”, “orelha de veado”, “asa dura”, “mosquito-palha” “birigui” e “tatuíra”, suas preferências de habitat influenciam o grau de contato que os mesmos exercem sobre os humanos. Estão bem adaptados ao ambiente peridomiciliar devido aos seus hábitos alimentares oportunistas, e no cenário

contemporâneo, *L. longipalpis* é o principal vetor da doença. Este flebotomíneo se infecta ao realizar repasto sanguíneo em animais ou homens infectados, podendo transmitir a doença ao realizar novo repasto (BARBOSA, 2011; DAVIES et al., 2000; SANTANA FILHO et al., 2012).

A infecção do mosquito se completa em 72 horas e ocorre quando há o repasto sanguíneo das fêmeas, e estas ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas do protozoário; após divisão por cissiparidade no intestino, são liberadas as formas flageladas denominadas promastigotas; estas se transformam em paramastigotas, que colonizam o esôfago e a faringe do vetor e, onde permanecem aderidas ao epitélio do flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes, gerando as formas promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2006).

Ao serem inoculados na pele do hospedeiro vertebrado, quando da picada do inseto, os promastigotas são liberados junto com a saliva e são fagocitados pelos macrófagos onde se transformam na forma aflagelada chamada amastigotas; esta forma parasitária utiliza novos macrófagos para se multiplicar, disseminando a infecção por toda a corrente sanguínea e causando danos às células do sistema mononuclear fagocitário da pele, baço, fígado e medula óssea (BRASIL, 2006; PAIXÃO, 2008).

A distribuição da LVC não é uniforme mesmo nas áreas endêmicas, mas apresenta um caráter focal e a sua ocorrência está relacionada com a distribuição do vetor. A variação na incidência e prevalência pode acontecer em função de diversos fatores, como os movimentos populacionais, modificações no ambiente, disponibilidade de reservatório, alterações naturais na população do vetor (COSTA, 2011).

2.4 Aspectos patológicos e clínicos

A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso, cujas manifestações clínicas dependem do tipo de resposta imunológica apresentada pelo animal infectado, especialmente do perfil de produção de citocinas. Esse perfil varia conforme a genética do animal, fatores inerentes ao parasito com espécie, cepa, tamanho do inócuo e possivelmente presença de substâncias específicas na saliva do vetor durante a infecção (LARANJEIRA, 2008).

A resistência à infecção está relacionada à ativação de células T CD4+ do tipo Th1, com produção de IFN- γ e IL-2. Esse tipo de resposta é induzida pela citocina IL-2

que está ativa na resposta Th1 e inibe a resposta Th2. Em resposta a ativação pelo IFN- γ , o metabolismo da L-arginina origina óxido nítrico, que age de forma microbicida sobre os parasitos presentes dentro dos macrófagos. A resposta do tipo Th2 produz IL-4 e fatores que desativam macrófagos IL-10, TGF- β e prostaglandina E2 e que induzem a diferenciação de células B para a produção de anticorpos do tipo IgG1 e IgE (MACHADO, 2008). A principal função das células Th1 é a defesa mediada pelos fagócitos contra infecções, especialmente por microrganismos intracelulares; já a do Th2 é nas reações imunes mediadas pela IgE e pelos eosinófilos/mastócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

De forma geral, o primeiro sistema comumente alterado é o hemolinfático, ocorrendo linfadenomegalia, com linfonodos apresentando alterações hipertróficas em suas regiões corticais e medulares. O aumento do baço é comum, apresentando-se firme, com sua cápsula rugosa e espessa e parênquima granular em casos sintomáticos e crônicos; nos demais casos, o órgão pode estar somente aumentado, com cápsula tensa, hiperplasia da polpa branca e pontos brancos e difusos em sua superfície (MAIA, 2013).

Na medula óssea assim como em outros órgãos linfoides, é típico a hiperplasia e hipertrofia das células; no fígado há replicação do parasito, havendo hepatite ativa crônica e eventualmente hepatomegalia. Adenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia podem estar associados a infecções bacterianas, o que pode agravar as condições clínicas do animal (CORTES et al, 2012).

Laboratorialmente, as análises do hemograma e das enzimas hepáticas são úteis. No hemograma, as alterações mais importantes a serem observadas são a anemia, que é encontrada em cerca de 50% a 70% dos cães, além de um eventual aumento das proteínas totais, com achado de hipergamaglobulinemia. Já na série leucocitária, as contagens total e diferencial de leucócitos não obedecem qualquer padrão em cães portadores da doença, pois alguns animais apresentam leucopenia enquanto outros, leucocitose (DIAS et al., 2008; LIMA et al., 2013). Já a associação de anemia, hiperproteinemia e monocitose, para animais que vivem em área endêmica, é quadro suspeito de infecção por *Leishmania chagasi* (FEITOSA et. al, 2003).

Quanto as funções hepáticas, os aumentos na atividade enzimática, bem como nos teores de bilirrubinas, não ocorrem com frequência nos cães doentes, observando-se apenas em cerca de 16% dos casos. Na avaliação renal, a azotemia ocorre em 45% dos

cães acometidos, sendo que em 38% apenas a creatinina está elevada (LAPPIN, 2004; MILHOMEM, 2013).

O quadro clínico em sua gama de manifestações varia do aparente estado sadio a um grave estágio final e pode ser confundido com outras doenças como babesiose, erlichiose, entre outros. Classicamente há a manifestação de sinais dermatológicos, onde cerca de 50% a 90% dos animais acometidos pela LVC apresentarão algum sinal cutâneo, sendo os mais frequentes a hiperqueratose, pelagem seca e quebradiça, eczemas no focinho e orelhas, perda de pelos e onicogribose (SCHIMMING; PINTO; SILVA, 2012).

Há ainda presença de hiporexia, polidipsia, apatia, anorexia, polifagia, epistaxe. Em casos avançados o animal pode apresentar também uveíte anterior, blefarite, celulite orbital, opacidade de córnea, ceratoconjutivite, conjutivite, edema de patas e membros, diarreia, melena, êmese, pneumonia, alterações neurológicas, inanição, caquexia, manifestações de infecções secundárias como piodermite, demodicose, entre outras, podendo evoluir para óbito (BRASIL, 2006; COIRO et al., 2014; TRONCARELLI et al., 2009).

Para Campos-Ponce et al. (2005), a intensidade dos sinais não depende unicamente de fatores relacionados ao parasito. Idade, genética, estado nutricional também são determinantes na expressão do quadro clínico pelo cão, sendo a desnutrição um grande fator de risco para o desenvolvimento da doença.

As alterações apresentadas pelo cão doente envolvem quase todos os órgãos face a multiplicidade de mecanismos patogênicos do protozoário, o período de incubação, a resposta imunológica do hospedeiro. Os animais podem permanecer assintomáticos ou oligossintomáticos por muitos anos, aqueles imunossuprimidos pela doença podem ter infecções oportunistas que dificultam da mesma forma o diagnóstico da doença. Segundo Faria e Andrade (2012), apesar da doença não apresentar sinais patognomônicos, a suspeita clínica se torna simples diante de casos sintomáticos, o que não representa 40% da população sororeagente. Desta maneira, a associação entre parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos é sempre necessária para um diagnóstico efetivo (FREITAS et al., 2012).

A exemplo dos achados no exame clínico, as alterações nos exames laboratoriais podem ser usadas para complementar o diagnóstico e acompanhar os estágios da doença (DIAS et al., 2008; LIMA et al., 2013).

2.5 Métodos diagnósticos no cão

Uma vez considera a suspeita da LVC, pode-se tentar o diagnóstico por meio de uma grande variedade de métodos, que empregam o uso de diversos antígenos, porém, ainda não está disponível um altamente específico e que seja de fácil execução (FARIA; ANDRADE, 2012).

Os métodos parasitológicos envolvem a demonstração ou observação de formas amastigotas do parasita com material coletado de baço, fígado, medula óssea ou de linfonodos. A partir da coleta são feitos esfregaços sanguíneos em lâminas histológicas, isolamento em culturas ou inoculação em cobaias (LIMA et al, 2013).

A identificação das formas amastigotas depende de treino, experiência e habilidade do examinador; as formas amastigotas são reconhecidas pela sua morfologia esférica e ovóide, medindo de 2,5µm, núcleo arredondado e um cinetoplasto alongado (MILHOMEM, 2013).

Para Troncarelli et al. (2009), o método é 100% específico, pois a identificação de um único parasito ao microscópio em esfregaço é suficiente para o diagnóstico da doença, porém a sensibilidade é variada, pois depende do grau de parasitemia, do tipo de material biológico colhido e do tempo de leitura da lâmina.

Com o isolamento obtido a partir da punção aspirativa, formas amastigotas do parasita podem ser inoculadas em meios de culturas especiais, contendo sangue de coelho e ágar, sendo o meio de Nicole, Novy, McNeam (NNN) o mais conhecido. Uma gota do material aspirado deve ser diluído em 0,5ml de solução salina na própria seringa e em seguida, 0,1ml desta solução é inoculada em condições estéreis em dois tubos de cultivo; as culturas são mantidas entre 24-26°C por até quatro semanas, devendo ser observadas semanalmente através de microscopia óptica comum ou invertida. Os tubos positivos devem ser encaminhados para confirmação em laboratório de referência (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos são considerados de um modo geral, muito sensíveis e específicos; os anticorpos são detectados mais precocemente do que a reação de hipersensibilidade retardada, como no teste da intradermorreação, porém possuem limitação para detecção quando existe um baixo nível de anticorpos, além de apresentar reatividade cruzada para outros tipos de leishmanioses, como por exemplo, a tegumentar.

Desta forma, a sensibilidade, especificidade e consequente eficácia dos testes estão relacionados com outros fatores (ABRANTES, 2012).

Entre os exames sorológicos disponíveis estão a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a *Enzime-Linked Immunosorbent Assay* ou ensaio imunoenzimático (ELISA) e os testes rápidos imunocromatográficos (TRI). A RIFI foi por muito tempo considerada de fácil e rápida execução, baixo custo, enquanto o ELISA ainda é recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e tem demonstrado ser bastante útil em pesquisas epidemiológicas e na utilização de inquéritos caninos (BARBOZA et al., 2006; BRASIL, 2006; SILVA et al., 2010).

No ELISA há o reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados, revelados através de uma proteína conjugada e uma enzima – peroxidase – que permite a visualização da reação antígeno-anticorpo, confirmando então o diagnóstico da doença (SILVA, 2007). Segundo Alves e Bevilacqua (2004), o teste apresenta de 90 a 100% de sensibilidade e 80 a 100% de especificidade. A principal desvantagem dessas técnicas é a limitação de especificidade, apresentando reações cruzadas com outras espécies da família *Tripanosomatidae* e mesmo com organismos filogeneticamente distantes (MELO, 2004).

Até novembro de 2011 as autoridades brasileiras em saúde pública, em consonância com o PVC-LV, adotavam como principais métodos diagnósticos sorológicos a RIFI (com titulação referência maior ou superior a 1:40) para triagem o ELISA como teste confirmatório, independentemente da presença de sinais clínicos. Entretanto, após ensaio de validação multicêntrica ocorrida naquele mesmo ano, através de Nota Técnica Conjunta nº 01/2011 (CGDTCGLAB/DEVIT/SUS/MS), o Ministério da Saúde substituiu a RIFI pelo TRI - DPP® (*Dual Path Platform*, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) para a triagem de casos de LVC, por este ser mais rápido, simples, prático, de fácil realização a partir de amostra de sangue total, soro ou plasma, além de não exigir equipamentos laboratoriais específicos e especialização tecnológica. O ELISA permaneceu como teste confirmatório (BASTOS; MADRID, 2015; NUNES et al., 2015).

O DPP® é um teste qualitativo que detecta a presença de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno, que é produto de um gene clonado a partir de *Leishmania chagasi* e contém a repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *L. donovani*. *L. chagasi* e

L. infantum, sendo a presença de anticorpos anti-rK39 indicativo de infecção (QUEIROZ JÚNIOR, 2011).

Dentre os métodos sorológicos há também o Teste de Aglutinação Direta (DAT), que busca detectar anticorpos anti-*Leishmania* em amostras sanguíneas de cães com LVC. Ele possui razoável especificidade e sensibilidade, sendo de fácil uso em campo e possuindo baixo custo, porém os antígenos utilizados não são de fácil comercialização e os resultados não são reprodutíveis. Uma variação desse teste é o *Fast Agglutination Screening Test* (FAST) que combina uma concentração parasitária mais alta com menor volume de teste, utiliza somente diluição sorológica, e enquanto o DAT pode ser lido após 18 a 20h, o FAST tem resultado em três horas (SOUZA et al., 2013).

A intradermoreação ou Reação de Montenegro, comumente realizada em humanos, é feita com a inoculação intradérmica de antígeno anti-leishmania padronizado, com leitura feita após 48h-72h, contudo este método não apresenta bons resultados para o diagnóstico da doença em cães (LIRA, 2005).

Já a Reação de Fixação do Complemento (RFC) foi utilizada por muitos anos, por, na época, possuir sensibilidade e especificidade superior ao exame direto; tornou-se amplamente difundida, contudo, reações cruzadas em títulos baixos com a doença de Chagas e a leishmaniose tegumentar americana podem ocorrer (ALVES; BEVILACQUA, 2004).

A detecção molecular pode ser realizada com a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando uma variedade de tecidos, incluindo sangue, medula óssea, aspirados de linfonodos, biópsias cutâneas, cortes histológicos de tecidos parafinados ou swabs conjuntivais (GOMES et al., 2007; QUEIROZ et al., 2010). Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para detecção do parasito, independente de imunocompetência ou histórica clínica do paciente. Possui sensibilidade e especificidade muito altas, bem próximas de 100%. As principais desvantagens desta técnica são os custos, pois necessitam de laboratórios bem equipados e a elevada habilidade técnica do profissional (LEONTIDES et al., 2002; MELO, 2004).

2.6 Tratamento no cão

A complexidade da doença faz com que não exista um completo consenso científico a respeito de seu correto manejo. Durante muitos anos a legislação brasileira

não permitiu o tratamento medicamentoso para animais doentes com medicamentos de uso humano ou sem registro pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (Portaria Interministerial - MS e MAPA - nº 1.426 de 11 de julho de 2008). Entre outros argumentos, colocava-se como principal, a pouca disponibilidade de fármacos para uso humanos e em caso de uso dos mesmos para tratar os cães doentes, poderia haver uma propagação de cepas resistentes, aos poucos limitando cada vez mais o tratamento da doença em humanos. Somente no ano de 2013 foi declarada a nulidade desta portaria. Contudo, o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), no mesmo ano, publicou nota esclarecendo que o tratamento em cães não promove a cura, permanecendo o animal infectado e como fonte de infecção por meio do mosquito transmissor e assim, posicionando-se contra o tratamento dos cães com uso de medicamento humanos (CFMV, 2013).

O tratamento colocado por Dantas-Torres et al. (2012), preconiza o uso do antimoniato de meglumina e alopurinol. Há ainda outras opções como a miltefosina com alopurinol ou apenas este último. Em recente nota técnica publicada MAPA (nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA) foi concedido licenciamento para registro do Milteforan® (miltefosina), droga de uso animal contra LVC, lançado em janeiro de 2017 e visto como grande avanço na área por clínicos e proprietários de animais (BRASIL, 2016).

Para Ait-Oudhia et al. (2012) a cura ainda está muito longe de ser obtida e o prognóstico é variável; ainda que o tratamento permita a redução da transmissão do agente pelos flebotomíneos, isso se dá por um curto período, estando a eficiência do tratamento compreendida pelo estado imune do cão, a farmacocinética e sensibilidade de cada isolado de leishmania ou a sua resistência às drogas.

2.7 Medidas de prevenção e controle

O Programa de controle da LV iniciou-se no Brasil há quase 50 anos, tendo como base três medidas principais: distribuição de forma gratuita de medicamentos específico para o tratamento em humanos, o controle do reservatório doméstico (cão) e controle do vetor. No ano de 2006 o Ministério da Saúde publicou o PVC-LV com medidas baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos em humanos, redução da

população de flebotômico, eliminação de reservatórios e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2006; VON ZUBEN;DONALÍSIO, 2016).

Atualmente o PVC-LV voltou-se para priorizar a redução da letalidade em detrimento da redução da incidência, não só pela relevância em evitar óbitos na população, mas por ser esta meta mais exequível em relação à redução dos níveis de transmissão da doença. Nesse sentido as estratégias dirigidas à população concentraram-se nas medidas de proteção individual, visando principalmente a transmissão por meio do uso de mosquiteiros, telas em portas e janelas, uso de repelentes e minimização de exposição em horários de maior atividade do vetor (WERNECK, 2016).

Todavia, estudo realizado por Von Zuben e Donalísio (2016) revelou que as dificuldades para execução do PVC-LV não esbarram apenas nas ações insuficientes para eliminação dos reservatórios e vetores. De um lado versa a intensa falta de recursos humanos e financeiros, contribuindo diretamente para a descontinuidade e/ou baixa cobertura das ações do programa; de outro há uma crescente resistência da população em permitir o acesso às residências pelas equipes do Programa para execução das ações, principalmente no que tange a execução de eutanásia dos animais positivos.

Costa (2011) relata que o último controle efetivo da doença nos países onde há elevada ocorrência da LVC, aconteceu na Índia, com a implantação do Programa Nacional de Controle da Malária em 1953, em que se deu a utilização do diclorodifeniltricloroetano (DDT) em grande escala no país, o que reduziu a incidência nas residências a níveis aceitáveis do principal vetor da doença. Entretanto, o fim do programa em 1971 permitiu que novas infecções ressurgissem.

Buscando forma de controle, a OMS preconiza, a eutanásia em áreas endêmicas, uma vez que o cão seja identificado como a principal fonte de infecção para o homem e agente de propagação da doença (BRASIL, 2006). Contudo, Dietze et al (1997) já verificavam que apesar da eliminação de cães em áreas endêmicas, o número de notificações da doença em humanos demonstrava que esse critério necessitava ser reavaliado.

Novas alternativas de controle da afecção são uma necessidade para que se alcance a redução do número de casos, e da expansão da doença, com estratégias que possam bloquear ou minimizar o contato do vetor com o reservatório, controlando assim a transmissão.

Nos últimos anos outras alternativas para o controle e surgimento de LVC ganharam os mercados como o uso de coleiras impregnadas de inseticidas, banhos periódicos também com inseticidas, uso de repelentes *spot-on*, vacinação e telagem de canis com uso de malhas finas (BRASIL, 2006).

A permetrina e a deltametrina, presentes em coleiras, são potentes inseticida da família dos piretróides e atuam sobre os insetos, primeiramente por contato e depois por ingestão, levando à morte quase imediata do inseto - seu efeito pode durar até seis meses. O efeito epidemiológico desse tipo de tratamento age não apenas pela redução do número de flebotomíneos que alimentam-se nos cães, mas também pela redução da sobrevivência daqueles que se alimentam, reduzindo assim a possibilidade de transmissão da LVC (KAZIMOTO, 2016).

Estudos revelam que o uso da coleira conseguiu controlar a incidência da doença nos animais, bem como a redução da taxa de repasto sanguíneo do vetor e também seu tempo de vida dos insetos (RIBAS et al., 2013; KAZIMOTO, 2016; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Associado ao uso da coleira existem vacinas para cães na rede privada. A primeira desenvolvida foi a Leishmune® de propriedade da empresa Zoetis Saúde animal, porém, teve seu uso descontinuado pelo MAPA em 2014, permanecendo no mercado apenas a Leish-Tec®, comercializada desde 2007 pela Hertape Calier Saúde Animal (BRASIL, 2014; QUEIROZ JÚNIOR, 2011).

O saneamento ambiental também é uma importante medida dirigida ao controle do vetor. O manejo ambiental com a limpeza dos espaços públicos e dos quintais domésticos, com eliminação de resíduos orgânicos pode modificar condições que propiciam a proliferação do vetor. Já aquelas ações direcionadas para o uso de inseticidas, atingem apenas o mosquito, não comprometendo seus criadouros, assim, torna-se ação pontual para ocasiões epidêmicas, onde é necessária rapidez para redução da população vetorial (BASTOS; MADRID, 2015; BRASIL, 2006; WERNECK, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* em cães na Ilha do Maranhão.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar áreas de maior prevalência da infecção;
- b) Caracterizar o perfil clínico e epidemiológico dos cães sororeagentes;
- c) Descrever os principais achados laboratoriais dos cães sororeagentes.

4 METODOLOGIA

Os dados utilizados neste estudo fizeram parte da pesquisa “Ensaio clínico randomizado, controlado com placebo, para avaliar a eficácia da vacina KSAC mais adjuvante para prevenir a transmissão da leishmaniose visceral canina (LVC) em áreas onde a doença é endêmica no Brasil” (SILVA et al., 2015).

Como estudo multicêntrico, foi desenvolvido em três capitais, Fortaleza, Teresina e São Luís, onde cada cidade precisou selecionar 180 cães sadios para receberem a vacina ou placebo no decorrer da pesquisa. Para o protocolo da vacina foram incluídos no estudo cães, machos e fêmeas, com endereço conhecido, com idade de seis meses a seis anos, aparentemente saudáveis, e cujos donos assinassem termo de consentimento livre e esclarecido para a pesquisa. Foram excluídos os animais de rua ou com dono sem endereço conhecido, com gestação em andamento, em período puerperal, com vacinação prévia anterior a 30 dias, em uso de corticoides e/ou outros supressores, que apresentassem alterações clínicas ao exame físico no dia da coleta ou que os donos apresentassem recusa da assinatura do termo de consentimento (Anexo 3).

A partir da análise de estudos anteriores sobre incidência e prevalência de LVC na Ilha, foram selecionados dois bairros sabidamente endêmicos para a doença em cada um dos municípios. Os moradores foram contatados por meio de lideranças locais, e antes das coletas, foram feitas reuniões com os possíveis participantes para apresentação da equipe de trabalho, conscientização quanto à adesão ao estudo, esclarecimento de dúvidas e questionamentos, oitiva de sugestões quanto à dinâmica do serviço e confirmação da participação dos interessados. Três dias antes da coleta os proprietários foram contatados por telefone, além de receberem uma correspondência para se fazerem presentes no local marcado para realização do exame clínico, coleta de sangue, teste rápido e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

No período de outubro de 2012 a outubro de 2014, foram cadastrados 875 animais nos quatro municípios, dos quais 255 não compareceram no dia da coleta e 244 foram eliminados antes de chegarem a fase do teste sorológico em razão de motivos diversos, como falecimento, gestação, condições clínicas ruins no dia da coleta, entre outros, restando então 368 animais. Destes, 114 foram sororeagentes para LVC.

4.1 Desenho do estudo e população alvo

Trata-se de um estudo retrospectivo, ecológico, com caráter descritivo e quantitativo, com dados obtidos a partir de banco de dados, oriundo de investigação epidemiológica, por meio de inquérito canino com cães domiciliados nos municípios da Ilha do Maranhão.

A partir da análise e processamento dos dados pesquisados, foi possível traçar o perfil epidemiológico e clínico dos animais sororeagentes para LVC. Durante a realização da fase de triagem do estudo, que compreendeu o período de outubro de 2012 a outubro de 2014 foram selecionados 875 cães, dos quais foram testados 368.

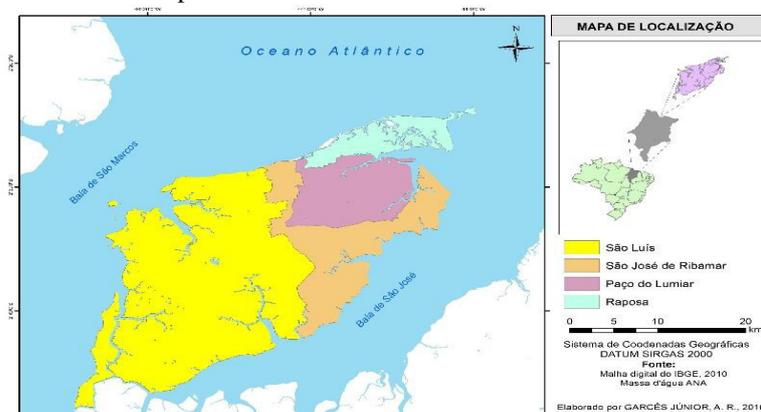
Para o presente estudo, foram analisados apenas aqueles animais positivos encontrados durante a fase de coleta no projeto da vacina e cujas fichas dos exames clínicos e laboratoriais puderam ser resgatadas, totalizando 101 animais.

4.2 Área de estudo

O local escolhido para o estudo compreende a Ilha do Maranhão, em seus quatro municípios, a saber, São Luís, Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar – figura 1. A Ilha está situada na latitude 38.5278° e longitude -28.62342° .

A população estimada no ano de 2016 na Ilha é de 1.409.162 habitantes, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016). O clima é do tipo tropical quente e úmido, típico da zona equatorial, apresentando duas estações distintas, o período chuvoso, de janeiro a junho e o período quente e seco com ventos frescos, de julho a dezembro.

FIGURA 1: Mapa da Ilha do Maranhão.



Fonte: GARCÉS JÚNIOR, A. R., 2016.

4.3 Análise clínica e laboratorial

4.3.1 Exame clínico

Os cães que compareceram no dia da triagem foram submetidos à exame físico para observação de sinais comumente presentes na LVC como onicogribose, hepatoesplenomegalia, anorexia ou emagrecimento acentuado, feridas na boca e focinho, além de condições agudas ou crônicas que pudessem mascarar sinais e sintomas da doença. Na ficha de coleta de dados dos animais foi assinalado ainda peso do animal, temperatura retal, presença ou ausência de ectoparasitas, raça, idade, sexo, além do bairro de residência. Todos esses itens foram registrados no formulário de coleta de dados (Anexo 1). A depender da intensidade dos sinais e sintomas apresentados pelo animal, estes foram avaliados pelo Médico Veterinário participante da equipe, que optou ou não pela permanência do cão no estudo.

4.3.2 Análises laboratoriais

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção das veias cefálica, safena ou jugular dos cães, com a retirada de 5-7ml de sangue venoso com seringa apropriada, armazenado em tubos com e sem ácido etilenodiamino (EDTA). Após concluídas as coletas do dia, as amostras foram transportadas para o laboratório Cernitas®, que em parceria com a UFMA realizou as análises. Após refrigeradas e centrifugadas, foi feito a separação do soro das demais frações, que foi conservado a 0° C para posterior análise.



FOTOGRAFIA 1: Contenção do Animal.
Fonte: FERREIRA, L. C., 2016.



FOTOGRAFIA 2: Coleta de sangue em veia safena.
Fonte: FERREIRA, L. C., 2016.

FOTOGRAFIA 3: Tubos utilizados para armazenamento das amostras.



Fonte: FERREIRA, L. C., 2016.

4.3.3 Prova sorológica

Para o teste rápido foi utilizado o kit DPP-rK28 (Anexo 2) conforme instruções do fabricante. O teste diagnóstico rápido para leishmaniose, realizado em amostra individual, permite determinar rapidamente se o cão cumpre o critério de inclusão de soronegatividade para esta doença. A leitura é simples e determinada pela presença ou ausência, respectivamente, da linha vermelha da Plataforma dupla (DPP) do teste rápido da Chembio® para leishmaniose visceral canina, utilizando o antígeno rK28.

4.3.4 Análise hematológica

A análise hematológica foi constituída da realização de hemograma, atentando-se para os resultados da hemoglobina e hematócrito.

4.3.5 Análise bioquímica

Na análise bioquímica foram analisados e utilizados os resultados dos seguintes parâmetros: enzima ALT, níveis de creatinina e proteína total e frações.

4.4 Análise estatística

Os animais soropositivos foram classificados segundo a presença de sinais sugestivos da LVC, em assintomáticos (sem nenhum sintoma) e oligossintomáticos (presença de um ou mais sintomas), de acordo com os critérios estabelecidos no protocolo da pesquisa para avaliação da eficácia da vacina KSAC na prevenção da LVC em áreas

do Brasil com calazar endêmico. As variáveis analisadas compreenderam sexo, localização geográfica, uso de colar anti-pulgas, temperatura retal, idade em meses, condições gerais de estado físico, presença de sinais dermatológicos, oculares, epistaxe, artrite, enfartamento ganglionar ou esplenomegalia. A descrição dos dados foi feita utilizando os programas STATA® e Epi Info®, obtendo-se prevalência, médias, frequências e desvios padrões. Foram utilizados como padrão de referência nas análises laboratoriais, aqueles utilizados pelo laboratório Cernitas®.

4.5 Aspectos éticos e legais

Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Maranhão em 2013 sob número 40/2012 (Anexo 4).

5 RESULTADOS

No período inicial do estudo foram selecionados 875 animais para participarem; destes, 368 foram testados (42,05%) e os demais foram excluídos da pesquisa, ou por não comparecerem nos dias de coleta, ou por não apresentarem condições clínicas para participação. Dentre os animais testados, 114 apresentaram resultado sorológico positivo (31%) e 254 não foram reagentes (69%).

À distribuição geográfica dos casos (Tabela 1), observou-se que a maior prevalência encontrada foi no município de Paço do Lumiar (56,1%), seguido de Raposa (41,2%), São José de Ribamar (27%) e São Luís (13,9%).

Tabela 1: Distribuição de cães submetidos ao teste DPP® na Ilha do Maranhão, 2012-2014.

LOCALIDADE		Animais testados	Reagentes	Não Reagentes
São Luís	S. Raimundo	149	17	132
	Cajupe	9	5	4
Total	n	158	22	136
	%	100%	13,9%	86,1%
Raposa	Bom Viver	52	19	33
	Vila Nova	14	5	9
	Vila Maresia	14	9	5
Total	n	80	33	47
	%	100%	41,2%	58,8%
Paço do Lumiar	Pirâmide	54	28	26
	Vila Talita	28	18	10
Total	n	82	46	36
	%	100%	56,1%	43,9%
S. J. de Ribamar	Panaquatira	31	8	23
	Pq Canavieira	17	5	12
Total	n	48	13	35
	%	100%	27%	73%
TOTAL GERAL	n	368	114	254
	%	100%	31,0%	69,0%

Na Tabela 2, são expostas as variáveis analisadas a partir dos dados compilados nas fichas de exame clínico dos animais. Para o perfil epidemiológico verificou-se quanto ao sexo que, a predominância deu-se pelos cães machos, 70,29%, enquanto as fêmeas somaram apenas 29,71%. Quanto ao item raça, percebeu-se que a maior parte dos animais estudados, que somaram 97,29%, não possuía raça definida. Destaca-se que a faixa etária de maior ocorrência foi aquela que compreendeu cães de

seis a 12 meses de idade, contemplando 37 animais, seguida daquela de 13 a 24 meses, com 26 cães ou 26% do total de animais.

Para a variável peso, a predominância foi daqueles compreendidos na faixa de 11 a 20kg (62,38%), seguidos da faixa de peso até 10kg (24,75%). A variável “uso do colar anti-pulgas” foi classificada em ausente ou presente, onde 62 animais não faziam uso da coleira (98,41%). É importante ressaltar que apenas em um animal foi verificado a presença deste aparato. Um dado importante a ser destacado é a presença de ectoparasitas, onde foram vistos principalmente pulgas e carrapatos. A maior parte dos animais não os apresentou, contudo ainda foi identificado a presença de um desses ou ambos em 29 cães (29%).

Relativo a sintomatologia clínica apresentada, é relevante salientar que a maior parte dos cães foi considerada sem sintomas (69,38%), porém 30 (30,62%) apresentaram alguma ou mais de uma das seguintes alterações: alopecia, linfadenopatia, diarreia, úlcera e uveíte. Já para o item temperatura, 63 cães (62,38%) obtiveram valores acima de 39,5°C, medida caracterizada como febre.

Tabela 2: Descrição de variáveis analisadas segundo ficha de exame clínico de animais sororeagentes na Ilha do Maranhão, 2012-2014.

Variável (n)	n	%
Sexo n=101		
Macho	71	70,29
Fêmea	30	29,71
Raça n=74		
Sem Raça Definida	72	97,29
Outros*	02	2,71
Faixa etárias em meses n=100		
06-12	37	37,00
13-24	26	26,00
25-36	18	18,00
37-48	12	12,00
49-60	05	5,00
Acima 61	02	2,00
Peso em kg n=101		
Até 10	25	24,75
11 a 20	63	62,38
Acima de 21	13	12,87
Colar anti-pulgas n=63		
Ausente	62	98,41
Presente	01	1,59
Ectoparasitas** n=100		

continua

Variável (n)	n	conclusão
		%
Ausente	71	71,00
Presente	29	29,00
Sinais e sintomas n=98		
Assintomáticos	68	69,38
Oligossintomáticos***	30	30,62
Temperatura n=101		
Afebril	38	37,62
Febril****	63	62,38

*Pitbull. **Pulgas e carrapatos. ***Alopecia, linfadenopatia, úlcera, uveíte e diarreia. ****Febril: temperatura retal acima de 39,5°C – segundo protocolo da vacina KSAC.

Para a descrição dos achados laboratoriais, foi possível o resgate de 98 fichas. Os dados da Tabela 3 mostram os valores mínimos e máximos, além das médias mais os desvios padrões encontrados à análise desses exames, dos animais sororeagentes. Tais valores foram divididos em dois grupos, segundo a sintomatologia apresentada pelo animal, cuja classificação deu-se em sintomáticos e oligossintomáticos, conforme já mencionado na Tabela 2. Os valores utilizados como referenciais foram aqueles descritos pelo laboratório Cernitas®, que processou as amostras. Ressalta-se que a presença destes sintomas não foram considerados critérios de exclusão para participação no estudo vacinal, pois em um contexto geral o animal apresentava-se aparentemente saudável.

Destaca-se que em ambos os grupos os animais apresentaram anemia, com hematócrito abaixo dos valores de referência ($34,40 \pm 7,37$ e $35,64 \pm 7,06$ para o grupo dos sintomáticos e assintomáticos respectivamente), onde 60% dos cães soropositivos estavam anêmicos. Já os valores da enzima hepática ALT ($54,20\text{U/L} \pm 25,11$ para sintomáticos e $52,94\text{U/L} \pm 22,75$ para assintomáticos) e da proteína total ($7,45\text{g/dL} \pm 1,62$ para sintomáticos e $7,33\text{g/dL} \pm 1,20$ para assintomáticos) ficaram acima dos valores de referência em ambos os grupos.

A creatinina, em ambos os grupos, foi o único índice para os quais os valores ficaram dentro da faixa de normalidade preconizada segundo os valores de referência utilizados. No grupo dos cães sem sintomas o valor encontrado foi de $1,19\text{ mg/dL} \pm 0,36$ e naqueles que manifestaram sintomas foi ligeiramente menor, $1,18\text{mg/dL} \pm 0,31$.

Tabela 3 – Valores mínimos e máximos, médias e desvios padrões dos valores dos exames laboratoriais de cães sororeagentes, sintomáticos e oligossintomáticos, na Ilha do Maranhão, 2012-2014.

Índice	Sintomáticos média ± DP (n=30)	Sintom. valores mín- max	Oligossintom. média ± DP (n=68)	Oligossintom. valores mín-max	Valor de referência
	p = 0,00	p = 0,00	p = 0,00	p = 0,00	p = 0,00
Hematócrito (%)	34,40±7,37	11-44	35,64±7,06	18-50	37 - 55 %
Creatinina (mg/dL)	1,18±0,31	0,9-2,6	1,19±0,36	0,6-3,20	0,5 - 1,5 mg/dL
ALT (U/L)	54,20±25,11	20-144	52,94±22,75	8-114	até 50 U/L
Proteína total (g/dL)	7,45±1,62	4,8-10,7	7,33±1,20	4,83-10,4	5,4 - 7,1 g/dL

Todos os dados passaram por análise estatística, porém não houve significância nos resultados encontrados quando comparados os grupos dos animais sintomáticos e oligossintomáticos.

6 DISCUSSÃO

A presente pesquisa buscou conhecer a realidade epidemiológica presente na Ilha do Maranhão quanto a presença da *Leishmaniose chagasi* nos cães e buscou traçar de forma objetiva o perfil clínico e laboratorial destes animais. Ao início do estudo do protocolo da vacina KSAC, buscava-se um grupo de 180 animais saudáveis para integrarem a pesquisa, contudo, durante as primeiras coletas foi notado grande dificuldade para perfazer tal quantia, fato comprovado quando é visto a quantidade de animais incluídos para a triagem, mais que o triplo.

Durante o período de coleta, a prevalência encontrada na Ilha foi de 31%, com destaque para o percentual mais elevado, encontrado no município de Paço do Lumiar (56,1%). Valores elevados de soroprevalência foram observados em outras localidades como em Niterói/RJ, cujo estudo epidemiológico com cães encontrou positividade em 21,8% da população estudada (OLIVEIRA et al., 2015). Em Cuiabá/MT, Almeida et al. (2010) encontraram prevalência de 38%, ao realizarem investigação de casos caninos por meio de sorologia e citologia.

Já valores menores foram encontrados no distrito de Monte Gordo, Camaçari-BA, por Silva et al. (2010) com 14,8% dos 358 cães positivos. Superior a esses valores, Barbosa et al. (2010), em inquérito epidemiológico realizado na cidade de São Luís, encontraram incidência de 67% de animais positivos para *Leishmania spp.* Dentre os bairros investigados, o do Cajupari apresentou à época índice de 94% de positividade. Em relação ao município de São José de Ribamar, Dias et al. (2008) encontraram prevalência de 36,84%, valor maior do que o encontrado neste estudo (27%). Esses achados, quando relacionado aos dados encontrados nesta pesquisa, indicam possível redução na ocorrência da doença, contudo, ainda, permeando valores muito elevados.

O processo de expansão da doença na Ilha se deu, e ainda hoje se dá, principalmente em bairros periféricos, pois estes ambientes preservam características rurais e semi-rurais, com residências localizadas em ruas muitas vezes não pavimentadas, quando não isoladas, rodeadas por grande número de plantas e árvores. Apesar do grande número de moradias de alvenaria, a cobertura de esgotamento sanitário e coleta seletiva de resíduos ainda é insuficiente (CORREA et al., 2010).

Para a distribuição quanto ao sexo, semelhante a esta pesquisa, Silva et al. (2010) encontraram 41,95% de fêmeas e 57,8% machos, além da maior parte dos animais não possuírem raça definida (57,8%) em Camaçari/BA; nesse mesmo estudo a correlação das variáveis sexo, idade, raça e porte de animais com a positividade para a LVC não foi estatisticamente significativa. Estudo realizado por Oliveira et al. (2010) em Dias D'ávila/BA também não evidenciou relação entre características fenotípicas como raça, sexo e faixa etária com a positividade para a LVC, contudo, observaram maioria de sororreagentes machos (52,3%) e sem raça definida (90%).

Os principais estudos realizados no Brasil até o momento apontam que não existem evidências que relacionem a maior incidência da doença em cães com características do animal como sexo, raça e faixa etária. Contudo, parece haver uma menor incidência em raças de menor porte, por estas viverem a maior parte do tempo dentro do domicílio (GONTIJO; MELO, 2004) e conseqüentemente maior nos animais de maior porte que geralmente são criados em ambiente externo, estando mais expostos ao flebotomíneo (AGUIAR et al., 2007).

Referente ao uso de coleiras medicamentosas como fator de proteção para o cão, Kazimoto (2016) verificou em seu estudo que o uso de coleiras impregnadas de deltametrina a 4% reduziu em cerca de 55% o risco de adoecimento para LVC. Ribas et al.,(2013) também encontrou o uso de coleiras medicamentosas como mais eficiente do que outras medidas de controle como a eutanásia de cães positivos e outras ações de controle do vetor.

O valor encontrado neste estudo para animais sintomáticos ficou em torno de 30% e o de oligossintomáticos de 70%. Para Marcondes e Rossi (2013), o número de animais assintomáticos em uma população infectada pode chegar a 80%. Silva et al. (2010) também encontraram valores próximos para animais assintomáticos em seu estudo (63,7%). Oliveira et al. (2015), no universo de animais positivos por eles estudados, encontraram 29,4% assintomáticos, e, semelhantes 29,4% foram considerados oligossintomáticos. Oliveira et al (2010) ao estudarem uma população de cães domésticos no interior da Bahia encontraram 2,4% de sua população soropositiva sem sintomas e 47,6% sintomáticos. Lazari et al. (2016) ao estudarem 101 cães sororreagentes, encontraram apenas um animal foi assintomático, ficando os demais oligo (13,86%) ou sintomáticos (85,14%).

No presente estudo, os sinais clínicos observados foram linfadenopatia, uveíte, diarreia, alopecia e úlcera. Linfadenopatia e alopecia, também foram os sinais clínicos mais encontrados por Oliveira et al. (2010), além da onicogrifose e dermatites esfoliativas.

A temperatura retal acima de 39,5° (definida como febre no protocolo da vacina KSAC) esteve presente em 63 cães, dos quais, 29 animais (46%) não a apresentaram conjuntamente a outro sintoma. Segundo os estudos de Pastorino et al. (2002), ao avaliarem 78 animais em seu estudo, observaram a febre como sintoma presente em 96,1% dos animais. 67 animais (85,7%) eram positivos. A febre associada a outros sinais presentes na LVC deve ser um indicativo para investigação de casos em áreas endêmicas. Cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo, sendo a forma assintomática relatada em proporções que podem representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva, o que dificulta o diagnóstico da doença e demonstra a necessidade da confirmação laboratorial (ABRANTES, 2012).

Medeiros et al. (2008) encontraram para proteína plasmática em animais sororeagentes, valor médio de $8,6 \pm 1,5$ g/dL, valor bem acima do encontrado neste estudo e que pode ser considerado como quadro de hiperproteinemia.

Exames hematológicos em cães infectados por *Leishmania chagasi* são considerados complementares ao diagnóstico da LVC por mostrarem resultados inespecíficos, porém importantes para avaliar o status clínico do animal. Os achados hematológicos mais constantes são anemia normocítica, normocrômica e não regenerativa e trombocitopenia (REIS et al., 2006).

Na LVC a anemia pode ocorrer por diferentes mecanismos: eritropoiese reduzida devido ao caráter crônico da doença, perda de sangue, lise de hemácias e diminuição eritrocitária por produção de auto-anticorpos que levam ao sequestro esplênico (MEDEIROS et al., 2008). Neste estudo os valores médios observados no hematócrito também caracterizam anemia.

Fator diagnóstico importante na análise dos exames hematológicos, o valor médio encontrado para proteína total plasmática em ambos os grupos releva discreto aumento, não evidenciando hiperproteinemia. Contudo, na LVC a hiperproteinemia é mais frequente e decorre da ativação policlonal de linfócitos B e consequente produção elevada de anticorpos o que pode levar a valor além de 10g/dL, ainda que ocorra

hipoalbuminemia. Este quadro é mais frequente em animais com estado clínico avançado (SILVA et al., 2010).

Os achados hematológicos e bioquímicos exercem papel complementar para o diagnóstico da LVC, e quadros como anemia, hipoproteïnemia, azotemia, quando ocorrerem em cães residentes em áreas endêmicas para a doença, são sugestivos da doença e deve ser sempre pensada como hipótese clínica, devendo ser solicitados exames diagnósticos mais específicos, como as provas sorológicas e parasitológicas.

Considerando-se em um panorama geral, o PVC-LV fundamenta-se no fato da ecologia e epidemiologia da doença serem bastante complexas, entre elas a elevada adaptação do vetor que acarreta constantes reativações de ciclos da doença. Há que se considerar ainda que o esse programa foi instituído em 1963, época em que a doença era essencialmente rural, concentrada no Norte-Nordeste, acometendo uma população sem estudo e com condições precárias de saneamento básico, quadro já transformado em relação ao cenário atual (BRASIL, 2006). Assim, uma revisão e reestruturação são necessárias, com mudanças abrangentes.

Silva et al. (2008) em estudo realizado na capital São Luís, destacaram como fragilidades do programa na capital à época, a falta de recursos financeiros, humanos e de insumos, além da inexistência de planejamento de ações que permitissem continuidade e sustentabilidade das mesmas. Foi referido ainda que as ações desenvolvidas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) local, como recolhimento e eutanásia de cães positivos, eram feitas de forma descontinuada, assim como as ações de controle ao vetor. Tais fatos refletem a situação ainda presente nos dias atuais, visto que tal Centro foi interditado judicialmente em 2012 por falta de condições estruturais para atendimento aos animais, sendo realocado para novo prédio somente em 2016, porém sem realizar suas atividades de forma regular até o fim do mesmo ano. Segundo dados recentes do atual Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ), até o primeiro semestre de 2016 a população de animais de rua na cidade de São Luís beirava os 15 mil animais.

Souza et al. (2008) ao estudarem o impacto de medidas de prevenção em áreas de alta incidência de leishmaniose visceral em humanos em um município da Bahia, dentre elas a borrifação de inseticidas nas residências e triagem e eliminação de cães portadores, não encontraram relevância estatística em seu estudo, porém observaram redução de até 29% dos índices de infecção da doença em humanos, quando comparada às áreas que não sofreram essas medidas como aquelas de grupo controle.

Entre os principais entraves vividos ao longo das décadas de existências do Programa dentro do Governo brasileiro, temos aqueles relacionados às dificuldades financeiras e de recursos humanos para execução das diretrizes, a dificuldade da aceitação pela população da eutanásia de animais positivos; somado a outras dificuldades como a baixa prioridade da doença frente a outras endemias, o baixo impacto das ações de educação em saúde, problemas crônicos de saneamento ambiental (WERNECK, 2016).

Há necessidade de acelerar os diagnósticos em humanos e o serviço chegar até o doente em uma fase inicial da doença, onde as possibilidades de tratamento sejam maiores, ofertando condições para execução do tratamento, o que perpassa por entraves reconhecidos em aspectos maiores no Sistema único de Saúde; o incentivo e fomento às pesquisas que buscam melhorar tecnologias para diagnóstico, tratamento e controle da doença; fortalecimento da participação e o controle social nas ações de saneamento ambiental e controle da doença.

A base do pensamento complexo está pautada na multidisciplinariedade do conhecimento, envolvendo questões que perpassam a pesquisa, a política e o planejamento de ações em saúde pública. Neste sentido, percebe-se que a efetividade do controle da LV neste país só será possível se houver sincronismo entre os atores desta história, destacando-se os papéis relevantes ocupados por agentes do poder público, que ao legislarem sobre questões voltadas à doença, tenham em mente a necessidade de acompanhar os avanços no campo do conhecimento e da tecnologia.

As doenças precisam ser encaradas em um contexto holístico, de forma integrada pelas diversas esferas de gestões, principalmente no que tange as divisões e limites geográficos dos territórios envolvidos, preconizando um enfrentamento conjunto, com ações coletivas. A exemplo de tais iniciativas, como contribuição e retorno da pesquisa que envolveu o protocolo da vacina KSAc para os municípios participantes, foram encaminhados pelos pesquisadores responsáveis, relatórios da situação encontrada em cada localidade aos gestores municipais de saúde.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que os quatro municípios apresentaram altas taxas de prevalência, caracterizando, assim a Ilha do Maranhão, em seu aspecto metropolitano, como área prioritária para controle, necessitando de ações efetivas e contínuas de vigilância e controle da doença. Os municípios de Raposa e Paço do Lumiar, municípios populacionais menores e com menor arrecadação financeira foram os que apresentaram maiores taxas de incidência da LVC.

Os cães portadores e reservatórios da doença nesses municípios são principalmente aqueles sem raça definida, muitas vezes retirados da rua para serem criados em lares com poucas condições financeiras, sanitárias, onde os cuidados com a saúde animal não são prioritários em detrimento às necessidades da família. Os exames laboratoriais mais facilmente realizados não são suficientes para um diagnóstico completo, porém, em área endêmica, são fortes indícios para se pensar na doença.

Observa-se que os territórios envolvidos não apresentam dados com atualizações rotineiras, não possuem ações constantes, ainda possuem orçamento restrito para seu enfrentamento, tornando dificultoso o embasamento e definição de estratégias para o combate à doença. A falta de integração nas políticas públicas de saúde que permeiam essa e outras doenças negligenciadas, entre os municípios envolvidos, também é um fator negativo para o avanço nas ações.

Uma significativa parcela dos animais sororeagentes apresentou-se assintomática, contudo, convivem livremente na sociedade, fazendo com que a infecção circule de forma constante e silenciosa entre as famílias. Frente às análises laboratoriais, evidenciou-se que os exames como hemograma, ALT, proteínas totais e creatinina colaboram de forma complementar para o diagnóstico, devendo sempre levarem a essa suspeita diagnóstica em áreas de ocorrência da doença.

A discussão da LV ultrapassa contextos dentro da área da saúde e expande sua problemática para outros campos como a política, economia, qualidade de vida. Medidas de controle e vigilância são questionadas a todo tempo por seus elevados custos para execução, e também por sua baixa ou pouco efetividade.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. B.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 580.

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

ABREU-SILVA, A. L., et al. Soroprevalência, aspectos clínicos e bioquímicos da infecção por *Leishmania* em cães naturalmente infectados e fauna de flebotômico em uma área endêmica na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** n. 17, supl. 1, p.197-203, 2008.

AGUIAR, P. H. P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v. 4, ano 8, p. 283-294, 2007.

AIT-LOUDHIA, K. et al. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 187, p. 386-393, 2012.

ALMEIDA, et al. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 07, p. 1610-115, jul. 2010.

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

BARBOSA, D. S. et al. Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica do município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 3, p.653-659, jul./set. 2010.

BARBOSA, D. S. **Distribuição espacial e definição de áreas prioritárias para vigilância da leishmaniose visceral no município de São Luís, Maranhão, Brasil**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Saúde Pública). Escola

Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz – ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2011.

BARBOSA, I. R. Epidemiologia da leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Rev. Epidemiol. Control. Infect.**, Ano 3, v. 3, n. 1, p. 17-21.2013.

BARBOZA, D. C. P. M. et al. Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** v. 7, p. 152-163, 2006.

BASTOS, T. S. A. e MADRID, D. M. C. Aspectos gerais da leishmaniose visceral. **Vetsmart.** vol. I, n. 3, p. 04-21, 2015.

BRAGA, G M. S. et al. Leishmaniose visceral em cães naturalmente infectados no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA E CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 42, 2015. Curitiba. **Anais eletrônicos.** Curitiba: 2015. p. 1713-1717.

BRASIL. **Decreto Presidencial nº 51.838**, de 14 de março de 1963.

_____. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1.426**, de 11 de julho de 2008.

_____. Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta n. 01**, de 29 de dezembro de 2011. Presta esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Disponível em: <
http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf>. Acesso em 03 fev. 2017.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica n. 11**, de 01 de setembro de 2016. Dispõe sobre a autorização do registro do produto Milteforan, sob número SP 000175-9.00003, de propriedade da empresa Vibrac Saúde Animal, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral canina. Disponível em: <
<http://www.brasileish.com.br/mostratexto.asp?id=48>>. Acesso em 11 out. 2016.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota Técnica n. 38**, de 11 de novembro de 2014. Dispõe sobre a suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune – vacina contra leishmaniose visceral canina.

Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Produtos%20Veterin%C3%A1rios/NOTA%20TECNICA%20DFIP%2038-14%20LEISHMUNE.pdf>. Acesso em 13 nov. 2016.

CAMPOS-PONCE, M. et al. Leishmania chagasi/infantum: further investigations on Leishmania tropism in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Experimental Parasitology**, New York, v. 109, p. 209-219, 2005.

CFMV. **CFMV publica nota sobre o tratamento da Leishmaniose Visceral**. Nota de Esclarecimento. 2013.

COIRO, C. J. et al. Sistemática de vigilância para leishmaniose visceral canina no município de Botucatu-SP. **Vet e Zootec**. V. 21, n. 1, p. 108-116. 2014.

CORREA A. C. G. et.al. Evolução geográfica da leishmaniose visceral em São Luís. In: ENCONTRO NACIONAL DOS GEÓGRAFOS, 16. 2010, Porto Alegre. **Anais eletrônicos**. Porto Alegre: 2010. Disponível em: <<http://www.agb.org.br/evento/download.php?idTrabalho=2770>> Acesso em 07 jul. 2015.

CORTES, S. et al. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 189-196, 2012.

COSTA C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the old and new worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

_____. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, 2009.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 4, p. 925-950, 2000.

DIAS, E. L. et al. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. **Ci. Anim. Bras.**, v.9, n.3, p. 740-745, jul.-set., 2008.

DIETZE, R et al. Effect of eliminating seropositives canines on transmission of visceral leishmaniasis in Brasil. **Clinical infectious diseases**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, n. 2, v. 3, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clín. Vet.**, v. 28, n.1, p. 36-44, 2003.

FELIPE, I. M. A., et al. Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 2, p. 207-211, mar.2011.

FREITAS, J. C. et al. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 1, n. 45, p. 24-29, 2012.

GARCÊS JÚNIOR, A. R. **Mapa da Ilha do Maranhão**. 2016.

_____. et al. Análise de casos de leishmaniose visceral utilizando técnicas de geoprocessamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFORMÁTICA DA SAÚDE, 15. 2016, Goiânia. **Anais eletrônicos**. Goiânia: 2016. Disponível em: <<http://www.jhi-sbis.saude.ws/ojs-jhi/index.php/jhi-sbis/issue/archive>>

GOMES, R. B. et al. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox cerdocyon thous and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 101, p. 127-33, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, vol. 7, n. 03, p.338-349, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa de População**, 2016 [online]. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2016/estimativa_dou_2016_20160913.pdf>. Acesso em 30 jan. 2017.

KAZIMOTO, T. A. **Uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% em cães no controle da leishmaniose visceral**. 2016. 68f. Dissertação (Mestrado em Ambiente,

Tecnologia e Sociedade). Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Mossoró, 2016.

LARANJEIRA, D. F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor.** 2008. 79f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP, São Paulo, 2008.

LAPPIN, M.R. Infecções por protozoários e mistas. In: ETTINGUER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária.** 5ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004. p. 437-438.

LAZARI, P. et al. *Leishmania chagasi* in dogs from the city of Jaciara, Mato Grosso, Brasil. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 44, n.2, p.315-317, fev. 2016.

LEONTIDES, L. S. et al. A crosssectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 109, n. 1-2, p. 19-27, 2002.

LIMA, C. A. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão. **Pubvet**, Londrina, v. 7, n. 25, ed. 248, art 1641, supl.1, 2013.

LIRA, R. A. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: avaliação do desempenho dos kits EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos.** 2005. 43f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – NESC/CPqAM/FIOCRUZ. Recife, 2005.

MAIA, L. **Leishmaniose visceral canina: aspectos clínicos e hematológicos de casos suspeitos e confirmados atendidos no hospital veterinário da universidade de Brasília em 2011.** 2013. 43f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2013.

MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde Soc.** São Paulo, v. 25, n. 01, p. 247-258, 2016.

MACHADO, J. G. **Resposta imune celular após à infecção por *Leishmania chagasi* em camundongos balb/c imunossuprimidos.** 2008. 91f. Tese (Doutorado em

Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Universidade Estadual Paulista – FMVZ/UNESP, Botucatu, 2008.

MARANHÃO. Secretaria de Estado da Saúde. **Governo orienta população sobre leishmanioses**. São Luís: Secretaria de Estado da Saúde, 2015. Disponível em: < <http://www.ma.gov.br/governo-orienta-a-populacao-sobre-as-leishmanioses/>>. Acesso em 04 fev. 2017.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciênc. Animal**, v. 18, n. 1, p. 43-50, 2008.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino Americano de Rickettiosis, 2004, Ouro Preto. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Rio de Janeiro, v.23, suplemento 1, p.41-45.

MILHOMEM, M. N. **Avaliação clínica, hematológica e bioquímica de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* tratados com extrato seco de *Morinda citrifolia* (noni)**. 2013. 56 f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, 2013.

MONTEIRO, D. Cooperação com fundação francesa promete reduzir casos de leishmaniose no Brasil. **Agência Fiocruz**. Rio de Janeiro, 12 jul.2013. Entrevistas. Disponível em: < <https://agencia.fiocruz.br/coopera%C3%A7%C3%A3o-com-funda%C3%A7%C3%A3o-francesa-promete-reduzir-casos-de-leishmaniose-no-brasil>>. Acesso em: 23 set. 2015.

MORAIS, R. C. S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania***. 2015. 62p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – CpqAM, Recife, 2015.

NUNES, C. M. et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. **Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal**, n. 4, v. 24, p.402-409. Out.-dez., 2015.

OLIVEIRA, A. C. et al. Canine visceral leishmaniasis case investigation in the Jacare region of Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 57, n. 4, p. 325-32, 2015.

OLIVEIRA, L. C. P. et al. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, state of Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v 43, n.4, jul.-ago., p. 400-404, 2010.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Essential leishmaniasis maps**. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html, Acesso em: 02 nov 2016.

_____. Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis**. [Internet] fev. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> > . Acesso em: 13 jan 2015.

OVALLOS, F. G. **Estudo da capacidade vetorial de *Migonemyia migonei* (França) e de *Pintomyia fischeri* (Pinto) (Diptera: Psychodidae) para *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* Cunha & Chagas**. 2011. 107f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade São Paulo, São Paulo, 2011.

PAIXÃO, D. R. Z. **Leishmaniose visceral canina (calazar)**. 2008. Dissertação (Licenciatura em Pedagogia). Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2008.

PALTRINIERI, S. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 36, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PASTORINO, A. C., et al. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **J. Pediatr.** Rio de Janeiro, v. 2, n. 78, abr., p. 120-127, 2002.

QUEIROZ, N. M. G. P., et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, jan.- mar., p 32-38, 2010.

QUEIROZ JÚNIOR, E. M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido *Dual Path Platform* para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2011.

REIS, A. B., et al. Parasite density and impaired biochemical/ hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Rev. Vet. Sci.**, n. 1, v. 81, p.68-75, 2006.

RIBAS, M. L. et al. Estimating the optimal control of zoonotic visceral leishmaniasis by the use of a mathematical model. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 6, p. 1-6, ago. 2013.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 4, n. 1, ed. 584, jan. 2010.

SANTANA FILHO, F. C. et al. Recusas de borrifacção de imóveis e ocorrência de casos de leishmaniose visceral na região noroeste de Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 4, p. 899-908, 2012.

SCHIMMING, B. C.; PINTO; SILVA, J. R. C. Leishmaniose visceral canina – revisão de literatura. **Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.** Ano X, n. 19, jul. 2012. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/QKOIwlDa047cxSZ_2013-6-24-15-1-25.pdf>. Acesso em 05 nov. 2016.

SILVA A. R., et al. Leishmaniose visceral na Ilha de São Luís, estado do Maranhão. I. Aspectos clínicos e terapêuticos. In: Resumos do XIX **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, p.65, 1983.

SILVA, E. F. P. **Inquérito sorológico de leishmaniose canina na cidade de Rio Verde –GO**. 2007. 54 f. Dissertação (Programa Multinstitucional de Pós-Graduação em Ciência da Saúde – Rede Centro-Oeste). Universidade de Brasília/ Universidade de Rio Verde, Rio Verde, 2007.

SILVA, A. R. et al. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41, n. 4, p. 358-364, jul.-ago., 2008.

_____. et al. **Projeto de funcionamento e relatório técnico de gestão 2012/2013**. Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CREDIP). São Luís: UFMA/SVS-MS/SES/SEMUS, 2015.

SILVA, F. T. S. et al. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina no distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). **Rev. B. S. Publica Miolo**. v. 34, n. 4, p. 783-795, out./dez. 2010.

SOUZA, V. M. M. et al. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no Município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**. vol.17, n.2, p.97-106, 2008.

SOUZA, Y. C. P. et al. Testes diagnósticos para leishmaniose visceral – atualidade e perspectivas. **Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.**, ano 11, n. 21, jul. 2013.

TRONCARELLI, M. Z. et al. 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.e Zootec.**, v. 16, n. 2, p. 343-353, jun. 2009.

VIDES J.P. et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 178, p. 22-28, 2011.

VON ZUBEN, A. P.B.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral em grandes municípios brasileiros. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, n. 6, v. 32, debate, jun., 2016.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 644-645, abr. 2010.

_____. Editorial. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo?. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, editorial, jun. 2016.

ANEXOS

ANEXO 1 – Ficha de coleta de dados

Formulário para a coleta de dados: Sinais clínicos da LVC e exames laboratoriais			Triagem inicial	
Nome do cão: _____	Centro de projeto: <input type="checkbox"/> Terceira <input type="checkbox"/> Fortaleza <input type="checkbox"/> São Luís		Nº do cão em triagem: _____	
Microchip: _____			NIP do cão recrutado: _____	
				Data da visita: ____/____/____
Colar anti-pulga: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	Macho <input type="checkbox"/>			Temperatura Anal: ____ °C
	Fêmea <input type="checkbox"/>			

Para cada sinal clínico selecione a melhor opção e marque só para cada item com um "X".

Sinais Clínicos	Descrição	Descrição	Descrição	Comentários
1 Condição geral	<input type="checkbox"/> Bom	<input type="checkbox"/> Acuta	<input type="checkbox"/> Deprimido	
2 Sinais dermatológicos	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Alopecia síndrica	<input type="checkbox"/> Úlceras/ Nódulos	<input type="checkbox"/> Dermatite sefoliária
3 Sinais oculares	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Hifemato ou conjuntivite ou coriza ou/ou uveíte		
4 Epitaxe	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente		
5 Arria	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Presente		
6 Enfraquecimento ganglionar ou esplenomegalia	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Enfraquecimento ganglionar bilateral nos pulsos	<input type="checkbox"/> Esplenomegalia clara	

Para cada teste abaixo registre o resultado e marque só uma opção por item com um "X".

Sinais bioquímicos	Resultado	Valores clinicamente significantes		
7 Teste de função renal	Creatinina _____ mg/L	>14 mg/L	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
8 Anemia perniciosa	Hematócrito _____ % RPI _____	Ht >25% e RPI <1,5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9 Prova de função hepática	ALT _____ U/L	=4,0 X ULN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10 Proteínas séricas	_____ g/dl	>8 g/dl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resultados sorológicos	Valores obtidos	Descrição	
11 Sorologia para rK28 (IFP)		Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>
12 ELISA com rK29	O. D. : _____ ; Título: _____ ; _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ANEXO 2 – Protocolo para utilização do teste Chembio rK28 DPP - teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos

1. Certifique-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permita que ela alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.
2. Retire o número necessário de componentes do TR DPP®LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO – MANGUINHOS e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam à temperatura ambiente no momento do uso.
3. Retire o suporte de teste do envelope laminado e identifi-cá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.
4. Verifique a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas na janela de teste do suporte, sendo 1 (uma) de cor azul e 1 (uma) de cor verde. Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separe o suporte de teste para que não seja usado e comunique o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilize um novo suporte de teste para continuar o procedimento.
5. Encoste a alça coletora de 5 µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micro pipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µL.
6. Segure a alça coletora na posição vertical e toque na área de aplicação da amostra, poço n°1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte para liberar 5 µL de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou/escorreu da alça para o local do teste.
7. Vire o frasco de tampão e mantenha na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço n° 1 (AMOSTRA + TAMPÃO). Adicione 2 (duas) gotas de tampão, lentamente, ao poço n° 1 (AMOSTRA + TAMPÃO).
8. Aguarde 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descarte o suporte de teste e repita o procedimento desde o início usando um novo suporte.

ANEXO 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ brasileiro(a),
portador da CI nº _____ SSPMA, CPF
nº _____ com domicílio na rua
(avenida) _____ município _____
Estado _____ CEP _____,
recebi explicações acerca dos procedimentos realizados no animal da
minha propriedade, de nome _____, raça _____, tipo de
pelagem _____ do _____ sexo
_____ Idade _____ com sinais
característicos: _____ autorizo que seja
utilizado no ensaio para "AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DA VACINA KSAC
CONTRA A LEISHMANIOSE CANINA EM ÁREAS ENDÊMICAS DA DOENÇA
NA ILHA DE SÃO LUÍS," a ser desenvolvido pela Universidade Federal do
Maranhão (UFMA).

Trata-se de um ensaio multicêntrico que tem a participação das
universidades federais do Maranhão, Piauí (UFPI), Ceará (UFCE) e Minas
Gerais (UFMG) e dos institutos Butantan (SP-BR), Infectious Disease
Research Institute (Boston USA).

O Termo de Consentimento estende-se à aplicação da vacina e do
placebo, as coletas de material (sangue) e outros procedimentos
necessários ao bem estar do animal.

Fica definido também que o animal alvo do experimento permanecerá no
domicílio do proprietário sob condições do ambiente de sua naturalidade.

São Luís, _____ de _____ 201

Assinatura do
proprietário _____

**ANEXO 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal –
Universidade Estadual do Maranhão**



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

DECLARAÇÃO

(2ª via)

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado **“Ensaio randomizado, controlado por placebo, para avaliar a eficácia da vacina KSAC (poliproteína de quatro antígenos recombinantes de *Leishmania*) mais adjuvantes para prevenir a transmissão de Leishmaniose Visceral Canina em áreas onde a doença é endêmica no Brasil”** foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal -CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Uema, conforme protocolo nº 40/2012 aprovado em 21/10/2013, para a execução da pesquisa pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva (UFMA) e membros Profª Eloisa da Graça do Rosário Gonçalves (UFMA), Dra. Zulmira da Silva Batista (Centro de Diagnóstico Veterinário) por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008. Declaração emitida em 15 de Novembro de 2013.

São Luís, 09 de Maio de 2016

Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA