

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO CANINO PARA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA (LTA), EM ÁREA DE BAIXA  
ENDEMICIDADE/PORTO ALEGRE/RS ATRAVÉS DE MÉTODOS  
DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS IMUNOLÓGICOS E BIOMOLECULARES**

**Margarete Maria Paes Iesbich**

**Porto Alegre**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO CANINO PARA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA (LTA), EM ÁREA DE BAIXA  
ENDEMICIDADE/PORTO ALEGRE/RS ATRAVÉS DE MÉTODOS  
DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS IMUNOLÓGICOS E BIOMOLECULARES**

**AUTOR: Margarete Maria Paes Iesbich**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Medicina Veterinária Preventiva, Especialidade de Parasitologia do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

**Orientador: Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo.**

**Co-orientadora: Dra. Aline Fagundes da Silva**

**Porto Alegre**

**2008**

**Nome do Autor: Margarete Maria Paes Iesbich**

**AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO CANINO PARA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA (LTA), EM ÁREA DE BAIXA  
ENDEMICIDADE/PORTO ALEGRE/RS ATRAVÉS DE MÉTODOS  
DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS IMUNOLÓGICOS E BIOMOLECULARES**

**Aprovada em:**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo.**

**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Carlos Marcos Barcellos de Oliveira.**

**Membro da Comissão**

---

**Profa. Dra. Neuza Satiel Stobbe.**

**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. José Maria Wiest**

**Membro da Comissão**

Ao Criador de tudo e de todos, por tornar tudo  
isso possível mais uma vez.

Aos meus queridos pais pela fé e amor, em mim  
depositados.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo pela confiança, dedicação, tolerância e ensinamentos a mim dedicados.

A minha co-orientadora Dra. Aline Fagundes da Silva, obrigada pelo carinho e amizade, pela oportunidade recebida de realizar o experimento no Serviço de Parasitologia IPEC-FIOCRUZ/RJ, atual Laboratório de Vigilância em Leishmanioses e, também, à equipe de estagiários e técnicos que me apoiaram e estimularam durante meu período de trabalho.

A Ana Vera Finardi Rodrigues, Bibliotecária da Faculdade de Veterinária, pelo auxílio na elaboração do trabalho.

Ao meu querido esposo, Renato Gravina Farias, pela sua compreensão e apoio em todos os momentos de realização deste trabalho.

A minha colega e amiga Dra. Sandra Tietz Marques, pelo incentivo e fé a mim destinados e as demais colegas de mestrado, companheiras do Laboratório de Protozoologia por alguns anos, pela paciência, tolerância, amizade e ajuda a mim prestadas, inclusive em momentos difíceis durante minha jornada, o meu muito obrigado.

Ao grande amigo Jairo de Jesus, pela cedência do material analisado neste trabalho, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

### RESUMO

	8
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	10
<b>LISTA DE TABELAS</b>	11
<b>LISTA DE SÍMBLOS</b>	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>1.1 Importância e justificativa</b>	15
<b>1.2 Problema</b>	15
<b>1.3 Hipótese</b>	16
<b>1.4 Objetivo</b>	16
1.4.1 Objetivos gerais	16
1.4.2 Objetivos específicos	16
<b>1.5 Equipe técnica</b>	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
<b>2.1 Definição e histórico</b>	18
<b>2.2 Sistemática do gênero <i>Leishmania</i></b>	19
<b>2.3 Ciclo biológico</b>	20
2.3.1 Hospedeiro invertebrado	23
2.3.2 Hospedeiros vertebrados e reservatórios	29
<b>2.4 Morfologia</b>	30
<b>3. EPIDEMIOLOGIA</b>	31
<b>4. PATOGENIA DA LTA</b>	38
<b>4.1 Imunopatogênese da LTA</b>	39
<b>4.2 Sinais clínicos</b>	41
4.2.2 Sinais clínicos em cães	43

<b>5. DIAGNÓSTICO</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Diagnóstico no ser humano</b>	<b>46</b>
5.1.1 Diagnóstico epidemiológico	47
5.1.2 Diagnóstico laboratorial	47
<b>5.2 Diagnóstico diferencial</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Diagnóstico em cães</b>	<b>53</b>
<b>6. TRATAMENTO</b>	<b>54</b>
<b>6.1 Tratamento em humanos</b>	<b>55</b>
<b>6.2 Tratamento em caninos</b>	<b>56</b>
<b>7. CONTROLE E PREVENÇÃO</b>	<b>57</b>
<b>8. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>59</b>
<b>8.1 Amostragem</b>	<b>59</b>
<b>8.2 Processamento de amostras</b>	<b>59</b>
8.2.1 Métodos imunológicos	59
8.2.2 Método biomolecular	59
8.2.3 Análise estatística	60
<b>9. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>9.1 Métodos imunológicos</b>	<b>60</b>
9.1.1 Correlação entre ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta	60
9.1.2 Correlação com idade, sexo e raça	61
<b>9.2 Método biomolecular</b>	<b>62</b>
<b>10. DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>11. CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>75</b>

## RESUMO

A Leishmaniose é uma doença parasitária emergente em algumas regiões do Brasil causada por protozoário do gênero *Leishmania*. No ano de 2002 foi notificado o primeiro caso humano autóctone de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no município de Porto Alegre/RS, Bairro Lomba do Pinheiro. No meio urbano, o cão tem papel importante, servindo como fonte de infecção e reservatório do protozoário. Este estudo teve como objetivo avaliar o emprego de ELISA e PCR no diagnóstico da LTA em cães domiciliados na Estrada do Rincão, Bairro Lomba do Pinheiro, Porto Alegre. JESUS (2006) coletou e submeteu 200 amostras de soro de cães oriundos desta área de risco à Imunofluorescência Indireta (IFI) encontrando uma soroprevalência de 3,5% (7/200). Em nosso estudo, empregaram-se o ensaio imunoenzimático para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina, kit Biomanguinhos/FIOCRUZ, com 61 (30,5%) dos 200 soros caninos sororeagentes e nestes foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) na qual apenas a amostra 12C de uma fêmea, sem raça definida, com quatro anos de idade, replicou o DNA de *Leishmania* spp. Utilizando o Teste Exato de Fisher para a análise estatística quanto à idade, sexo e raça, observou-se que houve associação significativa com a positividade em ELISA e a idade dos cães ( $p=0,0037$ ), enquanto que quanto ao sexo ( $p=0,0687$ ) e raça ( $p=0,1261$ ) não encontramos associação significativa na positividade em ELISA. O Teste de McNemar's foi aplicado aos resultados obtidos pelas técnicas de ELISA e IFI evidenciando uma diferença muito significativa entre as duas técnicas ( $p<0,0001$ ). A identificação de cães soropositivos, sem sintomatologia, em área de baixa endemicidade no município de Porto Alegre, com casos humanos autóctones, serve como alerta e ponto de partida para mais investigações sobre a epidemiologia da LTA no RS e também sobre o emprego de outras técnicas de diagnóstico mais sensíveis.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, diagnóstico, ELISA, PCR.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is an emerging parasitic disease in some areas of Brazil caused by a protozoa of the genus *Leishmania*. In the year of 2002 it was notified the first autochthon human case of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in the city of Porto Alegre /RS, Bairro Lomba do Pinheiro. In the urban way, the dog has important paper, serving as source of infection and reservoir of the protozoa. This study it had as objective to evaluate the job of ELISA and PCR in the diagnosis of the ATL in dogs domiciliated in the Road of the Rincão, Bairro Lomba do Pinheiro, Porto Alegre. JESUS (2006) collected and submitted 200 samples of serum of deriving dogs of this area of risk to Indirect immunofluorescent reaction (IFI) finding a soroprevalence of 3,5% (7/200). In our study, they had used for diagnosis Canine Visceral Leishmaniasis, kit Biomanguinhos/FIOCRUZ, with 61 (30.5%) positives samples of the 200 canine serum and in these the reaction in chain of polimerase in which only the sample 12C of a female, without defined race, with four years of age, presented the response of the DNA of the *Leishmania* genus in the PCR. Using the Accurate Test of Fisher for the analysis statistics how much to the age, sex and race, it was observed that it had significant association it enters the positividade in ELISA and the age of the dogs ( $p=0,0037$ ), whereas how much to the sex ( $p=0,0687$ ) and race ( $p=0,1261$ ) we do not find significant association with the positividade in ELISA. The Test of McNemar's was applied to the results gotten for the techniques of ELISA and IFI having evidenced a significant difference very between the two techniques ( $p < 0,0001$ ). The identification of soropositives dogs, without symptoms, in area of low endemicity in the city of Porto Alegre, with autochthon human case, also serves as alert and starting point for more inquiries on the epidemiology of the ATL in the RS and on the job of others techniques of more sensible diagnosis.

Key-words: *Leishmania*, diagnosis, ELISA, PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Leishmania</i> na forma amastigota dentro do macrófago (células coradas por May-Grunwald Giemsa).....	22
Figura 2	<i>Leishmania</i> na forma promastigota.....	22
Figura 3	Ciclo biológico.....	23
Figura 4	Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, 2005.....	25
Figura 5	Georreferenciamento dos casos confirmados de Leishmaniose em Porto Alegre.....	28
Figura 6	Distribuição mundial da LTA.....	32
Figura 7	Mapeamento dos municípios com casos de LTA no Rio Grande do Sul de 2001 a 2005.....	37
Figura 8	Úlceras no focinho de cão.....	45
Figura 9	Úlceras no saco escrotal de cão.....	45
Figura 10	Gel de agarose 2% com amostra de soro canino 12C apresentando banda de 120pb.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies do Gênero <i>Leishmania</i> , Parasitos de Homens e Animais, de maior interesse em Parasitologia (Adaptação da proposta por Lainson e Shaw, 1987).....	20
Tabela 2	Prevalência de casos humanos autóctones de LTA por município de residência,RS,Brasil,2001-2008.....	34
Tabela 3	Prevalência de casos humanos autóctones de LTA por município de residência,com a presença de cães,RS,Brasil, 2001-2005 .....	35
Tabela 4	Casos autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul, 2001-2005. (Boletim Epidemiológico-v.7,n.2,Junho-2005 CEVS/SES).....	35
Quadro1	Progressão da lesão – aspectos histopatológicos.....	40
Quadro2	Progressão da lesão – aspectos clínicos.....	40
Quadro3	Classificação clínica e respectivos agentes etiológicos da LTA, segundo MARZOCHI (1994).....	43
Tabela 5	Distribuição das amostras de soro canino de acordo com os resultados das técnicas de IFI e ELISA, Porto Alegre, novembro de 2008.....	60
Tabela 6	Demonstrativo de ELISA para <i>Leishmania</i> spp, segundo a idade em meses, em 200 amostras de soro canino, Porto Alegre, novembro de 2008.....	61
Tabela 7	Comparativo de ELISA para <i>Leishmania</i> spp, segundo sexo, em 200 amostras de soro canino, Porto Alegre, novembro de 2008.....	61
Tabela 8	Resultado de ELISA para <i>Leishmania</i> spp, segundo a raça de 200 caninos, Porto Alegre, novembro de 2008	62

## LISTA DE SÍMBOLOS

AM:	Amazonas	
BR:	Brasil	
CCZ:	Centro de Controle de Zoonoses	
CEVS:	Centro Estadual de Vigilância em Saúde	
cm:	centímetro	
DNA:	Ácido desoxirribonucléico	
DVAS:	Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde	
EIE:	Ensaio Imunoenzimático	
ELISA:	Ensaio Imunoenzimático	
FAVET:	Faculdade de Veterinária	
FEPPS:	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde	
FIOCRUZ:	Fundação Instituto Oswaldo Cruz	
ha:	Hectare	
HE:	Hematoxilina Eosina	
IDRM:	Intradermorreação de Montenegro	
IFI:	Imunofluorescência indireta	
IFN:	Interferon	
IgG:	Imunoglobulina G	
IgG1:	Imunoglobulina G 1	
IgG 2:	Imunoglobulina G 2	
IL:	Interleucina	
IOC:	Instituto Oswaldo Cruz	
IPEC:	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas	
LACEN:	Laboratório Central	
LC:	Leishmaniose Cutânea	
LCD:	Leishmaniose Cutâneo-difusa	
LCV:	Leishmaniose Canina Visceral	
LIT:	Liver Infusion Triptose	
LMC:	Leishmaniose Muco-cutânea	
LT:	Leishmaniose Tegumentar	
LTA:	Leishmaniose Tegumentar Americana	
LTC:	Leishmaniose Tegumentar Cutânea	
mm:	Milímetro	
MS:	Ministério da Saúde	
MT:	Mato Grosso	•
NCRV:	Núcleo de Controle de Reservatórios e Vetores	•
NNN:	Novy-Mc Neal-Nicole	•
OMS:	Organização Mundial de Saúde	•
PCR:	Polimerase chain reaction Fator de necrose tumoral alfa	
PCR-	Polimerase chain reaction-restriction fragment length polymorfism	
RFLP:		
PD:	Pesquisa Direta	
SES:	Secretaria de Estado de Saúde	
SINAN:	Sistema de Informação de Agravos de Notificação	
TNF-alfa:	Fator de necrose tumoral alfa	
UFRGS:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul	

$\mu\text{m}$ : micrômetro  
 $\gamma$ : Gama

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma enfermidade que acompanha o homem desde a Antigüidade. É uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, causada por várias espécies de protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, incluídos na Família Trypanosomatidae e no Gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1970). Apresentam ciclo de vida digenético (heteroxênico), envolvendo uma grande variedade de mamíferos silvestres, reservatórios do parasito, transmitida por diferentes insetos vetores da família Psychodidae, subfamília Phlebotaminae, gênero *Lutzomyia* – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Estes insetos vetores são responsáveis pela transmissão do parasito de um mamífero a outro (M.S., 2007).

As leishmanioses constituem zoonoses de animais silvestres, e mais raramente domésticos, incluindo marsupiais (gambás), mamíferos (ratos, cães, raposas), edentatos (tamanduá, bicho-preguiça), carnívoros e mesmo primatas. O homem representa hospedeiro acidental e, no Brasil, parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitos na natureza (M.S., 2005).

Segundo Falqueto et al (1986) a participação de animais domésticos no ciclo epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é conhecido desde o início do século. Mazza, em 1926, encontrou cães infectados em área de desmatamento recente ao norte da Argentina, onde havia alta incidência de Leishmaniose Cutâneo-Mucosa em humanos. Diversos trabalhos conduzidos em áreas endêmicas de LTA demonstraram que tanto o cão quanto o jumento (*Equus asinus*) são freqüentemente encontrados infectados. No Brasil, estudos indicam ser relativamente comum a presença de cães infectados em áreas endêmicas, principalmente na região Sudeste do País (M.S., 2007). O papel dos cães na transmissão da LTA não está totalmente esclarecido. Logo, a identificação da espécie de *Leishmania* causadora de Leishmaníase canina faz-se essencial para seu diagnóstico, compreensão da epidemiologia e determinação das medidas de controle a serem implementadas.

O primeiro caso de LTA humana no Rio Grande do Sul foi notificado em janeiro de 2000, em paciente do sexo masculino, 74 anos de idade, na Santa Casa de Porto Alegre, portador de lesão na mucosa nasal com infiltração importante em nariz e lábio superior direito e destruição da cartilagem nasal, com o diagnóstico de Leishmaniose Cutâneo-Mucosa por identificação de formas amastigotas em cortes histológicos em biópsias das lesões (Boletim Epidemiológico, 2005, CEVS/SES/RS). Em 2001 identificou-se o segundo caso de LTA em paciente residente na Lomba do Pinheiro, município de Viamão, integrante da região da Grande Porto Alegre. Em 2002, ocorreu a notificação do primeiro caso autóctone de LTA em Porto Alegre. Entre os anos de 2001 a 2005, Porto Alegre teve 12 casos notificados, confirmados autóctones de LTA, em 5 mulheres e 7 homens. A faixa etária atingida variou de 15 a 59 anos. Todos os casos humanos autóctones confirmados até o momento são originários das imediações da mata nativa dos bairros da Lomba do Pinheiro, Belém Velho, Restinga e Aberta Morros (THIESEN & BRITO, 2003).

## **1.1 Importância e Justificativa**

A LTA é uma enfermidade emergente no Rio Grande do Sul e constitui-se num problema de Saúde Pública. Os animais domésticos, especialmente os caninos, estão envolvidos diretamente na manutenção do agente causador da LTA nos meios urbano, periurbano e rural.

A busca do método diagnóstico para LTA mais sensível e específico na população canina é de fundamental importância para a implantação de políticas em saúde humana nas áreas de baixa endemicidade. Existem casos humanos autóctones no RS, em Porto Alegre, e a presença de cães sem sintomatologia, mas com soropositividade, pode servir de alerta para a presença destes.

## **1.2 Problema**

1) A soropositividade dos cães serve como alerta para a presença do protozoário e de seus vetores podendo ocasionar casos humanos autóctones de LTA em área de baixa endemicidade?

2) Os métodos de diagnóstico empregados em biologia molecular seriam mais precisos na identificação do gênero *Leishmania* do que os métodos sorológicos?

### **1.3 Hipótese**

1) Os caninos são reservatórios da LTA no RS mesmo não apresentando sintomatologia da doença, constituindo fonte de contaminação para os vetores.

2) A resposta aos testes sorológicos e/ou moleculares em cães auxilia o planejamento de ações em saúde que avaliem o risco de fonte de infecção para os humanos.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Gerais:**

1. Conhecer a situação de uma amostra populacional canina em Porto Alegre frente ao agente etiológico da LTA (*Leishmania* spp).

2. Avaliar o potencial risco de contaminação que os caninos sem sintomatologia de LTA podem representar para seres humanos.

#### **1.4.2 Específicos:**

1. Conhecer a frequência da infecção por leishmania através de métodos imunológicos e moleculares em cães que habitam área de baixa endemicidade, mas com casos autóctones humanos, em Porto Alegre (RS).

2. Avaliar comparativamente o desempenho das técnicas de ELISA, IFI e PCR no diagnóstico de LTA em cães assintomáticos de área de baixa endemicidade.



### **1.5 Equipe Técnica**

O presente trabalho foi realizado pela equipe técnica do Laboratório de Protozoologia da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, em parceria com o Serviço de Parasitologia IPEC-FIOCRUZ/RJ formada por:

- M.V. Margarete Maria Paes Iesbich (Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - UFRGS);
- M.V., Msc, Prof. Dr. Flávio Antônio Pacheco de Araujo (chefe do Laboratório de Protozoologia – FAVET/UFRGS; orientador do projeto).
- Bióloga Dra. Aline Fagundes da Silva Serviço de Parasitologia IPEC-FIOCRUZ/RJ, atual Laboratório de Vigilância em Leishmanioses; co-orientadora do projeto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Definição e histórico

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco registrando-se em torno de dois milhões de novos casos ao ano. A leishmaniose tegumentar distribuiu-se no mundo e no Continente Americano com registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (M.S., 2006).

Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos d.C. feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutâneo-mucosa. Posteriormente, através de estudos de paleo-medicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose. A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syphilis em el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico.

O primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral. No Brasil, Cerqueira, em 1885, observara a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como Botão de Biskra. Em 1895, na Itália, Breda, descreveu a enfermidade em italianos provenientes de São Paulo.

Entretanto, no Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, pela primeira vez, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania tropica* (Wright, 1903) da

leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior de São Paulo.

Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcer de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”.

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas sendo registradas até o momento seis espécies causadoras da LTA.

## 2.2 Sistemática do Gênero *Leishmania*

GONTIJO & CARVALHO (2003) descreveram a sistemática do gênero *Leishmania* (após LEVINE et al, 1980):

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963

Subfilo: MASTIGOPHORA Desing, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobber, 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

A Tabela 1 mostra a classificação do gênero *Leishmania*.

Tabela 1 - Espécies do Gênero *Leishmania*, Parasitos de Homens e Animais, de maior interesse em Parasitologia (Adaptação da classificação proposta por Lainson e Shaw, 1987).

Subgênero	
<i>Leishmania</i>	<i>Viannia</i>
<p>Complexo <i>Leishmania donovani</i></p> <p><i>L. (L) donovani</i></p> <p><i>L. (L) infantum</i></p> <p><i>L. (L) chagassi</i></p> <p>Provável pertencente:</p> <p><i>L. (L) archibaldi</i></p> <p>Espécies fora do complexo <i>donovani</i></p> <p><i>L. (L) tropica</i></p> <p><i>L. (L) aethiopica</i></p> <p><i>L. (L) major</i></p> <p><i>L. (L) gerbilli</i></p> <p>Complexo <i>Leishmania mexicana</i></p> <p><i>L. (L) mexicana</i></p> <p><i>L. (L) amazonensis</i></p> <p><i>L. (L) venezuelensis</i></p> <p><i>L. (L) enrietti</i></p> <p><i>L. (L) aristidesi</i></p> <p>Provável pertencente:</p> <p><i>L. (L) pifanoi</i></p> <p><i>L. (L) garnhami</i></p> <p>Complexo <i>Leishmani hertigi</i></p> <p><i>L. (L) hertigi</i></p> <p><i>L. (L) deanei</i></p>	<p>Complexo <i>Leishmania brasiliensis</i></p> <p><i>L. (V) brasiliensis</i></p> <p><i>L. (V) guyanensis</i></p> <p><i>L. (V) panamensis</i></p> <p><i>L. (V) peruviana</i></p> <p><i>L. (V) lainsoni</i></p> <p><i>L. (V) naiffi</i></p> <p><i>L. (V) shawi</i></p> <p><i>L. (V) colombiensis</i></p>

Fonte: Michalick, 2002

### 2.3 Ciclo biológico

Segundo GONTIJO (2003):

1. Durante o repasto sangüíneo, a fêmea do flebotomíneo introduz formas promastigotas metacíclicas no local da picada;

2. Promastigotas são interiorizadas por macrófagos teciduais;

3. Promastigotas se transformam em amastigotas;

4. Inicia-se o processo de reprodução no interior do vacúolo parasitóforo;

5. Rompimento do macrófago e liberação dos parasitos no interstício;

6. Parasitos são fagocitados por novo macrófago;

7. Macrófagos parasitados podem ser ingeridos pela fêmea de flebotomíneo durante o repasto sangüíneo;

8. No estômago do inseto, macrófago se rompe liberando amastigotas. Transformação dos amastigotas em promastigotas, que se dividem por divisão binária;

9. Promastigotas migram para o intestino e colonizam as regiões do piloro e íleo, transformando-se em paramastigota (subgênero *Viannia*);

10. Paramastigotas se aderem ao epitélio e se reproduzem. Transformação em promastigota e migração para o estômago, e em seguida para a faringe do inseto (promastigotas metacíclicas);

■ Obs. Para o subgênero *Leishmania*, após a reprodução e colonização das formas promastigotas no intestino do inseto, ocorre à migração dessas formas estômago, onde se transformam em paramastigota, que colonizam o estômago e faringe do flebotomíneo, diferenciando-se, após, em promastigota metacíclica.

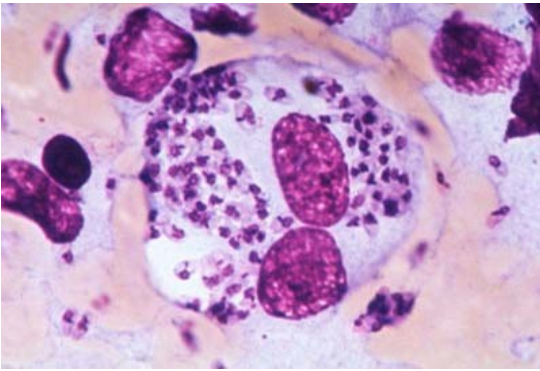


Figura 1 – *Leishmania* na forma amastigota dentro do macrófago  
(células coradas por May Grunwald Giemsa)

Fonte: Dunaiski, 2006.

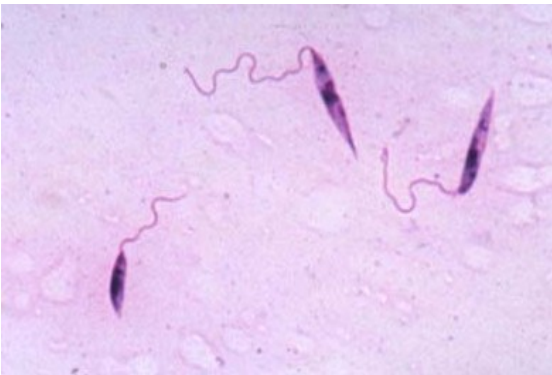


Figura 2 – *Leishmania* na forma promastigota

Fonte: Dunaiski, 2006.

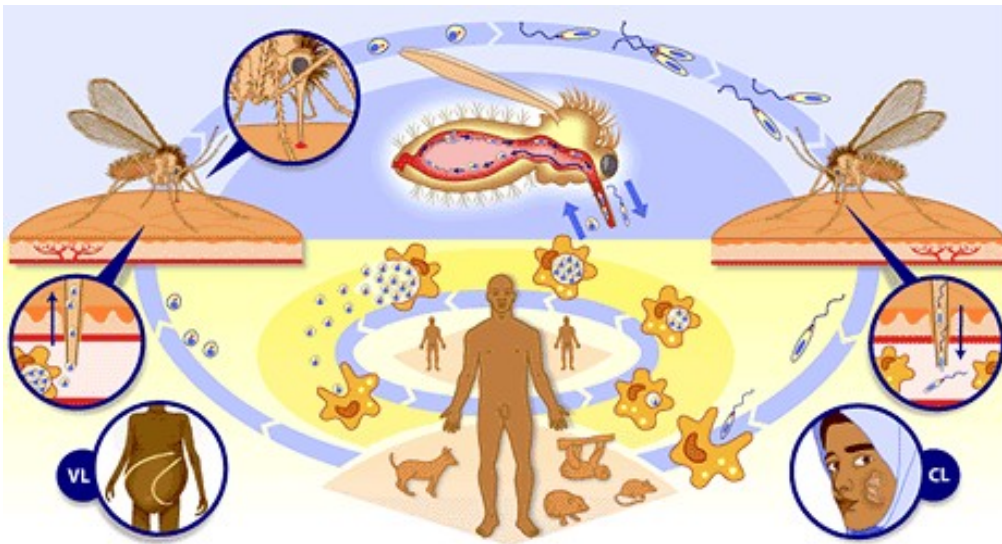


Figura 3 – Ciclo biológico da *Leishmania*.

(LV – Leishmaniose visceral, LC – Leishmaniose cutânea)

Fonte: (OMS, 2004)

### 2.3.1 Hospedeiro invertebrado

Segundo a Organização Mundial em Saúde, são conhecidas 500 espécies de flebotomíneos, mas somente 30 delas foram identificadas positivamente como vetores da enfermidade. O inseto vetor da leishmaníase é encontrado mundialmente nas regiões tropicais e temperadas.

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Ordem *Diptera*; Família *Psychodidae*; Subfamília *Phlebotominae*) pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo, sendo conhecidos como palha, cangalhinha, tatuquira, mulambinho, catuqui, etc. O ciclo de vida do protozoário é digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Estes últimos são responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro.

Seu tamanho geralmente não é superior a 0,5 cm de comprimento, apresentando pernas longas e delgadas e corpo densamente piloso. Seu vôo é saltitante, mantém as asas eretas até quando em repouso, o que o diferencia de outros dípteros (Basano & Camargo, 2004).

Trata-se de um mosquito pequeno, de 2 a 3 mm (parecido com a mosca da banana), que pode ser encontrado em lugares úmidos, escuros, onde tem muitas plantas, às vezes perto das casas. Florestas úmidas, com bastante vegetação, locais com muita umidade e lixo são lugares ideais para a criação do mosquito. A fêmea do flebotomíneo pode depositar seus ovos nas tocas de roedores, na casca de árvores, em frestas nas paredes, nos abrigos para animais. O mosquito pode voar a distância de até 200 metros de onde se cria aparecendo à noite. Em algumas regiões, aparece também pela manhã e à tarde. Como esse mosquito se alimenta de sangue, ele pica várias espécies de animais silvestres, assim como cavalos, cães e também o homem (NEVES et al, 1995).

Segundo o Manual de LTAI, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA, no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei*. A Figura 4 mostra a distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, no ano de 2005.



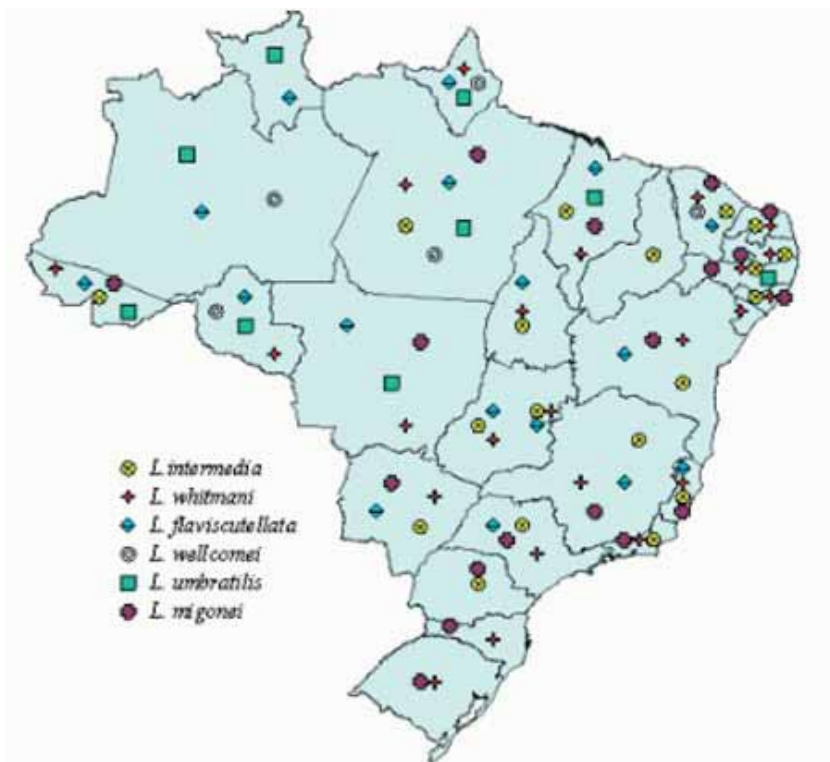


Figura 4 - Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, 2005.

Fonte: Manual de LTA (2006).

Vários autores realizaram buscas de flebotomíneos no Estado do Rio Grande do Sul visando estudar sua taxonomia e distribuição geográfica.

DIAS et al (1997) relataram duas buscas realizadas por R di Primio (1932, 1937), descrevendo o achado de três diferentes espécies de flebotomíneos: *Lutzomyia fischeri*, nos municípios de Osório e São José do Norte; *L. intermedia*, em Torres e São José do Norte e *L. migonei*, em São José do Norte.

DIAS et al (1997) encontraram 13 diferentes espécies de flebotomíneos em dois municípios localizados ao norte do Rio Grande do Sul (Cambará do Sul e Tenente Portela), no período de 23 de janeiro a 04 de fevereiro de 1986, em dois Parques de preservação ambiental, o Parque Nacional dos Aparados da Serra, localizado em Cambará do Sul, possuindo 13.000 ha de área total e o Parque Estadual

do Turvo, localizado no extremo norte do Estado, ao lado direito do Rio Uruguai, com 17.691 ha, no município de Tenente Portela.

As três espécies de flebotomíneos mais encontradas, em ordem decrescente foram: *Lutzomyia intermedia* (36,5%), principalmente nas tocas de animais silvestres; *L. fischeri* (25,1%), em troncos e ocos de árvores e dentro da floresta; *L. migonei* (8,9%) capturadas com iscas luminosas na floresta.

MARCONDES et al (1998) realizaram um estudo sobre a distribuição geográfica do complexo *Lutzomyia intermedia* na América do Sul. Como resultados, demonstraram a presença destes flebotomíneos no Estado do Rio Grande do Sul, nos municípios de Campo Novo (Parque Estadual do Turvo), Mostardas, Porto Alegre, Santa Maria, Tenente Portela e Torres. *L. intermedia* é encontrada em áreas mais quentes e úmidas enquanto que *L. neivai* em climas mais frios e secos.

SILVA e GRUNEWALD (1999) coletaram 2.228 flebotomíneos no Parque Estadual do Turvo durante novembro de 1996 até fevereiro de 1997. O estudo foi realizado na Guarita do Salto Yucumã localizado à margem da floresta. Neste local encontram-se animais domésticos como bovinos, galináceos, felinos e caninos domésticos. Três áreas ecologicamente diferentes foram avaliadas: domicílio, peridomicílio e floresta. Fêmeas de flebotomíneos infectadas foram identificadas nos domicílios e na floresta. As espécies predominantes foram: *Lutzomyia migonei* (47,8% nos domicílios e 62,2% nos peridomicílios), *L. pessoai*, *L. fischeri*, *L. lanei*, *L. neivai*, *L. shannoni* e *L. monticola*. Todas estas espécies são conhecidas por sugarem sangue de humanos. Destas, a *L. migonei*, *L. pessoai*, *L. fischeri*, *L. neivai* e *L. shannoni* são suspeitas de serem vetores da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em outros locais do Brasil.

Em um outro estudo desenvolvido por SILVA et al (2004) coletaram-se 1.721 flebotomíneos em um galinheiro no município de Derrubadas, Estado do Rio Grande do Sul, nos meses de janeiro a março de 2001. A cidade de Derrubadas é basicamente rural e localiza-se próximo ao Parque Estadual do Turvo. As famílias constroem suas habitações próximas à floresta atraindo muitos flebotomíneos.

A 17ª Coordenadoria Regional em Saúde informou casos humanos de LTA diagnosticados em residentes próximos ao Parque Estadual do Turvo. Do total de

flebotomíneos capturados foram identificados no galinheiro, com maior frequência: *Lutzomyia migonei* (57,6%) e a *L. pessoai* (14,7%). Provavelmente estas espécies demonstraram adaptação ao peridomicílio pela facilidade de alimento (galinhas e animais silvestres) encontrados nesta área.

No município de Porto Alegre, local alvo deste estudo, o Núcleo de Controle de Roedores e Vetores da Secretaria Municipal de Saúde, (NCRV/SMS) tem realizado expedições para captura dos insetos vetores da Leishmaniose Tegumentar Americana nos locais onde foram identificados e georreferenciados casos autóctones, conforme a figura 5.

A partir do primeiro caso autóctone humano, coletas mensais noturnas foram iniciadas em dezembro de 2002, no domicílio de pacientes confirmados com LTA, peridomicílio e mata.

Estas coletas ocorreram no período de atividade do inseto que é noturno, nas imediações da divisa entre os bairros Restinga e Lomba do Pinheiro, onde se localizam as moradias. As espécies capturadas foram *Lutzomyia neivai*, *L. migonei*, *L. pessoai*, *L. lanei*, *L. fisheri* e respectivamente, em ordem decrescente de ocorrência. Pela acentuada antropofilia, quantidade de exemplares e distribuição coincidente com a da doença, *Lutzomyia neivai* é considerada a principal suspeita de ser o vetor.



Figura 5 - Georreferenciamento dos casos confirmados de Leishmaniose em Porto Alegre  
 Fonte: Boletim Epidemiológico, Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, n.º. 21.

Assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – seus principais vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia), têm hábitos noturnos, vôo baixo e são pouco antropofílicos.

*Leishmania (Viannia) guyanensis* – os vetores são *Lutzomyia anduzei*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia umbratilis*, que é o principal vetor, tendo o hábito de pousar durante o dia em troncos de árvores e atacar o homem em grande quantidade, quando perturbado.

*Leishmania (Viannia) braziliensis* – em área silvestre, o único vetor demonstrado transmissor foi o *Psychodopigus wellcomei*, encontrado na Serra dos Carajás, altamente antropofílico, picando o homem mesmo durante o dia e com grande atividade na estação das chuvas. Em ambientes modificados, rural e peridomiciliar, são mais freqüentemente implicadas a *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia migonei* (M.S.,2005).

### 2.3.2 Hospedeiros vertebrados e reservatórios

A interação reservatório-parasito é considerada um sistema complexo, já que é multifatorial e dinâmico, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança em função das alterações do meio ambiente (Petersen & Shaw, 2003; M.S., 2006a).

Nos hospedeiros vertebrados o parasito apresenta a forma amastigota, ovóide, com 2,5-5µm de diâmetro, intracelular obrigatório dos macrófagos (vacúolo parasitóforo) (Bassano & Camargo, 2004).

Infecções por leishmânias que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e eqüídeos) (MS, 2006a).

Marzochi, Schubach e Mazorchi (1999) relatam que também são encontrados como reservatórios silvestres de *Leishmania* spp. *Choloepus didactylus* (preguiça-real), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá) e *Didelphis marsupialis* (gambá), exemplares das espécies *Dasyprocta azarae* (cotia), *Kannabateomys amblyonyx*

(rato-da-taquara) e *Cuniculus paca* (paca), além de alguns pequenos roedores dos gêneros *Oryzomys* (rato-de-arroz), *Proechimys* (rato-de-espinho), *Akodon* (rato-do-mato) e *Rattus rattus* (rato doméstico).

Os reservatórios primários do parasito são os animais silvestres. Porém, os animais que convivem diretamente com o homem, como o cão e o cavalo, servem, secundariamente, como reservatórios. Atualmente no Brasil existem dois padrões epidemiológicos distintos: surtos epidêmicos em áreas de colonização recente, associados à derrubada de matas e aberturas de estradas. Nesse caso, trata-se de uma zoonose de animais silvestres, atingindo pessoas que entram em contato com esses focos. E o segundo padrão identificável é a leishmaniose de regiões de colonização antiga, já sem desmatamentos, relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados semi-urbanizados na periferia de centros urbanos. Neste caso, cães, eqüinos e roedores parecem representar papel importante como reservatórios do parasito. A infecção animal é, habitualmente, inaparente, sendo encontrados parasitos na pele e nas vísceras (RAZERA et al, 2005).

Quanto ao controle dos reservatórios é necessária a realização de estudos para a melhor evidenciação dos papéis dos reservatórios no ambiente peri e intradomiciliar. A identificação dos prováveis reservatórios, quando domésticos (cães e eqüinos), é necessária para a sua eliminação ou manutenção dos mesmos em lugares limpos e afastados das habitações humanas (M.S.,2005).

#### **2.4. Morfologia**

O ciclo de *Leishmania* spp. envolve o hospedeiro vertebrado e o vetor flebotomíneo. Nos hospedeiros mamíferos, o parasito é obrigatoriamente intracelular, com forma amastigota no interior das células do sistema mononuclear-fagocitário.

As formas amastigotas são ovóides, 2,5-5µm de diâmetro, possuem núcleo, cinetoplasto e rudimento de flagelo. Sua multiplicação se dá por divisão binária, ocorrendo repetidamente até a destruição das células hospedeiras. No trato alimentar dos flebotomíneos, as formas amastigotas se transformam em paramastigotas e promastigotas,

formas flageladas e móveis, alongadas, que apresentam núcleo central e cinetoplasto terminal. (MARZOCHI; SCHUBACH; MAZORCHI, 1999; GENARO et al., 2002).

### **3. EPIDEMIOLOGIA**

A Leishmaniose Tegumentar Americana apresenta três padrões epidemiológicos característicos, segundo M.S. (2007):

a) Silvestre: Transmissão em área de vegetação primária, sendo fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, podendo acometer seres humanos quando estes entram em contato com o ambiente silvestre, onde haja ocorrência da enzootia.

b) Ocupacional e Lazer: Estão associadas à ocupação desordenada da floresta e derrubada de matas para a construção de estradas, usinas hidroelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo.

c) Rural e periurbano em áreas de colonização: Relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais.

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose ocorre em 88 países e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles. Do total de casos já registrado de leishmaniose tegumentar (LT), 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru.

A LTA ocorre nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile, conforme ilustra a figura 6.

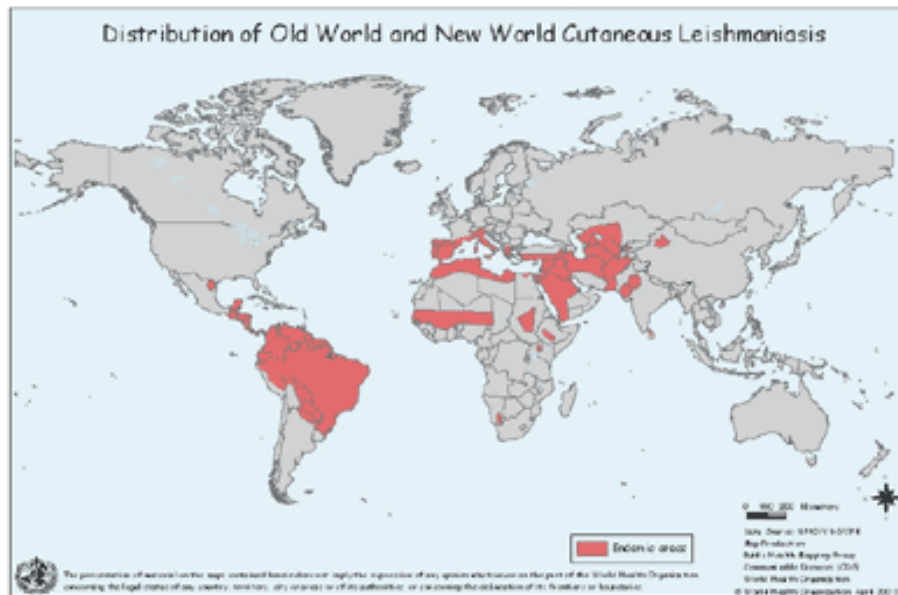


Figura 6 - Distribuição mundial da LTA

Fonte: OMS (2008)

Vários autores têm investigado a prevalência da infecção na população canina em diferentes regiões do Brasil. No município de Maricá (RJ), Madeira et al (2003) estudaram 8 cães com lesões suspeitas de LTA por métodos parasitológicos e sorológicos. Das lesões sugestivas realizaram biópsias visando isolamento *in vitro*. Destes, 6 foram confirmados parasitologicamente. Para imunofluorescência indireta (IFI), 2 apresentaram resultado superior à titulação 1:40. No ensaio imunoenzimático 6 mostraram-se com leitura superior ao cut-off.

No Estado do Rio de Janeiro, município de Paracambi, no período entre 1992 e 1993, Santos et al (2005b) realizaram inquérito epidemiológico sobre LTA na população canina residente em áreas endêmicas rurais e semiurbana. Cadastraram 179 animais neste estudo. A prevalência da infecção canina observada através de teste cutâneo, imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático foi, respectivamente, 10,1%, 16,7% e 27,8%. A presença de formas subclínica /clínica na população canina associada à infecção humana sugere que o cão pode atuar como possível fonte de infecção, assim como na disseminação da doença.



Zanzarini et al (2005) investigaram 67 cães em área endêmica rural no norte do Paraná onde foram verificados 22 casos humanos da doença. O período estudado foi entre setembro de 1999 a julho de 2002 coletando-se sangue canino e empregando-se imunofluorescência indireta (IFI) e intradermoreação de Montenegro. Trinta e oito cães apresentaram titulação superior à 1:40 em IFI dos 69 analisados. Observou-se que de 53 cães que não apresentavam lesão, 25 (47.2%) tiveram IFI positiva para LTA. Os resultados mostram a ocorrência simultânea de LTA humana e canina e indicaram a necessidade de estudos adicionais para esclarecer o papel do cão no ciclo de transmissão do parasito nessas áreas.

Andrade et al (2006) investigaram a presença de *Leishmania (V.) braziliensis* empregando *imprint* de tecido e PCR em 55 cães da cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais. A Reação em Cadeia de Polimerase apresentou 92% de sensibilidade e 40% de especificidade em amostras de pele.

Velasquez et al (2006) aplicaram a PCR no estudo da LTA em 143 cães no noroeste do Estado do Paraná, cidade de Mariluz. O material colhido dos animais para emprego da PCR foi sangue. A PCR foi positiva em 26,3% (10/38) dos cães com lesão e em 15,4% (16/104) dos cães sem lesão característica de LTA. A detecção de DNA do parasito no sangue pode indicar a ocorrência de disseminação hematogênica do parasito.

Dunaiski (2006) fez um levantamento na região do Vale do Ribeira, Paraná, área endêmica para LTA em humanos, analisando os soros de 299 cães oriundos de áreas com casos autóctones humanos. Para evidenciar o papel dos caninos na manutenção do ciclo da LTA no Vale da Ribeira, empregou método de diagnóstico sorológico. Ao ensaio imunoenzimático 45 cães apresentaram sorologia positiva. Houve apenas um cão com lesões compatíveis com a doença na forma cutâneo-mucosa. Neste estudo, Dunaiski não evidenciou fatores que associam o cão a uma possível manutenção do parasito e conseqüente contaminação do vetor e transmissão para humanos.

A incidência de LTA no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os Estados. Surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste,

Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA no país.

O Ministério da Saúde possui o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), onde é possível acessar informações sobre a ocorrência dos mais variados agravos no País. Dentre as enfermidades cadastradas no SINAN estão as leishmaníases, tanto visceral quanto tegumentar. O coeficiente de incidência da LTA por 100.000 habitantes, nas tabulações realizadas entre os anos de 2001-2005, tendo como alvo a região metropolitana de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, nos anos de 2002, 2003 e 2004, respectivamente, são: 14, 12 e 7, totalizando 33 casos.

O mesmo banco de dados do Ministério da Saúde tabulou a prevalência da LTA no período de 2000 a 2008, por 100.000 habitantes, nos municípios de residência no Estado do Rio Grande do Sul gerando a tabela 2, mostrada a seguir.

Tabela 2: Prevalência de casos humanos autóctones de LTA por município de residência, RS, Brasil, 2001-2008:

MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	TOTAL
Porto Alegre	0	14	42	28	0	0	4	1	89
Rolador	0	7	0	0	0	0	0	0	7
Santo Antonio das Missões	14	0	0	0	0	0	0	0	14
São Miguel das Missões	0	0	7	0	0	0	0	0	7
Tenente Portela	0	0	0	0	7	0	0	0	7
Total	14	21	49	28	7	0	4	1	124

Fonte: SINAN-MS, 2008

Através das informações do SINAN-MS, analisando as fichas de notificação de 2000 até o ano de 2008, identificou-se em quais residências com a ocorrência de casos humanos autóctones de LTA, existiam caninos, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Número de casos humanos autóctones de LTA por município de residência, com a presença de cães nas residências, RS, Brasil, 2001-2005.

MUNICÍPIO DE RESIDÊNCIA	2001	2002	2003	2004	2005	TOTAL DE CÃES
Porto Alegre	0	7	21	14	0	42
Rolador	0	7	0	0	0	7
Santo Antonio das Missões	14	0	0	0	0	14
São Miguel das Missões	0	0	7	0	0	7
Tenente Portela	0	0	0	0	7	7
Total	14	14	28	14	7	77

Fonte: SINAN-MS, 2008

A Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul publicou no seu informativo trimestral, em 2005, a distribuição de casos de LTA, em três grupos etários, de 15 a 30 anos, de 31 a 45 anos e de 46 a 69 anos, com prevalências de 17,6%, 17,6% e 64,8%, respectivamente. O mapeamento dos municípios do Estado com casos humanos confirmados, no período de 2001-2005 é mostrado na tabela 4 e figura 7 (SANTOS, 2005a).

Tabela 4 - Casos Autóctones de Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul, 2001 a 2005.

Nº do caso	Data da Notificação	Local Provável de Infecção	Sexo	Idade
1	15.06.01	Viamão	M	69
2	08.08.01	Sto. Antônio das Missões	F	51
3	09.08.01	Sto. Antônio das Missões	M	65
4	28.08.02	Rolador	M	55
5	17.10.02	Porto Alegre	F	34
6	30.05.03	São Miguel das Missões	M	45

7	12.11.03	Porto Alegre	F	51
8	11.08.03	Porto Alegre	M	15
9	10.10.03	Porto Alegre	F	59
10	10.10.03	Porto Alegre	M	57
11	13.10.03	Porto Alegre	M	53
12	10.11.03	Porto Alegre	M	54
13	29.12.03	Capão da Canoa	M	31
14	05.03.04	Porto Alegre	F	55
15	19.07.04	Porto Alegre	M	51
16	03.01.05	Porto Alegre	F	24
17	04.03.05	Porto Alegre	M	26

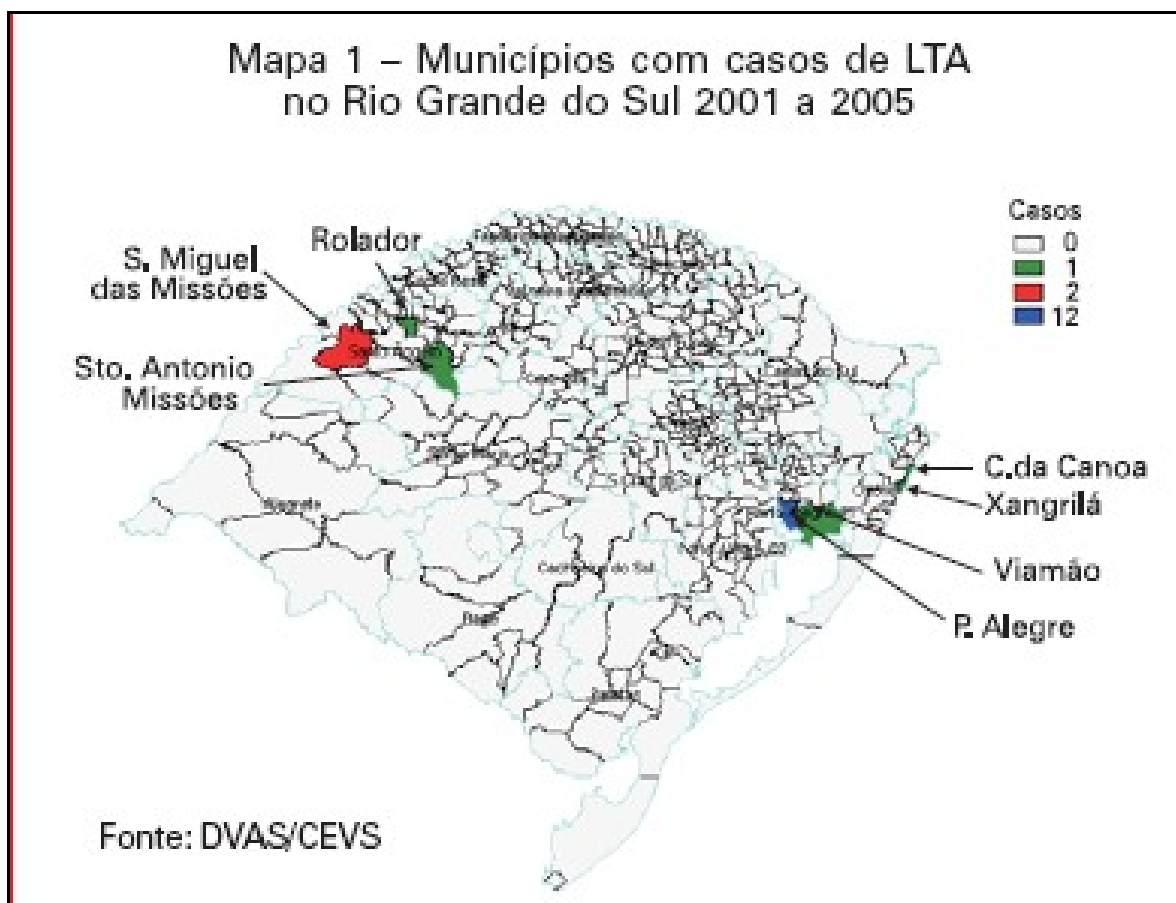


Figura 7 – Mapeamento dos municípios com casos de LTA no Rio Grande do Sul de 2001 a 2005  
Fonte: SES/CEVS/DVAS

A Equipe de Vigilância das Doenças Transmissíveis da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre publicou, em 2008, a investigação de 5 casos de LTA em 2007, sendo 5 confirmados. Destes casos, 4 residentes em Porto Alegre (Boletim Epidemiológico, 2008). No ano de 2008, investigou-se 1 caso humano, residente no município de Porto Alegre, que foi confirmado.

#### 4. PATOGENIA DA LTA

O período de incubação é de 2 a 4 meses, mas pode variar de 10 dias a 24 meses.

A patogenia da LTA centraliza-se no mecanismo da relação parasito-hospedeiro o qual estimula uma resposta imune específica. Como citado anteriormente por GONTIJO (2003), no intestino do inseto vetor, as formas promastigotas sofrem o processo de metaciclogênese, tornando-se infectantes (promastigotas metacíclicas) e migram para a faringe e cavidade bucal, onde, através do repasto sangüíneo, serão transmitidas ao hospedeiro vertebrado (M.S., 2006b). Haverá um processo de interação entre a forma infectante do parasito com as células do sistema fagocítico mononuclear, com a perda do flagelo e, sob a forma amastigota, multiplicam-se no interior das células (fagolisossoma).

Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as leishmânias desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, conseguindo sobreviver neste ambiente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Como consequência deste processo, haverá a liberação de partículas antigênicas que provocarão uma resposta específica do sistema imune, influenciando a evolução da doença para a cura espontânea, ou formas autolimitadas ou formas progressivas (M. S., 2006a).

As alterações no organismo decorrentes da presença do parasito, dependem do binômio infectividade e antigenicidade de *Leishmania* spp. e da imunidade e resistência já existentes ou desenvolvidas pelo hospedeiro após a infecção (SILVEIRA, 2004). O quadro histopatológico geral da LTA é representado por um infiltrado celular histiolinfoplasmocitário (padrão exsudativo celular), junto a uma

reação granulomatosa que pode surgir associada ou não à necrose (MAGALHÃES, 1986), e em até 2 meses de evolução da doença.

#### 4.1 Imunopatogênese na LTA:

Segundo M.S.(2006a), para o controle da infecção, é necessária a predominância da resposta imune celular com características de tipo 1, envolvendo linfócitos CD4 e CD8, citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), linfotoxina e algumas citocinas produzidas por macrófagos. Esta resposta resulta da ativação dos macrófagos, capacitando-os na eliminação dos parasitos, controlando a infecção. A diminuição do número de parasitos leva à redução do estímulo da resposta imune devido ao menor aporte de antígenos. Desta forma, a cicatrização ocorre através do controle do processo inflamatório (morte de células efectoras não estimuladas), aumento da função de fibroblastos, fibrose e tecido cicatricial.

ROBERTS et al (2000) em seu estudo demonstraram que a principal defesa contra os protozoários que sobrevivem aos macrófagos, incluindo a *Leishmania* spp., é a imunidade celular. A resistência à infecção está associada à ativação de linfócitos T CD4 Th1. Muitos estudos relatam que a imunidade contra a *Leishmania* spp. é dependente da interleucina-12 produzida pelos macrófagos ou por células dendríticas, levando à produção do interferon gama, tanto por células do sistema imune nato (células Natural Killer) quanto adquirido (células T CD4). O Interferon-gama media esta proteção por regular positivamente a expressão macrofágica mediante a indução da produção de óxido nítrico, que é letal para o parasito.

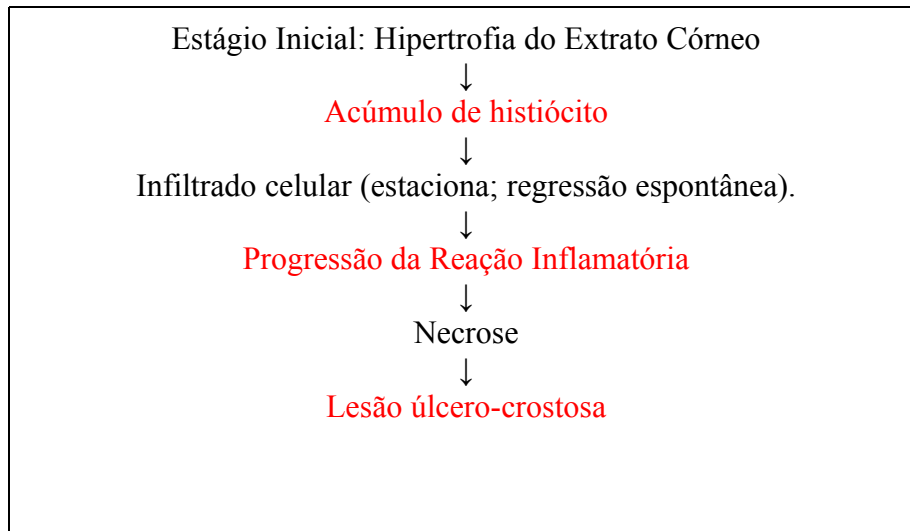
As células T CD8 colaboram para uma resposta imune protetora na infecção causada por *Leishmania* spp. (REIS et al, 2006).

É importante ressaltar que o parasito apresenta características que lhe permitem "fugir" dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Na fase de crescimento do parasito no tubo digestivo do flebotomíneo, ocorre a expressão de moléculas de superfície modificadas, que, no momento da interação com a célula do hospedeiro, impedem a deposição de complexos do sistema complemento promotores da lise

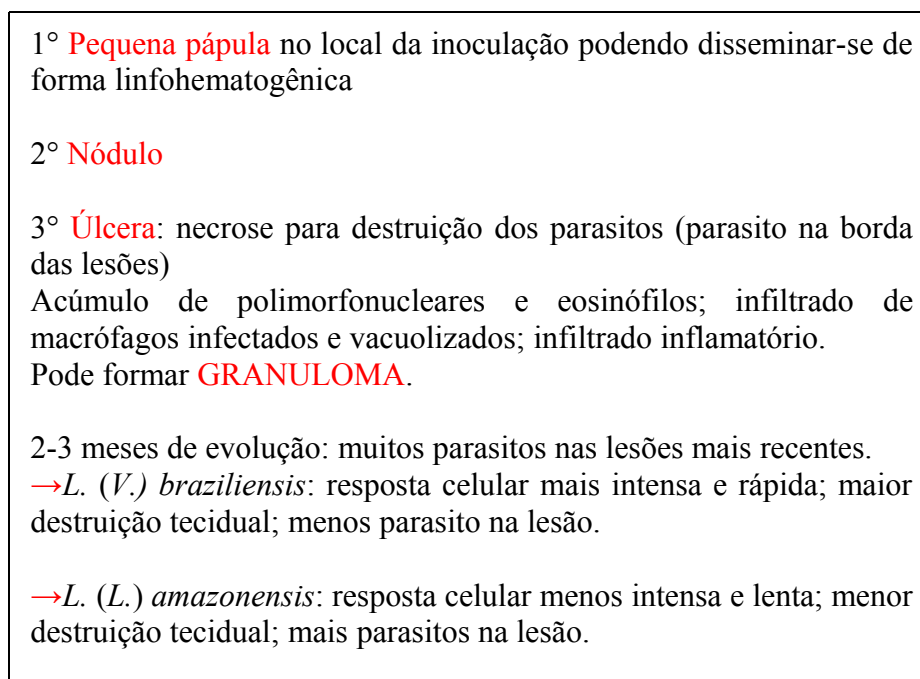
celular, além de interferirem na ativação de componentes terminais de complemento, protegendo o parasito (M.S., 2006b).

As alterações no organismo conseqüentes à presença do parasito são dependentes do binômio infectividade e antigenicidade de *Leishmania* e/ou da imunidade e resistência nata do hospedeiro, descritas a seguir nos quadros 1 e 2:

Quadro 1: Progressão da lesão- aspectos histopatológicos



Quadro 2: Progressão da lesão-aspectos clínicos





## 4.2 Sinais clínicos

### 4.2.1 Sinais clínicos em humanos:

As leishmanioses são importantes em termos de morbidade e algumas são severas em termos de mortalidade (MAYRINK & MAGALHÃES, 1999).

*Leishmania (V.) braziliensis* causadora de lesões cutâneas e mucosas, é encontrada do norte ao sul do Brasil, em áreas de colonização antiga e recente, e está associada com a presença de animais domésticos tais como os caninos e eqüinos (MARZOCHI, 1994).

Segundo a OMS (2002), as diferentes apresentações das leishmaníases constituem severo problema de saúde pública: a Leishmaniose Visceral (LV) é fatal se não tratada, a Leishmaniose Muco-cutânea (LMC) é desfigurante e mutilante, a Leishmaniose Cutâneo-difusa (LCD) é incapacitante e a Leishmaniose Cutânea (LC) é incapacitante quando suas lesões são múltiplas.

#### A) FORMA VISCERAL (LV):

É a mais grave ocasionando febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, sendo fatal se não tratada (MODABBER, 2006).

#### B) FORMA CUTÂNEA (LC):

Começa com uma pápula ou nódulo no sítio de inoculação pelo mosquito infectado. A pápula cresce lentamente e ulcera para formar uma úlcera crônica. Apresentam, geralmente, lesões únicas, ovaladas, ulceradas, com bordas infiltradas e elevadas, fundo granulomatoso e elevado. Pode estar presente exsudato.

A forma cutânea pode também apresentar lesões múltiplas ou disseminadas. A úlcera típica, em geral, é indolor, variando de tamanho menor que 1,0 cm a mais de 10,0 cm. Observam-se outros tipos de lesão: ulcero-crostosa, impetigóide, ectimatóide, ulcero-vegetante, verrucosa, tuberosa, liquenóide e outras. Nestas formas, na fase inicial, encontra-se adenopatia satélite, que pode preceder a lesão de pele. Às vezes no cordão linfático podem se desenvolver nódulos que se ulceram. As lesões cutâneas, ao evoluírem para a cura, costumam deixar cicatrizes.

### C) FORMA DIFUSA (LCD):

Considerada uma forma rara da LTA, apresentando teste intradérmico de Montenegro (IDRM) negativo, caracterizando-se por maciço comprometimento dérmico de natureza crônica (ausência de úlceras). A resposta celular está ausente.

### D) FORMA MUCOSA (LCM):

A apresentação mucosa da LTA é, na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas, surgindo meses ou anos após as lesões cutâneas. São mais freqüentemente acometidas as cavidades nasais, seguidas da faringe, laringe e cavidade oral.

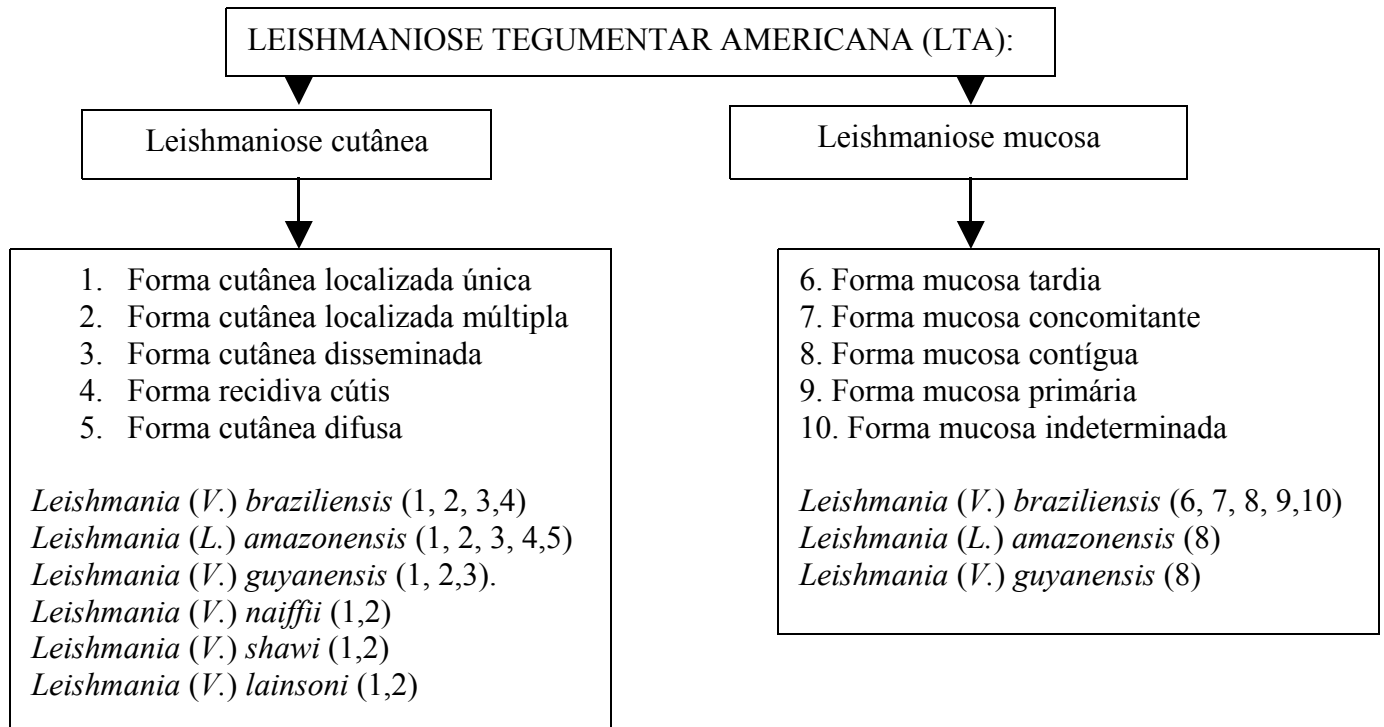
Ao exame clínico, pode-se observar nas mucosas atingidas infiltração, ulceração, perfuração do septo nasal ulcero destrutiva. Outras mucosas, como língua e órgãos genitais, são raramente atingidas.

A apresentação mucocutânea da LTA em que se verifica a presença de lesões associadas na pele e na mucosa pode ser concomitante (o acometimento mucoso à distância da lesão ativa em pele), ou contígua (o comprometimento mucoso ocorre por extensão da lesão de pele situada próxima de mucosas).

O comprometimento ganglionar pode ser primário (enfartamento de gânglios precedendo a lesão de pele) ou secundário (enfartamento de cadeia ganglionar na região da lesão de pele, após a identificação desta). (LAISON, 2006; MARZOCHI, 1994; FUNASA, 2000; M. S., 2005).

Com base em estudos anteriores, considerando as formas de resposta do hospedeiro, a partir do local da picada do vetor, e a localização das lesões e a evolução clínica da LTA, MARZOCHI (1994) propõe, no quadro 3, uma classificação clínica da LTA, envolvendo as diferentes formas e apresentações da doença e seus respectivos agentes etiológicos:

Quadro 3: Classificação clínica e respectivos agentes etiológicos da LTA, segundo MARZOCHI (1994)



#### 4.2.2 Sinais clínicos em cães

A Leishmaniose Canina Visceral (LCV) é uma zoonose presente em várias regiões do mundo, e apresenta algumas variações no ciclo epidemiológico, conforme a espécie do agente etiológico, a região geográfica e as espécies de mamíferos susceptíveis que são expostas ao risco da infecção (ANAIS, 2007).

No Brasil, a LCV, também denominada Calazar, tem sido registrada como resultado da infecção pela *Leishmania (L.) chagasi* estando envolvido o vetor *Lutzomyia longipalpis*. Dentre os reservatórios são referidas espécies animais silvestres e domésticas, sendo os caninos considerados como o principal reservatório para seres humanos, especialmente em áreas urbanizadas (M.S., 2007).

Até o momento, não foi evidenciada predisposição sexual, racial ou etária relacionada com a infecção. A infecção causa uma doença sistêmica crônica dependente de propriedades do parasito e da imunocompetência do hospedeiro. A evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas. Em

alguns animais, o desenvolvimento da doença pode ser latente, podendo até mesmo haver cura espontânea. As manifestações clínicas da doença no cão e no homem são semelhantes e apresentam sinais inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final. A hipertermia varia entre 40,5°C e 41°C (ANAIS, 2007).

A emaciação é geralmente um sinal de envolvimento visceral. Nos órgãos linfóides, a proliferação de linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos podem resultar em linfadenomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia. As alterações dermatológicas são bastante freqüentes em animais com LCV e podem ocorrer na ausência de outros sintomas. São elas: excessiva descamação da epiderme (região periocular, borda dos pavilhões auriculares ou difusas por todo o corpo), alopecia, despigmentação cutânea, hiperqueratose, lignificação, úlceras (face, nariz, pavilhão auricular, região interdigital) e, nódulos intradérmicos (multiplicação das formas amastigotas na epiderme). Há também onicogribose, associada à presença do parasito estimulando a matriz ungueal (GONTIJO & MELO, 2004).

Encontra-se mioatrofia, glomerulonefrite proliferativa, nefrite intersticial ocasionando insuficiência renal e morte (ALMEIDA et al, 2005).

As leishmanias se multiplicam em macrófagos do fígado produzindo hepatite ativa crônica, hepatomegalia, vômitos, poliúria, polidipsia, anorexia e perda de peso. Quadros de LCV podem vir acompanhados de ulcerações na cavidade nasal e lesões oculares (blefarite, dermatite facial, uveíte bilateral) (BARBIERI, 2006).

No sistema nervoso, destacam-se tetraparesia, convulsões, mioclonias, andar em círculos, nistagno, alteração em nervos cranianos (ptose labial, estrabismo e paralisia de mandíbula). A incidência de problemas locomotores em LCV decorre de neuralgia, poliartrite, sinovite, polimiosite, osteomielite, fissuras nos coxins ou úlceras interdigitais (MARCONDES et al, 2003).

Infecções combinadas com Erliquiose, Babesiose e Dirofilariose são comuns.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) causada pela *Leishmania (V.) braziliensis* tem sido descrita por diversos autores em ambientes domésticos, apesar de ser uma zoonose originalmente silvestre. Tem-se levantado a hipótese de que

animais domésticos, em especial o cão, estariam atuando como importante fonte de infecção nestes locais (SANGIONI, 2007).

As alterações dermatológicas sugestivas de LTA em cães localizam-se nas orelhas, na bolsa escrotal e no focinho (figuras 8 e 9), sendo na maior parte, lesões únicas, ulceradas ou ulcero-crostosas e de evolução crônica (MADEIRA et al, 2003; M.S., 2006a).



Figura 8: úlceras no focinho de cão

Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007



Figura 9: úlceras no saco escrotal de cão

Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007

TARANTO et al (2000) descreveram dois casos de caninos com lesões mucocutâneas causadas pela *Leishmania* spp. Ambos os cães apresentavam destruição do septo nasal, hiperemia com edema do palato mole e alteração ao latir devido ao comprometimento da laringe.

## 5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LTA pode ser realizado com base nos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, na evidenciação do parasito em exames diretos ou indiretos (pele, mucosas ou gânglios acometidos), através de provas imunológicas ou métodos de biologia molecular.

Para o diagnóstico da LTA devem-se levar em consideração a presença de *Leishmania*, as provas imunológicas e moleculares, dados epidemiológicos, tais como: existência de casos de LTA na região, procedência de área endêmica; referência de cães ou eqüídeos com lesões; inserção em áreas de floresta ou desmatadas (M.S.,2006a).

### 5.1 Diagnóstico no ser humano

O diagnóstico da LTA nas formas cutânea e mucosa é basicamente clínico, associado à pesquisa direta em material de raspado ou punção aspirativa da lesão, corado pelo método de Giemsa, Leishman ou outros derivados de Romanowsky, exame histopatológico (HE) de biópsia de lesão, isolamento em cultura, intradermoreação de Montenegro (IDRM) e reação de imunofluorescência indireta (IFI) (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) tem sido empregada com sucesso no diagnóstico da LTA, mostrando alta sensibilidade e especificidade (GARCIA et al, 2005).

A PCR, desenvolvida por SAIKI et al (1985), baseia-se na replicação *in vitro* da molécula em dupla fita do DNA. É usada para amplificar um segmento de DNA posicionado entre duas regiões de seqüência conhecida (CANTARINO, 1998). Este método diagnóstico também é útil na identificação da persistência parasitária após terapêutica (OSMAN et al, 1998) e, no estudo da infecção subclínica, pois o tripanossomatídeo mostrou-se presente em indivíduos saudáveis com intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva (FAGUNDES et al, 2007).

Na Leishmaniose Visceral, é empregada na avaliação do prognóstico e cura clínica (CASCIO et al, 2002).

#### 5.1.1 Diagnóstico epidemiológico

Devem-se levar em conta a procedência do paciente, residências anteriores, atividades relacionadas com desmatamento ou atividades de lazer em florestas. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado pela IDRM positiva e pela resposta terapêutica (MS, 2006a).

#### 5.1.2 Diagnóstico laboratorial

##### - EXAMES PARASITOLÓGICOS:

A demonstração da presença do parasito é realizada por meio de exames direto ou indireto. Nas leishmanioses tegumentárias demonstra-se a presença das formas amastigotas nos tecidos infectados (lesões cutâneas ou lesões mucosas) e, das formas promastigotas, tentará se isolar diretamente das lesões suspeitas empregando-se o cultivo *in vitro* (isolamento primário das lesões cutâneas pela técnica de aspiração) (CUBA, 2000).

##### A) Demonstração direta:

É o procedimento de primeira escolha, de baixo custo e fácil execução.

Os diferentes métodos diagnósticos utilizados para cada forma de leishmaniose (cutânea, mucocutânea ou visceral) variam muito, mas o achado

principal em todos os casos é o isolamento ou a identificação do parasito em tecidos apropriados.

A probabilidade de encontra-se o parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano.

Os métodos empregados na demonstração direta são: escarificação do bordo da lesão, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa da lesão. O exame microscópico direto é a forma mais simples e rápida, embora não detecte o parasito em todos os casos. Os fragmentos de biópsia devem ser fixados em lâmina com o uso de metanol e coloração pelo Giemsa (M.S., 2006b).

#### B) Isolamento em cultivo *in vitro*

A cultura para *Leishmania* spp é empregada para isolar o parasito de aspirados de lesões cutâneas ou de biópsias. Os dois meios de cultura mais usados são o NNN (Novy-Mac Neal-Nicole) e LIT (Liver Infusion Triptose) empregando-se a temperatura entre 24-26 °C.

Opcionalmente, pode-se utilizar material obtido das úlceras por punção com vacutainer contendo meio de cultura.

No caso da doença mucosa, a cultura costuma ser mais sensível para o diagnóstico do que a microscopia direta. (MARZOCHI et al, 1994; LOUREIRO et al, 1998; ; CUBA, 2000; FAGUNDES et al, 2003; CRLeish-IPECFIOCRUZ, 2003; BASSANO & CAMARGO, 2004; GARCIA et al, 2005; MS, 2006b).

#### C) Isolamento *in vivo* (inoculação em animais):

Inocula-se material obtido por biópsia ou lesão via intradérmica, no focinho e/ou patas de hamster (*Mesocricetus auratus*); as lesões desenvolvem-se a partir de um mês após a inoculação. É um método complexo, caro e pouco utilizado (MARZOCHI et al, 1994; LOUREIRO et al, 1998; CUBA, 2000; FAGUNDES et al, 2003; CRLeish-IPECFIOCRUZ, 2003; BASSANO & CAMARGO, 2004; GARCIA et al, 2005; MS, 2006b).



## - EXAMES IMUNOLÓGICOS:

São métodos indiretos de diagnóstico:

### A) Teste intradérmico (Intradermorreação de Montenegro – IDRМ):

Em 1926, Montenegro realizou pela primeira vez a reação intradérmica com antígeno preparado a partir de formas de cultura de *Leishmania* spp para o diagnóstico da moléstia.

Trata-se de um método diagnóstico indireto no qual se faz a mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasito, que deve ser medida em 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de endureção maior que 5 mm.

O teste é positivo a partir do 4º mês após o início da lesão cutânea. É habitualmente negativo nas formas cutâneas difusas e nos pacientes imunodeprimidos. Estima-se positividade de 84% a 100% nas formas cutâneas e mucocutânea. Após a cura clínica, a IDRМ pode permanecer positiva durante vários anos.

O teste de Montenegro na Leishmaniose Visceral aguda é sempre negativo.

Na prática, a IDRМ positiva em um paciente com suspeita clínica de LTA, pode ser interpretada como resposta imune específica a antígenos do parasito. No entanto, o sucesso do diagnóstico de certeza depende de diferentes fatores como a espécie de *Leishmania* causadora da doença, a forma clínica, o tempo da evolução da lesão e outras variáveis (MARZOCHI et al, 1994; LOUREIRO et al, 1998; CUBA, 2000; FAGUNDES et al, 2003; CRLeish-IPECFIOCRUZ, 2003; BASSANO & CAMARGO, 2004; GARCIA et al, 2005; MS, 2006b).

### B) Sorologia:

Os testes sorológicos são de utilidade clínica limitada para o diagnóstico da Leishmaniose Cutâneo-mucosa, forma onde a sensibilidade e especificidade são baixas. Ao contrário, esses mesmos testes são altamente sensíveis para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral.

Esses testes detectam anticorpos anti-leishmania circulantes no soro dos pacientes com títulos geralmente baixos. A técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) não está disponível comercialmente, tendo seu uso restrito em pesquisa (MS, 2006a).

Dentre os métodos sorológicos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) é o mais utilizado. É uma técnica sensível, porém com possibilidade de reações cruzadas, especialmente com a Doença de Chagas e Calazar. A IFI apresenta resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasito quer pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Geralmente negativa na forma cutânea difusa, com sensibilidade em torno de 71% nas formas cutâneas e 100% na forma mucosa. Em pacientes com lesões recentes (1-6 meses de evolução), é freqüente a negatividade sorológica. Portanto, A IFI não deve ser empregada como critério isolado para o diagnóstico de LTA (MARZOCHI et al, 1994; LOUREIRO et al, 1998; CUBA, 2000; FAGUNDES et al, 2003; CRLeish-IPECFIOCRUZ, 2003; BASSANO & CAMARGO, 2004; GARCIA et al, 2005; MS, 2006b).

#### - EXAMES MOLECULARES – Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR é um método indireto de diagnóstico da LTA.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, a PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico da LTA, mostrando alta sensibilidade e especificidade.

Pelo método PCR-RFLP (PCR- restriction fragment length polymorfism), empregando-se enzimas de restrição nas amostras cujos exames da PCR foram positivos, é possível identificar as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, de forma rápida e econômica, sem a necessidade de realizar o seqüenciamento, mas com igual segurança e eficácia.

A PCR pode ser realizada a partir de vários materiais clínicos e amostras biológicas, tais como: sangue periférico (creme leucocitário), biópsias de lesões cutâneas, cicatrizes, biópsias de pele sadia, de lesões mucosas, de vísceras e de flebotômicos (MARZOCHI et al, 1994; LOUREIRO et al, 1998; CUBA, 2000; FAGUNDES et al, 2003; CRLeish-IPECFIOCRUZ, 2003; BASSANO & CAMARGO, 2004; GARCIA et al, 2005; MS, 2006b).

## 5.2 Diagnóstico diferencial

Nas lesões cutâneas devem ser excluídas as lesões traumáticas, as de estase, as tropicais, as por diabetes, as por anemia falciforme, as piodermites, paracoccidiodomicose, esporotricose, cromoblastomicose, neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose, devendo-se a hanseníase virchowiana ser incluída quando se tratar de leishmaniose cutânea difusa.

Nas lesões mucosas, devem ser excluídas a paracoccidiodomicose, a hanseníase virchowiana, rinoscleroma, sarcoidose, boubas, sífilis terciária, granuloma médio facial e neoplasias (BASANO & CAMARGO, 2004; M.S., 2005, RAZERA et al, 2005).

## 5.3 Diagnóstico em cães

Em cães o diagnóstico pode ser realizado pela apresentação clínica ou por métodos laboratoriais.

O diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana podendo ser baseado no diagnóstico parasitológico (exames de observação de lâmina, histopatológico ou cultura) ou sorológico (reação de imunofluorescência indireta-IFI e ensaio imunoenzimático-ELISA) (M.S., 2006a).

SANTOS et al (1998) realizaram um inquérito sorológico em população canina o teste cutâneo immunoleish em áreas endêmicas de LTA, no Estado do Rio de Janeiro, em sete localidades: Jacarepaguá, Sacarrão, Mesquita, Chatuba, Paraty, Ilha do Araújo, São José do Vale do Rio Preto, Santa Isabel, Rio Bonito e Braçanã do Norte, entre os anos de 1986 a 1993. Duzentos e setenta cães foram examinados, segundo os parâmetros: clínicos, desenvolvimento de hipersensibilidade tardia e dosagem de anticorpos por IFI, 28,2% dos animais possuíam lesões e 3,3% eram portadores de cicatrizes compatíveis com infecção prévia de *Leishmania* spp. De um total de 98 lesões ulceradas detectadas, 39,5% eram cutâneas únicas, 25,0% lesões cutâneas múltiplas, 31,6% lesões de mucosa e 4,0% lesões de mucosa associadas às lesões cutâneas. Doze amostras (15,8%) colhidas de fragmentos de lesões cutâneas

foram identificadas como *Leishmania (V.) braziliensis*. A prevalência da infecção canina avaliada pelo teste cutâneo e pela IFI foram respectivamente de 40,5% e 25,5%. A comparação entre as reações mostrou que o teste cutâneo foi superior na detecção da infecção e da doença canina, embora, sem diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). A sensibilidade e a especificidade proporcional foram, respectivamente, de 84,0% e 74,0%. A utilização de ambas as reações, cutânea e sorológica mostraram-se úteis como instrumento de diagnóstico epidemiológico em áreas de LTC.

SANTOS et al (2005b), realizaram um inquérito epidemiológico sobre LTA na população canina, em área endêmica, no município de Paracambi, RJ, no período entre 1992 e 1993. Participaram do inquérito 179 cães, com e sem sintomatologia. Dentre os animais cadastrados, 138 foram avaliados segundo seus aspectos clínicos. Nove animais (6,5%) apresentavam lesões ou cicatrizes suspeitas de LTA. Realizaram-se biópsias das lesões cutâneas e/ou mucosas e cicatrizes suspeitas. Os fragmentos foram separados para impressão em lâminas de vidro e para isolamento parasitário *in vitro* e *in vivo*. A presença de lesão/cicatriz cutânea nos animais esteve sempre associada aos resultados positivos em IFI e ELISA. A prevalência da infecção canina foi: 10,1% (IDRM), 16,7% (IFI) e 27,8% (ELISA).

No local do estudo, junto aos cães com LTA sob forma sintomática e subclínica, encontraram-se 6 casos humanos, sendo 4 recentes e 2 antigos, podendo sugerir que o cão pode apresentar algum papel na cadeia de transmissão da LTA em Paracambi.

SERRA et al (2003) descreveram a LTA canina no Condomínio Morada das Águias (Serra da Tiririca), no município de Maricá, RJ. Em Maricá, a ocorrência de casos humanos e caninos de LTA tem sido associada com a ocupação humana próxima às encostas.

Efetou-se um censo na população canina do Condomínio Morada das Águias. Os 83 cães cadastrados foram avaliados clinicamente quanto à presença de lesões sugestivas de LTA. Procedeu-se à biópsia das lesões encontradas e também à cultura para o gênero *Leishmania*. Amostras de sangue foram coletadas para o

diagnóstico sorológico (IFI e ELISA). Para IFI consideraram-se positivas as amostras com titulação igual ou superior a 1:40, totalizando 11 (13,2%) positivos dos 83 cães avaliados. No ensaio imunoenzimático (ELISA) pesquisou-se Ig total de cão, específico para antígenos de *Leishmania*, com 30 (36,1%) reagentes.

A maioria dos casos caninos confirmados pelo isolamento parasitário ocorreu na rua da encosta da Serra da Tiririca, bem como os três casos humanos notificados.

FOLLADOR et al (1999) estudaram um surto de LTA humana no município de Santo Amaro, junto ao povoado rural de Canoa, Bahia. A leishmania envolvida foi caracterizada como *L. (V.) braziliensis* nos pacientes estudados, cães e eqüídeos.

A mata ao redor do povoado é resíduo secundário de Mata Atlântica, evidenciando extensas áreas de desmatamentos antigos e recentes.

Realizaram-se dois inquéritos sorológicos caninos, um em maio de 1993 e outro em maio de 1994. Em 1993 foi empregado IFI com sangue colhido em papel filtro e em 1994 a técnica de ELISA. Também os eqüídeos foram avaliados em outubro de 1994 através de ELISA.

Foram registrados 129 cães e 135 eqüídeos nas residências em Canoa. Dos 135 eqüídeos 17 foram reagentes positivos para ELISA.

No inquérito canino de 1993, 104 cães foram avaliados. Destes 5 (4,8%) tiveram sorologia (IFI) positiva para LTA. Em 1994, dos 100 cães estudados, 8 (8%) foram reagentes para ELISA.

A positividade encontrada nos inquéritos sorológicos em caninos e eqüinos sugere uma participação destes animais domésticos no ciclo da LTA no povoado de Canoa, embora o real papel desta participação necessite de estudos mais acurados.

VELASQUEZ et al (2006) aplicaram a reação em cadeia de polimerase (PCR) em 143 cães da área rural do município de Mariluz, Paraná, para investigar a LTA. Os cães que apresentaram lesões sugestivas de LTA e/ou aumento ganglionar foram incluídos neste estudo.

Utilizaram-se como ferramentas de diagnóstico a pesquisa direta do parasito, a imunofluorescência indireta (IFI) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Trinta e

nove cães (27,3%) apresentavam lesões sugestivas da doença, 5 (12,8%) deles foram positivos na pesquisa direta do parasito (biópsia, aspirado ganglionar) e PCR em tecido de lesão, e 4 também foram positivos na IFI (1:40). Dos 34 cães com pesquisa direta negativa, 12 (35,3%) tiveram a PCR (lesão) positiva, e 5 desses tiveram IFI positiva. Cento e quatro cães não apresentavam lesão, mas 17/101 (16,8%) apresentaram IFI positiva. A PCR no sangue foi positiva em 10/38 (26,3%) cães com lesão e em 16/104 (15,4%) sem lesão. A associação entre PCR (lesão ou sangue), a pesquisa direta do parasito e IFI detectou 24/39 (61,5%) positivos entre os cães sintomáticos e 31/104 (29,8%) positivos entre os assintomáticos. A PCR foi útil para o diagnóstico de LTA, não havendo relação entre presença de lesão, sorologia e PCR no sangue, e a detecção de DNA do parasito no sangue pode indicar a ocorrência de disseminação hematogênica do parasito em caninos.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam as pesquisas de outros autores na hipótese de que a disseminação hematogênica do parasito em cães facultaria a este animal atuar como reservatório secundário na transmissão da *L. (V.) braziliensis*.

MADEIRA et al (2003) estudaram 8 cães no município de Marica, RJ, selecionados pela presença de lesões sugestivas de LTA. Todos os cães nasceram na área, tinham mais de um ano de idade, com lesões dermatológicas nas orelhas, bolsa escrotal e focinho, na maioria únicas, ulceradas ou úlcero-crostosas e com evolução crônica. Realizou-se diagnóstico parasitológico (biópsia para isolamento *in vitro*) e diagnóstico sorológico (IFI para pesquisa de IgG e ELISA). Dos 8 animais, em 6 foi possível a confirmação parasitológica e 2 foram reagentes a IFI, um com titulação de 1:160 e outro 1:40. A *L. (V.) braziliensis* foi identificada nas amostras de lesões caninas analisadas neste estudo.

No Estado do Rio de Janeiro, a ocorrência da LTA está associada a *L. (V.) braziliensis* onde cães domésticos desenvolvem a infecção clínica semelhante ao homem.

## 6. TRATAMENTO

## 6.1 Tratamento em humanos

O SUS oferece tratamento específico e gratuito para a doença. O tratamento é feito com medicamentos específicos à base de antimônio (Glucantime® - antimoniato de N-metil glucamina ou Pentosam® – estibogluconato sódico), repouso e uma boa alimentação (M.S., 2006a). A Organização Mundial de Saúde padronizou a dose do antimonial pentavalente. São drogas de uso parenteral, leishmanicidas (formas amastigotas), média toxicidade, podendo apresentar alguns efeitos colaterais, como dores musculares e articulares, náuseas, vômitos, dores abdominais, febre e cefaléia. O mecanismo de ação se faz no sistema de bioenergia do parasito, ou seja, inibindo enzimas glicolíticas e do catabolismo dos ácidos graxos existentes em organelas denominadas glicosomas. Acredita-se que os antimoniais tenham ação moduladora sobre o sistema imune. O tempo de aplicação varia de 20 a 30 dias seguidos, variando com o tipo de lesão, cutânea ou mucosa, respectivamente. Os compostos de antimônio pentavalente, como o estibogluconato de sódio não apresentam muito efeito sobre as formas promastigotas (ALERTA, 2002; M.S., 2006a).

As drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina). A anfotericina B (Fungizon) é um antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida, utilizada quando o tratamento com antimonial não logra sucesso ou na impossibilidade de seu uso. Esta droga é considerada mais eficaz que os antimoniais no tratamento das lesões mucosas. A pentamidina é alternativa nos casos de leishmaniose cutânea (GONTIJO & CARVALHO, 2003; CAMARGO-NEVES, 2004).

BASANO & CAMARGO (2004) relataram o emprego de algumas drogas de uso tópico como paramomycin e imiquimod, associados ou não ao uso de medicamento parenteral. Ainda há como alternativa o uso do miltefosine via oral, por quatro semanas.

Ainda existem esquemas de drogas associadas àquelas citadas anteriormente, tais como: o alopurinol (formas cutâneas), cetoconazol e itraconazol (formas cutâneas) e interferon g (uso experimental em casos refratários ou formas disseminadas, associado ao antimonial pentavalente ou a anfotericina) (SILVA & CAMARGO-NEVES, 2004).

MARZOCHI et al (1998) testaram uma vacina comercial para uso em LTA com cepa de *L. amazonensis*, forma promastigota morto do parasito, diluído em solução de mertiolate salino 1:10.000. As doses foram aplicadas em 61 voluntários sadios, do sexo masculino, moradores na cidade do Rio de Janeiro, com intervalo de 7 e 21 dias, com aplicação intramuscular. A IDRM foi o teste de escolha para avaliar a resposta imune celular à vacina. Este experimento revelou que a vacina testada não apresentou efeitos colaterais que poderiam contra-indicar seu uso em pessoas saudáveis.

O foco da pesquisa moderna de vacinas é o uso de proteínas recombinantes, parasitos vivos atenuados e vacinas de DNA. O princípio de uma boa vacina contra a leishmaniose deve ser molecularmente definida e capaz de induzir memória imunológica na ausência de organismos vivos persistentes e não é desejado que a vacina não induza respostas do tipo Th2 que no caso da leishmaniose é maléfica, podendo desenvolver uma patologia severa (PINHEIRO, 2004).

## **6.2 Tratamento em caninos**

Em cães não se preconiza o tratamento da LTA e nem da LCV. A Portaria nº 1.426 de 11 de julho de 2008 proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Quanto à LCV, o tratamento não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. O uso das drogas em caninos induz a remissão temporária dos sinais clínicos, não previne as recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas no tratamento humano. Cães assintomáticos permanecem como fonte de infecção para o vetor colaborando para a expansão da doença, há extrema dificuldade de realização do tratamento e acompanhamento à longo prazo, não existem medidas de eficácia comprovada que garantam a não infectividade do cão em tratamento (FÓRUM, 2007).

Em Nota Técnica –“Uso do antimoniato de meglumina em cães”, de 20 de janeiro de 2004, o Ministério da Saúde, proíbe o uso deste medicamento para o tratamento da leishmaniose canina, quando o mesmo for de distribuição por este



Ministério. A dose de uso deste fármaco é dez vezes superior ao empregado em humanos, selecionando parasitos resistentes.

No ano de 2003 registrou-se uma vacina canina para leishmaniose visceral, a Leishmune® produzida pelo Laboratório Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Até o momento não há evidências científicas claras ao efeito da vacina na prevenção da infecção, nem sobre a infectividade do cão vacinado para o vetor (transmissão do parasito). Estes fatores são indispensáveis para a vacina ter potencial uso como estratégia de controle da leishmaniose visceral humana. Quanto à modificação do estado imunológico dos cães vacinados, é impossível diferenciar a infecção natural da vacinação, por meio dos testes imunológicos disponíveis no mercado, bem como nos Laboratórios de Saúde Pública (LACEN) e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), dificultando as ações de vigilância e controle da enfermidade visceral. Este fato gera polêmica quanto à indicação da eutanásia para animais vacinados (NOTA TÉCNICA, 2005).

## **7. CONTROLE E PREVENÇÃO**

O controle da LTA é difícil. O primeiro caso confirmado no Brasil foi em 1909, por Lindenberg, em trabalhadores rurais no Estado de São Paulo. Os processos migratórios, a ocupação das encostas de morros, desflorestamento, ocupação de áreas próximas a matas estão interligados com o aumento de casos de LTA caracterizando-a com uma enfermidade emergente. Hoje, a LTA está presente em todos os Estados brasileiros (CAMARGO & LANGONI, 2006).

Entre as ações preconizadas pelo Ministério da Saúde (M.S., 2006a), estão o manejo ambiental direcionado ao controle vetorial (limpeza em áreas urbanas, recolhimento de resíduos orgânicos e lixo, eliminação de áreas úmidas, evitar a presença de animais domésticos dentro das residências) são medidas que contribuem para prevenir ou reduzir a proliferação vetorial. O emprego de inseticidas de ação residual é uma medida de proteção coletiva e é efetiva sobre a forma adulta do inseto

transmissor. Este produto deve ser aplicado em áreas com casos autóctones humanos, áreas que apresentam transmissão moderada ou intensa e áreas com surto da doença.

Também é preconizado como medida de controle da LTA, estudos ecológicos para determinação dos reservatórios animais envolvidos no ambiente peri e intradomiciliar (cães e eqüinos); se é necessário ou não sua eliminação. Não se orienta o combate aos reservatórios silvestres conhecidos (M.S., 2005).

O desenvolvimento de drogas orais, como o miltefosine, sitamaquine e aminosidine, para o tratamento das leishmaníases em humanos são estratégias de controle positivas preconizada pela OMS (2002).

Segundo M.S. (2006a), são preconizadas como medidas preventivas para a LTA o uso de mosquiteiros com malha fina, telagem de porta se janelas, uso de repelentes, evitando-se expor nos horários de atividade do vetor (crepúsculo e noite) nos locais aonde este pode ser encontrado. Quanto aos cães é interessante o uso de telas em canis individuais ou coletivos, clínicas e hospitais veterinários para evitar ou diminuir o contato de flebotomíneos com os cães. Também podemos utilizar coleiras impregnadas com deltametrina 4%. No caso da LCV recomenda-se a eutanásia para caninos sororreagentes e/ou parasitológico positivo.

No Estado do Rio Grande do Sul, a Secretaria de Estado de Saúde, através da Vigilância Ambiental em Saúde, tem como ações no controle e prevenção da LTA: fornecimento do medicamento para LTA em humanos, capacitação das Coordenadorias Regionais em Saúde em epidemiologia e situação do agravo no Estado, capacitação dos entomologistas na captura e identificação dos vetores (*Lutzomyia* spp.), levantamento da entomofauna em várias regiões do RS com o objetivo de estudar a biologia das espécies de *Lutzomyia* spp. , capacitação dos médicos veterinários da região metropolitana de Porto Alegre na identificação de LTA em animais domésticos (cães e gatos), visando identificar as áreas onde pode estar ocorrendo a transmissão, até mesmo humana, mas que ainda não foram notificados casos (SANTOS et al, 2005a).

## 8. MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1. Amostragem:

A amostragem deste trabalho foi a mesma coletada e analisada por JESUS et al (2006)<sup>1</sup> e constitui-se em amostras de soro sanguíneo de 200 cães com raças e idades diversas, domiciliados em Porto Alegre, numa área onde ocorreram cinco casos humanos de LTA entre os anos de 2000 e 2005. Destas amostras 3,5% eram soropositivas para *Leishmania (Viannia) brasiliensis*.

### 8.2. Processamento das amostras:

#### 8.2.1. Métodos imunológicos

As amostras foram processadas pelo ELISA, utilizando kit comercial<sup>2</sup>. Elas foram testadas frente ao antígeno *Leishmania spp*, com anti-imunoglobulina canina marcada com peroxidase, com reação corada com TMB e bloqueada com ácido sulfúrico 2M. A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro 450nm. A descrição da técnica está relatada no anexo 1. Estes procedimentos foram realizados no serviço de Parasitologia do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

#### 8.2.2. Método biomolecular:

Somente as amostras positivas pelo ELISA foram submetidas ao PCR. O DNA foi extraído com DNAZOL<sup>3</sup>, amplificado por duas horas e revelado em gel de agarose a 2%. A descrição dos procedimentos está relatada no anexo 2. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

---

<sup>1</sup> kit Bio-manguinhos, com antígeno constituído por formas promastigotas de *L. (V) brasiliensis*

<sup>2</sup> kit EIE-Leishmaniose Visceral Canina Bio-manguinhos , com antígeno de *Leishmania spp*.

<sup>3</sup> Fabricante INVITROGEN

### 8.2.3. Análise estatística:

A correlação entre os resultados das técnicas imunológicas (ELISA X IFI) foi analisada pelo Teste de McNemar's.

A associação dos aspectos raça, sexo e idade com a soropositividade pelo ELISA foi analisada através do Teste Exato de Fisher.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Métodos imunológicos

#### 9.1.1. Correlação entre ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta

Das amostras testadas pelo ELISA, 30,5% (61/200) foram positivas, sendo que 4,91% (3/61) também foram positivas pela IFI.

A Tabela 5 apresenta os resultados detectados pelo ensaio imunoenzimático e pela imunofluorescência indireta nos 200 soros caninos testados oriundos de região de baixa endemicidade para LTA em Porto Alegre-RS, Brasil, agrupados conforme a concordância dos resultados.

Tabela 5: Distribuição das amostras de soros caninos de acordo com os resultados das técnicas de IFI e ELISA, Porto Alegre, novembro de 2008:

IFI *	ELISA**		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	3	4	7
NEGATIVO	58	135	193
TOTAL	61	139	200

\* Título  $\geq$  40 de imunoglobulina G

\*\* DO  $\geq$  0,500; filtro 450nm

O Teste de McNemar's, aplicado aos dados da Tabela 5, evidenciou um  $p < 0,0001$  o que indica uma diferença muito significativa entre as duas técnicas. O índice de co-positividade foi de 42,86% e o índice de co-negatividade foi 69,95%. A porcentagem de concordância global foi de 69%. O valor kappa determinado foi de 0,027 o qual indica um grau de concordância muito fraco entre as duas técnicas.

O total de soros testados que foram positivos em ambos os testes, ou ao menos em um deles foi de 65.

### 9.1.2. Correlação com idade, sexo e raça

#### - IDADE:

O Teste Exato de Fisher foi utilizado para avaliar a correlação entre a idade e a positividade em ELISA. Os 200 animais foram divididos em dois grupos distintos pela idade em meses, para a aplicação do teste, conforme segue na tabela 6.

Tabela 6 – Demonstrativo de ELISA para *Leishmania* spp, segundo a idade em meses, em 200 amostras de soro canino, Porto Alegre, novembro de 2008:

ELISA	IDADE		TOTAL
	ATÉ 12 MESES	ACIMA DE 12 MESES	
POSITIVO	07 (4%)	54 (27%)	61 (32%)
NEGATIVO	45 (22%)	94 (47%)	139 (68%)
TOTAL	52 (26%)	148 (74%)	200(100%)

De acordo com o resultado do Teste Exato de Fisher ( $p = 0,0016$ ), houve associação significativa entre a positividade em ELISA e a idade dos cães, estratificada em meses.

#### - SEXO:

A análise obtida com as 200 amostras de soro canino, em ELISA, em relação ao sexo, é demonstrada na tabela 7, a seguir:

Tabela 7 - Comparativo de ELISA para *Leishmania* spp, segundo sexo, em 200 amostras de soro canino, Porto Alegre, novembro de 2008:

ELISA	SEXO		TOTAL
	MACHO	FÊMEA	
POSITIVO	27 (14%)	41(21%)	68 (36%)
NEGATIVO	71 (36%)	61(31%)	132 (64%)
TOTAL	98	102	200 (100%)

A análise feita pelo Teste Exato de Fisher detectou  $p = 0,0732$  o que demonstra não haver diferença estatística entre os resultados obtidos na comparação entre os sexos feminino e masculino na positividade em ELISA.

#### -RAÇA:

O ensaio imunoenzimático realizado com as 200 amostras de soro canino, quanto à raça, apresentou a seguinte distribuição, conforme a tabela 8:

Tabela 8 – Resultado de ELISA para *Leishmania* spp., segundo a raça de 200 caninos, Porto Alegre, novembro de 2008:

ELISA	RAÇA		TOTAL
	SEM RAÇA DEFINIDA	COM RAÇA DEFINIDA	
POSITIVO	48 (26%)	13 (7%)	61 (32%)
NEGATIVO	86 (46%)	41 (22%)	127 (68%)
TOTAL	134 (71%)	54 (29%)	200 (100%)

De acordo com o resultado do Teste Exato de Fischer ( $p = 0,1261$ ), não foi encontrada associação significativa entre a positividade em ELISA e a presença ou ausência de raça definida (SRD).

## 9.2. Método biomolecular

Foi empregada a PCR para identificação do gênero *Leishmania* spp. nos 61 soros reagentes em ELISA sendo que o soro canino número 12c foi positivo na identificação do gênero *Leishmania* spp. em gel de agarose 2% (Figura 10). Esta amostra foi não reagente em IFI.

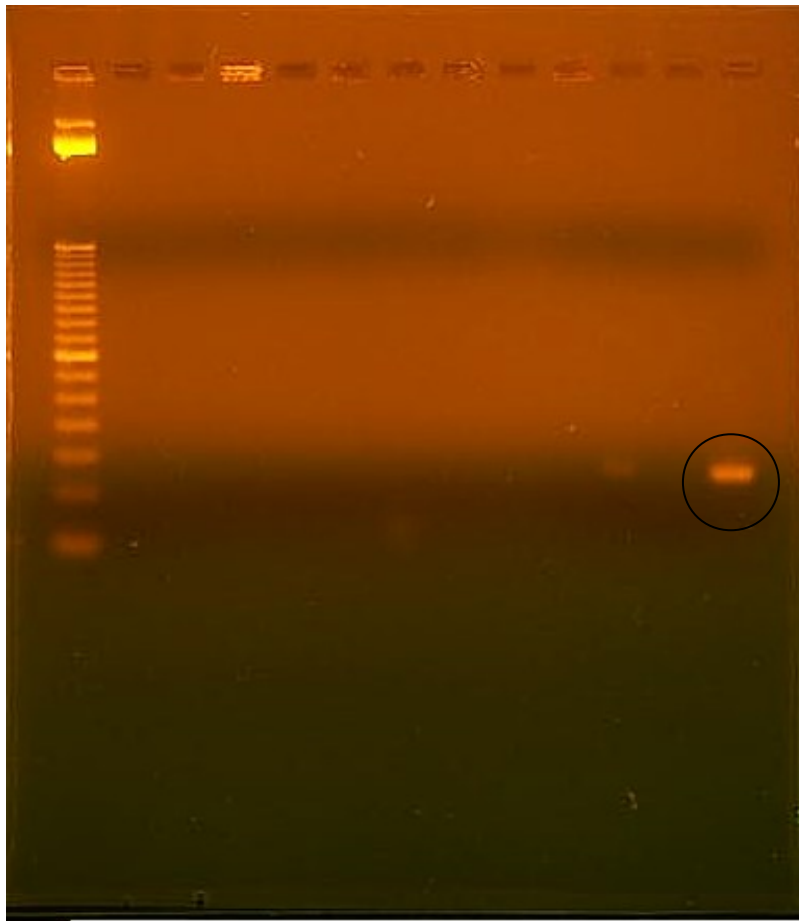


Figura 10: Gel de agarose 2% evidenciando a presença da banda 120pb na amostra 12C

Coluna 1: marcador; coluna 2: controle negativo; colunas 3 até 10: amostras que não apresentaram replicação do DNA do gênero *Leishmania*; coluna 11: amostra 12C; coluna 12: água; coluna 13: controle positivo.

## 10. DISCUSSÃO

Vários são os métodos laboratoriais empregados no diagnóstico da LTA, tanto em humanos quanto em animais domésticos (CUBA, 2000).

Muitos autores têm comparado a eficácia dos métodos diagnósticos sorológicos (IFI e ELISA) e de biologia molecular (PCR) em cães domésticos para a LTA e LCV. Podemos citar Velásquez et al (2006) que empregaram a pesquisa direta do parasito (PD), a PCR e IFI em 143 cães da área rural do município de Mariluz, PR, sendo que 39 (27,3%) caninos apresentaram lesões sugestivas da doença e 104 animais eram assintomáticos. A PCR foi empregada usando-se amostras de sangue de

38 dos 39 cães sintomáticos sendo positiva em 10 (26,3%) deles. Nos 104 caninos assintomáticos, 104 amostras foram testadas com IFI obtendo-se positividade em 17 (16,8%) cães. Destes, 2 (11,8%) também se mostraram positivos à PCR no sangue. Em Velásquez (2006) afirma-se que a detecção do DNA do parasito no sangue não está diretamente correlacionada à presença de lesões em cães. Em nosso trabalho, o canino fêmea, SRD, que apresentou a replicação do DNA do gênero *Leishmania*, foi sororreagente em ELISA, não reagente para IFI e não apresentava lesões tegumentares. Desta forma, a PCR positiva e a IFI negativa mostra que a IFI também pode apresentar resultados falsos negativos. A sorologia necessita de um correto manuseio e conservação das amostras. A detecção de DNA parasitário em soro sanguíneo pode indicar a ocorrência de disseminação hematogênica do parasito em caninos assintomáticos.

JESUS (2006) empregou a técnica de reação de imunofluorescência indireta (IFI) em 200 cães assintomáticos no município de Porto Alegre, RS, obtendo a soroprevalência de 7/200 (3,5%). Este é um dado significativo, pois os caninos testados são oriundos de área de baixa endemicidade, com casos humanos autóctones no Estado do Rio Grande do Sul, onde, até o ano de 2002 não havia notificação de casos de LTA. Nosso estudo testou estes mesmos animais frente à ELISA e PCR obtendo como resultado 61/200 (30,50%) sororreagentes em ELISA e uma amostra de soro canino com replicação de DNA parasitário. A correlação ELISA X IFI analisada estatisticamente evidenciou uma baixa correlação entre as duas técnicas, enquanto que o ELISA avaliado frente às variáveis raça, sexo e idade demonstraram que: quanto ao quesito idade, em ELISA houve uma associação significativa. O maior número de cães soropositivos concentrou-se na faixa etária acima de 12 meses, 54 (29%). Em IFI a positividade foi analisada pelo Teste do Qui-quadrado, distribuindo-se quase de maneira uniforme, concentrando-se mais nas faixas de 0-24 meses (3) e de 49-72 meses (2) não demonstrando associação significativa. Talvez isto se deva ao status imunológico de animais adultos que podem apresentar maior soroconversão. Em relação ao sexo dos animais analisados, tanto ELISA quanto IFI foram analisados pelo Teste Exato de Fisher. Como resultado, a distribuição de positividade entre os sexos não apresentou diferença estatística, mas em IFI, dentre as amostras positivas, 6 eram provenientes de machos e apenas uma de fêmea. Por último, em relação ao



critério raça analisado pelo Teste Exato de Fisher, não foi encontrada associação significativa entre a positividade para IFI e ELISA e a presença ou ausência de raça definida.

TÁVORA et al (2007) verificaram a eficácia de ELISA e IFI para a detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp em 370 cães errantes no município de Campos de Goitacazes, RJ. Demonstraram que a IFI é um bom teste confirmatório, ou seja, tem boa sensibilidade, podendo ser utilizado como contraprova de ELISA e que este é um teste adequado para triagem, já que no caso da LCV é preconizado, pelo Ministério da Saúde, o sacrifício dos animais soropositivos. No caso de nossa região em que existe baixa endemicidade e cães assintomáticos para LTA, seria interessante aplicar ambos os testes na triagem, já que em nosso estudo encontramos boa co-negatividade na correlação ELISA X IFI, mas baixa co-positividade.

SANGIONI (2007), ZANZARINI (2005) e METTLER (2005) apontaram para importância da busca ativa de caninos em áreas de ocorrência de casos humanos autóctones de LTA, já que estes animais aparentemente sadios podem servir como fonte de infecção para o inseto vetor e reservatório secundário. A detecção de níveis de anticorpos específicos (IgG1 e IgG2) é baixa em cães assintomáticos ou recentemente infectados, como os que foram analisados em nosso estudo e, este, é um fator importante em áreas de baixa endemicidade, corroborando para a importância do emprego de ELISA e IFI na detecção da infecção canina, já que ambos os testes tem boa especificidade.

O emprego de ferramentas alternativas para o diagnóstico da Leishmaniose em caninos foi discutido por Leontides et al (2002), Fissori et al (2004), Andrade et al (2005) e Nunes et al (2007). Entre estes autores existe o consenso de que a PCR, junto com os métodos sorológicos, auxilia na determinação da extensão da infecção subclínica da LTA e LCV em áreas endêmicas. ANDRADE et al (2005) concluem que a PCR comparada com a microscopia ótica, apresenta sensibilidade variando entre 75,9-96,4% e especificidade de 50,0-70,4%, de acordo com o tecido animal analisado. NUNES et al (2007) empregaram a PCR em amostras de sangue colhidas de 166 cães em Poxoréo, MT, que é uma área endêmica de LCV, obtendo como resultado 55% de sensibilidade e 66,3% de especificidade. Acreditam que a baixa

sensibilidade demonstrada deve-se ao grau de parasitemia dos animais infectados. FISSORI et al (2004) avaliaram a conveniência do uso de soro sanguíneo empregando a PCR no diagnóstico humano e canino da Leishmaniose Visceral na região do Mediterrâneo. A PCR apresentou sensibilidade de 97% e especificidade de 95%. Devido a sua sensibilidade e simplicidade em soro sanguíneo, este método diagnóstico é valioso quando o sangue total não é mais disponível e também serve como auxiliar em estudos epidemiológicos em portadores assintomáticos. No estudo realizado em Porto Alegre/RS, na qual a LTA apresenta baixa endemicidade, testou-se o soro de 61 cães frente ao DNA gênero específico na PCR para avaliar a replicação ou não do mesmo nas amostras analisadas. Como em FISSORI (2004) obteve-se como resultado uma baixa sensibilidade, já que apenas uma amostra replicou o DNA de *Leishmania*, provavelmente devido à baixa parasitemia encontrada nos cães envolvidos neste estudo.

Na Grécia, Leontides et al (2002), compararam os resultados da PCR a partir da coleta de material da medula óssea com IFI numa população de 73 cães de caça clinicamente saudáveis e obtiveram, respectivamente, positividade em 46/73 (63%) e 9/73 (12,3%). Estes achados demonstraram que cães oriundos de áreas endêmicas para *Leishmania spp.* estão infectados e apresentam-se, na maioria, soronegativos revelando que a real prevalência nestes animais é subestimada. O canino que apresentou replicação do DNA gênero específico para *Leishmania spp.*, em nosso estudo, foi reagente negativo para IFI e sororreagente para ELISA, mostrando a importância do emprego destas ferramentas imunológicas no diagnóstico da LTA.

Todos estes estudos realizados em humanos e em cães residentes nas áreas endêmicas de *Leishmania spp.* tentam buscar alternativas de diagnóstico rápido e seguro com baixo custo. Mesmo que o diagnóstico definitivo das Leishmaníases seja através da demonstração da forma amastigota em biópsias, cultura ou ainda pela inoculação em animais de laboratório, faz-se necessário encontrar outras ferramentas mais rápidas, simples e com alta sensibilidade e especificidade que possam ser empregadas tanto em humanos quanto para os caninos. Seria a PCR a ferramenta mais adequada em estudos epidemiológicos em populações assintomáticas? A PCR tem alta especificidade, mas na população testada no nosso trabalho apresentou baixa

sensibilidade frente à ELISA. Pelo seu alto custo, ela não seria mais indicada para o diagnóstico clínico?

A questão crucial que envolve o controle da leishmaníase humana e canina é o quanto cães assintomáticos, mas infectados, são capazes de se manter como reservatórios potenciais secundários, retro-alimentando os mosquitos vetores e, conseqüentemente, favorecendo a permanência da enfermidade em ambientes silvestres e modificados aonde o homem vive ou exerce atividade econômica. A compreensão do real papel do cão na transmissão da LTA não está completamente esclarecida. A identificação da *Leishmania* spp. causadora da enfermidade em caninos torna-se essencial para esclarecer a epidemiologia da doença e definir as medidas de controle a serem adotadas nas políticas de saúde pública visando impedir o avanço da LTA no País.

## 11 CONCLUSÃO

- A identificação de cães soropositivos, sem sintomatologia, em área de baixa endemicidade no município de Porto Alegre, com casos humanos autóctones, serve como alerta e ponto de partida para mais investigações sobre a epidemiologia da LTA no RS e também sobre o emprego de outras técnicas de diagnóstico mais sensíveis;
- O ensaio imunoenzimático demonstrou ser uma boa ferramenta de triagem e a imunofluorescência deve ser utilizada como teste confirmatório.
- O presente estudo demonstrou que a PCR não apresenta resultados falso-negativos em relação ao ELISA nas condições deste experimento amplificando somente o DNA correspondente ao de *Leishmania* spp..
- A PCR positiva em canino obtida neste trabalho confirma a necessidade de maiores pesquisas para a elucidação do real papel do cão na manutenção da enfermidade em região de baixa endemicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALERTA sobre transmissão autóctone de Leishmaniose cutâneo mucosa no município de Porto Alegre. **Boletim Epidemiológico da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre**, v. 5, n. 17, p. 1-5, nov. 2002.

ALMEIDA, M. A. O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227-232, 2005.

ANDRADE, H. M. et al. Leishmania species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 231-238, 2006.

ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (V) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.

BASSANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, set. 2004.

**Boletim Epidemiológico**, ano X, Porto Alegre, Ed. Progressiva Ltda., fev., 2008, p. 08.

**Boletim Epidemiológico da Secretaria de Estado de Saúde – Endemias no Paraná**. Disponível em: < [www.saude.pr.gov.br/Vigiepi/Mapa\\_site.htm](http://www.saude.pr.gov.br/Vigiepi/Mapa_site.htm) >. Acesso em 14/10/2008.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Portaria Interministerial Nº 1.426 de 11 de julho de 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), **Informativo sobre as Leishmanioses no Estado do Pará**. Brasília, DF, 2000. 17 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolos de técnicas diagnósticas das Leishmanioses IPEC-FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2003. 74 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica – “Uso do antimoniato de meglumina em cães”**. 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed.; v.1, p. 444-466. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica Vacina Anti-Leishmaniose Visceral Canina Leishmune®**. 2005.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília, DF, 2006a. 136 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2006b, 122 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF, 2007.182 p.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of Leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527-548, 2006.

CANTARINO, L. M. **Leishmaniose Tegumentar Americana: uso de técnicas da biologia molecular (PCR) no diagnóstico de infecção em roedores da coleção do Museu Nacional - UFRJ**. 1988. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde Pública) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

CASCIO, A. et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. **Pediatrics**. V. 109, n. 2, feb, p. E27, 2002.

CUBA, C. A. C. Diagnostico parasitologico de la leishmaniasis tegumentaria americana. **Revista Medicina Experimental**, v. 17, p. 1-4, 2000.

DIAS, E. S.; FALCÃO, A.L.; SILVA, J. E. Notes on the sand fly fauna (Diptera:Psychodidae) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 329-332, may/jun., 1997.

DUNAISKI, M. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Região do Vale do Ribeira – Paraná: cães reservatórios ou hospedeiros acidentais?** 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FAGUNDES, A. et al. Immediate and generalized reaction to Montenegro Skin Test. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, may/jun, p. 413-414, 2003.

FAGUNDES, A. et. al. First encounter of subclinical human *Leishmania (Viannia)* infection in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 8, p. 1003-1005, dec., 2007.

FALQUETO, A. et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p.155-163, abr./jun. 1986.

FISSORI, C. et al. Convenience of serum for Visceral Leishmaniasis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5332-5333, nov. 2004.

FOLLADOR, I. et al. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, p. 497-503, 1999.

**1º FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – ANAIS**, Jaboticabal, mar. 2006, 71 p.

GARCIA, F. C. et. al. Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo-mucosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 339-344, 2005.

GENARO, O. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu. 2002. p.36-53.

GONÇALVES, B.R.D. Identificação da fauna de Flebotomíneos em função de casos autóctones de LTA. **Boletim Epidemiológico da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre**. v. 5, n. 21, p. 5, nov. 2003.

GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan-fev, 2003. [<Artigo Complet - SciELO>](#)

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

JESUS J R de. **Avaliação Sorológica para anticorpos de *Leishmania* spp. através da reação de Imunofluorescência Indireta na população canina da região da Lomba do Pinheiro, cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, a partir de casos autóctones humanos de Leishmaniose Tegumentar**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brasil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64. p. 654-667, 1970.

LAISON, R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 517, 1987.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology. In: **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico e diferencial**. Brasília, DF, 2006.136 p.

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

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**, 1º ed. Iowa State University Press, 1980, p. 414.

LOUREIRO, C. C. P. et. al. Leishmaniose: Métodos Diagnósticos. **Folha Médica**, v. 117, n. 2, p.131-134, 1998. Disponível: <sumaris.cbuc > Acesso em: 31/08/2007.

MADEIRA, M. F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 551-555, 2003.

MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; VILELA, J. H. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) (Díptera, Psychodidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, Uberaba. Jan./feb. 1998.

MARCONDES, C. B. et al. Levantamento de leishmaniose visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.4, p. 499-501, jul/ago. 2003.

MARZOCHI, M. C.: MARZOCHI, K. B. Tegumentary and Visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, suppl. 2, july 1994.

MARZOCHI, M. V. C; BARBOSA-SANTOS, E.G.O. Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 391-392, 1988.

MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P. A. Leishmaniose: Uma experiência de trinta e quatro anos com uma vacina anti-leishmaniose tegumentar americana. Minas Gerais. p. 3-6, 1999.

METTLER, M. et. al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic – Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, nov. 2005.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu. 2002. p. 31-35.

MODABBER, F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis of men and mice. In: **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico e diferencial**. Brasília, DF, 2006.136 p.

NEVES, D. P., MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9º ed. Rio de Janeiro; Atheneu; 1995.

NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, J. G. S. et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 94, p. 55-59, 2005. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 15 mar.2006.

PETERSON, A.T & SHAW J. 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: Ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **Journal Parasitology**. v. 33, p. 919-931, 2003.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 79-82, 2004.

PIRMEZ et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1819-1823, 1999.

RAZERA, F.; BLANCO, L. F. O.; BONAMIGO, R.R. Leishmaniose tegumentar americana: primeiros casos autóctones notificados no Rio Grande do Sul desde 2001 e revisão de literatura. **Revista da AMRIGS**, v. 49, n.3, p. 137-216, jul./set. 2005.

REIS, L. C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n. 2, p. 103-116, mai./ago. 2006.

ROBERTS, L. J.; HÁNDMAN, E.; FOOTE, S. J. Leishmaniasis clinical. **British Medical Review**, v. 321, p. 801-804, 2000.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of  $\beta$  globulin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, dec. 1985.

SANGIONI, L. A. et al. Busca ativa de casos de leishmaniose cutânea em humanos e cães em área periférica do município de Campo Mourão – PR, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n.5, Santa Maria, set./out. 2007.

SANTOS, E. et al. Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human american cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 1, São Paulo, jan./feb. 1999.

SANTOS, E. et al. Situação da Leishmaniose Tegumentar Americana no Rio Grande do Sul. **Boletim Epidemiológico - centro estadual de vigilância em saúde/RS**, v. 7, n. 2, jun. p. 1-3, 2005a.

SANTOS, G. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período



entre 1992 e 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 161-166, mar./abr., 2005b.

SCHUBACH et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal of infectious diseases**, v. 178, p. 911-914, 1998.

SERRA, C. M. B. et. al. Leishmaniose tegumentar canina em Morada das Águas (Serra da Tiririca), Marica, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 6, p. 1877-1880, nov./dez., 2003.

SILVA, L. J.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. As Leishmanioses, uma visão para o clínico. **Prática Hospitalar**, n. 36, p. 1-12, nov./dez., 2004. Disponível em: <www.praticahospitalar.com.br> Acesso em: 9/12/2005.

SILVA, O. S.; GRUNEWALD, J. Contribution to the sand fly fauna (Diptera:Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 579-582, sep./oct., 1999.

SILVA, O. S.; BLAZIUS, R. D.; ROMÃO, P. R. T. Flebotomíneos (Díptera:Psychodidae) coletados em galinheiro no Rio Grande do sul, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 11. n. 2, p. 283-289, 2004. Disponível em:<www.ugf/editora/entomologia/revistas> Acesso em 22/05/2007.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.

TARANTO, N. J. et al. Mucocutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs in Salta, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 32, n. 3, p. 129-135, jul./sep., 2000.

TÁVORA, M. P. F. et al. Estudo de validação comparativo entre as técnicas de ELISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos de Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, Uberaba, july/aug. 2007.

THIESEN, S. V.; BRITO, M. R. Leishmaniose Tegumentar Americana em Porto Alegre. **Boletim Epidemiológico da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre**. v. 5, n. 21, p. 4-5. nov., 2003.

TDR: Strategic Direction: Leishmaniasis, february, 2002. Disponível em: <[www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr)> Acesso em 12 de março de 2005.

VELASQUEZ, L. G. et al.American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n.3, p. 571-578, mar. 2006.

ZANZARINI, P.D. et al. Leishmaniose tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.6, p.957-1961, 2005.

World Health Organization (WHO). Disponível em:  
<<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 10 mar. 2005.

## ANEXO 1

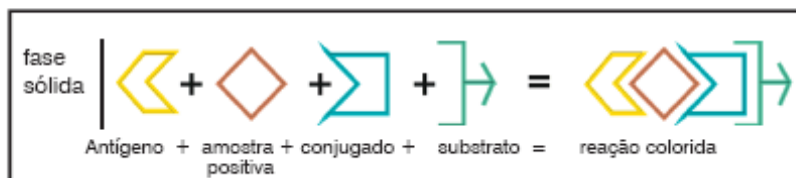
### **METODOLOGIA DE REALIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO-MANGUINHOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS PARA *Leishmania spp.***

O kit contém 2 frascos de diluente de amostra/conjugado concentrado em 5x; 1 saco de 10 g de lecitina de leite; 2 frascos de tampão de lavagem concentrado em 20x; 1 frasco de diluente do substrato; 1 frasco de cromógeno (TMB); 1 frasco de substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 1 frasco de ácido sulfúrico 2M; 1 frasco de controle positivo; 1 frasco de controle negativo; 1 frasco de conjugado; molduras com 6 strips; 4 molduras duplas sensibilizadas com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania*; 8 folhas adesivas.

#### Princípio do teste:

Este ensaio consiste na reação de soros de cães frente a antígenos solúveis purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura 'in vitro', que são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, que possuindo anticorpos específicos, vão se fixar aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes.

Para evidenciação da reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB) que pela ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que ao se adicionar o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela, em caso de positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

**ESQUEMA DO TESTE:****Reação Positiva****Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Leishmaniose Canina**  
MODELO DE PROTOCOLO

Lote: \_\_\_\_\_ Validade: \_\_\_\_\_  
EIE Nº: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**Disposição das amostras**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Densidade ótica das amostras**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

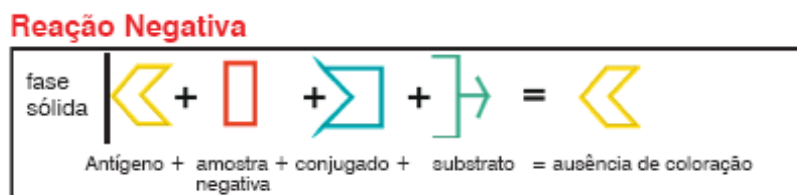
Cálculo do Cut-Off: (amostras colhidas em Papel Filtro)

$$Co = \bar{X}CN \times 3$$

co =
------

Técnico Responsável: \_\_\_\_\_

Observações:



MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO NO KIT:

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc.);
- Micropipetadores multicanal e monocanal ajustáveis e ponteiros;
- Luvas descartáveis;
- Barquetes;
- Estufa a 37°C;
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de microplacas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450nm;
- Balança semi-analítica;
- Caso utilize amostras em papel de filtro: picotador de 6 mm e agitador rotacional.

PROCEDIMENTO DO TESTE PARA AMOSTRAS DE SORO:

- 1- Preparo do diluente de amostras/conjugado;
- 2- Diluir em tubos 5µl dos controles e das amostras de soros de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µl do diluente de amostra/conjugado (1:100);
- 3- Distribuir 100 µl dos controles já diluídos da seguinte forma: na coluna 1 fileira “A” e “B” o controle positivo, na “C” e na “D” o controle negativo, na “E” e na “F” somente o diluente de amostra/conjugado (sem soro) que servirá de controle

do conjugado. Nos outros orifícios, distribuir 100 µl das amostras testes, já diluídas nos respectivos orifícios correspondentes;

4- Selar os “strips” com a folha adesiva e incubar a 37°C por 30 minutos;

5- Preparo do tampão de lavagem.

#### VALIDAÇÃO DO TESTE:

Considerar o teste válido quando os valores (densidade ótica) estiverem na faixa descrita abaixo:

Controle Positivo  $\geq 0,500$  densidade ótica

Controle Negativo  $\geq 0,050 \leq 0,120$  densidade ótica

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

6- Descolar cuidadosamente a folha adesiva, aspirar o conteúdo e lavar 6 vezes com tampão de lavagem (200 µl/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem;

7- Diluir o conjugado no diluente de amostra/conjugado, preparado anteriormente;

8- Homogeneizar bem e distribuir 100 µl da diluição do conjugado em cada orifício dos “strips”;

9- Selar e incubar os “strips” conforme descrito no item 4 e aspirar e lavar conforme descrito no item 6;

10- Preparar o substrato alguns minutos antes do uso, preferencialmente em frasco escuro;

11- Preparo do substrato:

nº strips duplas	nº reações	R-01 diluído	R-10
1	até 16	5 mL	5 µL
2	até 32	5 mL	5 µL
3	até 48	10 mL	10 µL
4	até 64	10 mL	10 µL
5	até 80	15 mL	15 µL
6	até 96	15 mL	15 µL

12- Distribuir 100 µl do substrato rapidamente em todos os orifícios;

13- Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos;

14- Bloquear a reação adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder à leitura.

LEITURA:

Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630nm). Após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar (sem a microplaca) e em seguida, iniciar a leitura da microplaca de teste.

OBS: caso a leitura seja feita com filtro de 450nm tendo como referência outro de 620-630 nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do cut-off e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.

- Cálculo do cut-off:  $CO = X \text{ CN} \times 2$

CO=cut-off

X CN= Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

15- Distribuir 100 µl do substrato rapidamente em todos os orifícios;

16- Incubar a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos;

17- Bloquear a reação adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder à leitura.

LEITURA:

Ligar o Espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450nm, e após alguns minutos para estabilização do feixe de luz, zerar o aparelho no ar e iniciar a leitura.

Cálculo do cut-off:  $CO = X \text{ CN} \times 3$

CO=cut-off

X CN= Média da densidade ótica dos orifícios do Controle Negativo

OBS: o operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS) não poderá ser superior a 1,5 x DO obtida para o soro controle negativo.

#### RESULTADOS:

Amostras reagentes: as que apresentarem densidade ótica igual ou superior ao cut-off.

Amostras não-reagentes: as que apresentarem densidade ótica inferior ao cut-off.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na “faixa cinza”, considerada neste teste, entre o valor obtido para o cut-off e o valor obtido com a multiplicação deste por 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na “faixa cinza”, após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como indeterminado.

#### VALIDAÇÃO DO TESTE:

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

- Controle positivo:  $\geq 0,500$  de DO
- Controle negativo:  $\geq 0,050 \leq 0,120$  de DO



## ANEXO 2

### **METODOLOGIA DE REALIZAÇÃO DA PCR:**

O DNA foi extraído com DNAzol®, de acordo com as instruções do fabricante e ressuspensão em 25 microlitros de tampão TE (ver a fórmula). O DNA extraído foi submetido à PCR hot start com primers específicos para o gênero *Leishmania* de acordo com Schubach et al (1998) e Pirmez et al (1999). A mistura da reação contém 100ng dos primers (5'- (G/C)(G/C) (C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC e 5'- GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA), 200 mM de cada dNTP (Pharmacia), 2.5 unidades de Taq polimerase (Ampliaq Gold, Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.), oligonucleotídeos, água, tampão 10x e MgCl<sub>2</sub>. Na solução tampão.. O produto amplificado foi aplicado em gel de agarose 2% para visualização da banda de 120 pb (produzida pela amplificação). Todas as amostras negativas foram submetidas a teste para presença de inibidores da PCR utilizando-se DNA de cultura axênica de *L (V) braziliensis* como controle interno. Controles negativos, sem DNA foram utilizados em todos os experimentos.

### **EXTRAÇÃO DE DNA COM DNAZOL (SORO)**

- 1) Tirar uma alíquota de 100µl de soro total e colocar em um eppendorf devidamente identificado.
- 2) Adicionar 1ml de DNAzol® em cada eppendorf com a alíquota de soro.
- 3) Centrifugar por 10 min. a 10.000 rpm.
- 4) Identificar outros eppendorfs.
- 5) Colocar 500µl de etanol 96% no eppendorf vazio.
- 6) Retirar o sobrenadante e adicionar no eppendorf com etanol 96%.
- 7) Desprezar o pellet.
- 8) Misturar por inversão de tubos por 3 min.
- 9) Centrifugar por 10 min. a 10.000 r/min.

- 10) Desprezar o sobrenadante.
- 11) Lavar 2 vezes o pellet com etanol 70% (500µl etanol 100% + 10ml H<sub>2</sub>O miliq), invertendo os tubos de 3 a 6 vezes entre as lavagens. SPIN 1 min/13.000 rpm.
- 12) Deixar secar naturalmente por 15 min. e acrescentar 25µl Solução de Hidratação de DNA.
- 13) Deixar overnight.
- 14) Armazenar em freezer.



Figura 3: Extração de DNA de soro canino com DNAZOL®

### MIX PARA PCR

O mix é uma mistura de vários reagentes como: primers, nucleotídeos, enzimas, solvente, sais, que fazem o PCR. É preparado no fluxo laminar.

Reagentes	3µl DNA 1 tubo	3µl DNA 6 tubos	4µl DNA 1 tubo	5µl DNA 1 tubo
Água	14,25 µl	X 6 = 85,5 µl	13,25 µl	12,25 µl
Óligos (1+3)	0,5 µl	X 6 = 3 µl	0,5 µl	0,5 µl
Óligos (2)	0,5 µl	X 6 = 3 µl	0,5 µl	0,5 µl
DNTPs	2,5 µl	X 6 = 15 µl	2,5 µl	2,5 µl
Tampão 10x	2,5 µl	X 6 = 15 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	X 6 = 9 µl	1,5 µl	1,5 µl
Taq polimerase	0,25 µl	X 6 = 1,5 µl	0,25 µl	0,25 µl
Total/tubo	22 µl	132 µl	21 µl	20 µl
Distribuir/cada tubo	-----	22 µl	21 µl	20 µl
Volume DNA/tubo	3 µl	3 µl	4 µl	5 µl
Volume final	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Preparo:

- 1) Ligar a UV do fluxo por 30 minutos.
- 2) Desligar a UV.
- 3) Numerar e datar os eppendorfs para PCR de 0,2µl de acordo com as extrações, colocando um tubo para controle positivo e um para negativo. (Se for fazer mix para guardar não é necessária a identificação nos eppendorfs).
- 4) Deixar os eppendorfs com a tampa aberta na UV por aproximadamente 30 min.
- 5) Deixar descongelar os reagentes, menos a Taq, que será retirada da geladeira somente na hora de utilizar.
- 6) Colocar todos os reagentes em um eppendorf de 1,5µl, sempre do maior volume para o menor.
- 7) Por último colocar a Taq.
- 8) Dividir o mix do eppendorf de 1,5µl em 22µl para cada eppendorf de PCR.

Ex: Se precisarmos de 20 mix, colocamos 21 eppendorfs de PCR.

- 9) Marcar o eppendorf que sobrou com um asterisco (\*) na tampa, sempre deixando um eppendorf a mais.
- 10) Tampar bem os tubos.

- 11) Ligar a UV.
- 12) Levar o mix para capela de extração e colocar 3µl de DNA, colocar no termociclador. (Corrida do PCR).

### **DNTP's**

Inicial 100 mM.  
Solução Estoque 2 mM

- Retirar 20µl da Solução original.

dATP – 20 µl  
dCTP – 20 µl  
dGTP – 20 µl  
dTTP – 20 µl  
H<sub>2</sub>O – 920µl

- Diluição 1:50
- 2,5 µl por tubo de reação (Mix)

### **OLIGOS 2**

- HM<sub>2</sub> – 200ng/tubo de reação (5'GGGGAGGGGCGTTCTGCCAA3')

- 1) Frasco original – 1051,70 µg
- 2) Ressuspender em 1ml – 1000µg / 1ml
- 3) Diluir 1:5 – 100µl + 400µl H<sub>2</sub>O
- 4) Aliquotar em 100µl / tubo
- 5) Usar 0,5µl / tubo de reação (Mix)

### **OLIGOS 1 + 3**

- HM1 – 100 ng/tubo de reação (5'CCGCCCCTATTTTACACCAACCCCC3')  
- HM3 – 100 ng/tubo de reação (5'GGCCCACTATATTACACCAACCCCC3')

- 1) Frasco original – 1211,49 µg  
1306,13 µg
- 2) Ressuspender em 1ml – 1000µg / 1ml
- 3) Diluir 1:10 – 100µl óligos 1 + 800µl H<sub>2</sub>O

100µl óligos 3

- 4) Aliquotar em 100µl / tubo
- 5) Usar 0,5µl / tubo de reação (Mix)
- 6)

### **TERMOCICLADOR.**

Modo de usar:

### **PTC – 100.**

- 1) Ligar o “power” atrás do aparelho.
- 2) Colocar os tubos, checando sempre se estão bem fechados no bloco, procurando sempre deixá-los centralizados.
- 3) Colocar um eppendorf para PCR vazio em cada ponta para equilibrar.
- 4) Fechar a tampa rodando a parte azul superior.
- 5) Selecionar “rum” e apertar “proceed”.
- 6) Selecionar “Aline” e apertar “proceed”.
- 7) Selecionar “yes” e apertar “proceed”.
- 8) Marcar o tempo (aprox. 2horas).
- 9) Ao terminar, apertar “canceled”.
- 10) Abrir a tampa girando a parte azul.
- 11) Retirar os tubos e aplicar com o marcador no gel (ver no protocolo do gel).
- 12) Desligar o termociclador.

### **PTC – 200.**

- 1) Ligar o “power” atrás do aparelho.
- 2) Colocar os tubos, checando sempre se estão bem fechados no bloco, procurando sempre deixa-los centralizados.
- 3) Colocar um eppendorf para PCR vazio em cada ponta para equilibrar.

- 4) Fechar a tampa rodando a parte azul.
- 5) Selecionar “rum” e apertar “proceed”.
- 6) Selecionar “tubes” e apertar “proceed”
- 7) Indicar o volume, no caso “25”  $\mu$ l e apertar “proceed”.
- 8) Selecionar “Aline” e apertar “proceed”.
- 9) Selecionar “yes” e apertar “proceed”.
- 10) Marcar o tempo (aprox. 2horas).
- 11) Ao terminar, apertar “canceled”.
- 12) Abrir a tampa girando a parte azul.
- 13) Retirar os tubos e aplicar com o marcador no gel (ver no protocolo do gel).
- 14) Desligar o termociclador.

### **CICLOS**

1° Ciclo – 94° por 15 min. (ativação da Taq)

31x	{	<p>2° Ciclo – 94°C por 30 seg. (desnaturação da fita)</p> <p>3° Ciclo – 50°C por 30 seg. (encontro do primer com a fita – anelamento)</p> <p>4° Ciclo – 72°C por 30 seg. (extensão do DNA)</p>
-----	---	--

5° Ciclo – 72°C por 10 min. (finalização e acabamento)

6° Ciclo – 04°C por 1 hora. (Este ciclo é colocado apenas para armazenar no caso de necessidade de um período acima de 2horas, pode ser interrompido a qualquer momento).

### **GEL DE AGAROSE**

- 100 ml Gel a 2%:

2g agarose  
100ml de TBE

- 1) Tarar a balança.

- 2) Pesar a agarose.
- 3) Colocar o TBE no frasco que está com agarose.
- 4) Pesar e anotar o resultado no frasco.
- 5) Colocar o frasco com uma tampa preparada com gaze no microondas por aproximadamente. 1:30min. Tomar cuidado para que o líquido não derrame na hora da fervura. Esta etapa é feita para misturar a agarose com o TBE.
- 6) Pesar novamente e completar com H<sub>2</sub>O destilada, até o peso anotado no frasco.
- 7) Esperar esfriar até uma temperatura suportável ao contato.
- 8) Colocar o gel na cuba até a marcação.

OBS.: Para fazer uma quantidade menor ou um percentual diferente de gel é só fazer regra de três.

### **BROMETO DE ETÍDIO**

- 0,5µg/ml

25µl Brometo de Etídio  
500ml H<sub>2</sub>O dest.

### **QUANTIFICAÇÃO DE DNA NO GEL DE AGAROSE 1%**

- Gel
- 1) Tarar a balança.
  - 2) Pesar 1g de agarose para 100ml de TBE (Se for usar 50ml de TBE pesar 0,5g de agarose).
  - 3) Tirar a tara da balança.
  - 4) Colocar a agarose no erlenhmeir.
  - 5) Colocar o TBE no erlenhmeir que está com agarose.
  - 6) Pesar o erlenhmeir e anotar o peso.
  - 7) Colocar o frasco no microondas por 1:30min.

- 8) Pesar novamente e completar com MilliQ até o peso anotado no frasco.
- 9) Esperar esfriar até uma temperatura suportável ao contato.
- 10) Colocar 5 $\mu$ l de Brometo de Etídeo para 100ml de gel.
- 11) Colocar o gel na cuba.
  - Aplicação da amostra
    - 1) Colocar 1 $\mu$ l da amostra total em eppendorf de 0,5ml.
    - 2) Acrescentar 3 $\mu$ l de corante (azul de bromofenol).
    - 3) Acrescentar 6 $\mu$ l de TBE.
    - 4) Centrifugar por aprox. 1 min. à 13000rpm.
    - 5) Aplicar as amostras no gel.
    - 6) Para o marcador, usar:
      - 2 $\mu$ l marcador
      - 3 $\mu$ l corante
      - 5 $\mu$ l TBE
    - 7) Aplicar no gel.



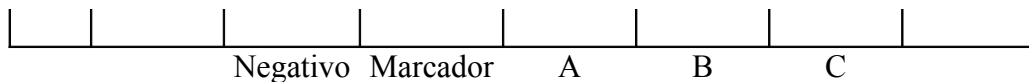
Figura 5: Gel de agarose



### **ELETROFORESE (CORRIDA DO GEL) PARA PCR**

- 1) Verificar a amperagem (aprox. 40) e a voltagem (aprox. 77) do aparelho de eletroforese.
- 2) Verificar a quantidade de TBE dentro do suporte da cuba. Deve estar até a marca indicada.
- 3) Vedar os lados da cuba com a borracha preta.
- 4) Colocar o pente no segundo espaço.
- 5) Despejar o gel de agarose e deixar polimerizar.
- 6) Retirar o pente e a borracha preta.
- 7) Colocar a cuba dentro do suporte com de TBE.
- 8) Fazer um mapa com toda descrição de onde serão aplicadas as amostras.

Ex.:



- 9) Misturar 3 $\mu$ l de corante com 10 $\mu$ l de DNA (Amostras de DNA e controle negativo). Aplicar (pipeta de 11 $\mu$ l) no gel de acordo com o mapa desenhado.
- 10) Misturar 2 $\mu$ l de corante com 2 $\mu$ l do marcador e 8 $\mu$ l de TBE da cuba e aplicar no gel de acordo com o mapa.
- 11) Esperar correr até aprox. 4 cm. Esta etapa dura aprox. 1 hora.

Figura 6: Preparação da eletroforese para PCR

### **REVELAÇÃO DO GEL**

- 1) Após a corrida deixar o gel submerso a uma solução de Brometo de etídeo por 20 min.
- 2) Colocar na luz ultravioleta e observar o resultado, logo após desligar a UV.
- 3) Colocar a câmera fotográfica por cima e liga-la.
- 4) Abrir o programa Kodak 1D no microcomputador.

5) Tirar a foto.



Figura 7: Revelação do gel de agarose

### **TBE 10X**

- Usar esse:
  - 1) Pesar:
 

Tris (121,14g/mol)	= 121,14g/litro
Ácido bórico (61,83g/mol)	= 61,83g/litro
EDTA (372,24g/mol)	= 7,44g/litro
  - 2) Colocar 800ml de Milliq.
  - 3) Acrescentar os reagentes.
  - 4) Deixar agitar por um tempo.
  - 5) Completar 1litro com água Milliq.

Obs.: O pH ser 8,3.

Ou

- 1) Pesar:

10,8g Tris base,  
5,5g Ácido Bórico

- 2) Acrescentar em um béquer de 1000ml, 800ml água dest. milliq.
- 3) Colocar para agitar com magneto até ficar bem dissolvido.
- 4) Acrescentar 4ml EDTA 0,5 M, pH 8,0.
- 5) Completar 1000 ml de água dest. milliq.

### **TBE 1X (utilizado para PCR)**

- Diluição TBE 10X

100ml TBE 10X – 900ml H<sub>2</sub>O dest. milliq

Colocar no agitador

### **EDTA**

**(0.5M) (pH 8.0) (250ml)**

- 0,5 Molar

186,12g de **EDTA** / 1000ml de H<sub>2</sub>O destilada Ultra-pura

46,53g de **EDTA** / 250ml de H<sub>2</sub>O destilada Ultra-pura.

**OBS:** Para que o **EDTA** dissolva, é preciso acrescentar **NAOH** (ácido acético) (5/10g), até obter pH 8.0. Após estar dissolvido, acrescentar **H<sub>2</sub>O** ultra-pura, completando 250ml.

### **AZUL DE BROMOFENOL**

Xilenocianol  
Azul de Bromofenol  
Glicerol  
EDTA

- 1) Pesar:
 

Xilenocianol	= 0,05g
Azul de Bromofenol	= 0,05g
EDTA	= 3,7224g
Glicerol	= 50ml

- 2) Acrescentar 100ml de água Milliq.
- 3) Colocar no agitador até dissolver tudo.
- 4) Verificar o pH.
- 5) Ajustar o pH até chegar a 7,0 com NaOH.
- 6) Acrescentar água Milliq até completar 1 litro.

### **PCR - TESTE DE INIBIÇÃO**

- 1) Preparar mix para 5 $\mu$ l de DNA.
- 2) Acrescentar ao tubo do mix 3 $\mu$ l de DNA (diluído em 1:10) e 2 $\mu$ l de Controle positivo de Lb 1:10.

Acrescentar ao tubo do mix de controle positivo 2 $\mu$ l de Lb 1:10.

- 3) Colocar no termociclador no programa “Aline”.
- 4) Após a ciclagem aplicar em gel de agarose 2%.

Obs.:

1. No gel devem conter Marcador de pares de bases, controle positivo e controle negativo.
2. Se aparecer banda no gel é sinal que não houve inibição, então o resultado é realmente negativo para Leishmaniose.

