



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ANA CAMILA OLIVEIRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO E DETECÇÃO DO DNA DE
Leishmania spp. EM CÃES DE ÁREAS ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

**BELÉM
2012**

ANA CAMILA OLIVEIRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO E DETECÇÃO DO DNA DE
Leishmania spp. EM CÃES DE ÁREAS ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Karla Santos Ramos

**BELÉM
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Alves, Ana Camila Oliveira.

Investigação do perfil sorológico e detecção do DNA de *Leishmania spp.* em cães de áreas endêmicas para leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil / Ana Camila Oliveira Alves; orientadora, Edna Aoba Yassui Ishikawa; Co-Orientadora, Patrícia Karla Santos Ramos. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Leishmaniose – Sorodiagnóstico - Pará. 2. Cão – Infecções. I. Ishikawa, Edna Aoba Yassui, orient. II. Ramos, Patrícia Karla Santos, co-orient. III. Título.

CDD: 22. ed. 616.9364

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

ANA CAMILA OLIVEIRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO E DETECÇÃO DO DNA DE
Leishmania spp. EM CÃES DE ÁREAS ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovado em:
Conceito:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa
Orientadora - NMT/UFPA

Prof^a. Dr^a. Patrícia Karla Santos Ramos
Co-orientadora - IEC

Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira
Membro - IEC/UFPA/NMT

Prof^a. Dr^a. Alessandra Scofiel Amaral
Membro - UFPA Campus Castanhal

Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante
Membro - UFPA Campus Castanhal

Prof^a. Dr^a. Maísa Silva de Souza
Suplente – NMT/UFPA

***Aos meus pais,
Alves e Tânia pela confiança,
dedicação, carinho e incentivo durante
toda minha vida.***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Edna Ishikawa, a quem admiro pela sua sabedoria, competência, dedicação e profissionalismo, e agradeço pela compreensão e confiança em meu trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Patrícia Karla Santos Ramos, uma figura de estímulo, dedicação, amizade, compreensão e profissionalismo. Sua importância para o andamento dessa pesquisa foi essencial, sempre me incentivando desde o início.

Ao Núcleo de Medicina Tropical/UFGA por viabilizar a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira, pelo fornecimento de cepas para a produção dos antígenos da sorologia e por viabilizar a realização dos testes sorológicos no laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC).

À equipe do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC): Zuíla Corrêa, Rosely, Martins, Domingas, Palheta, Nonato, Brandão, Machado, Lucivaldo, Negrão, DeLeon, Suely Pinheiro, Fábio Silva, Aprígio Lima, Iorlando Barata, Edna Leão, Luciene Aranha e Roberto Brandão. Mais do que grande profissionais, grandes amigos.

À Prof^a. Dr^a. Máisa Silva de Souza e ao Dr. Carlos Araújo da Costa, pela essencial atenção e apoio na elaboração estatística desse estudo.

À Prof^a. Dr^a. Hellen Fuzzi, por disponibilizar o termociclador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado a mim conferida.

À Msc. Luciana Vieira do Rêgo Lima, pela atenção dispensada na fase final do presente trabalho.

Aos professores que durante o curso de mestrado, proporcionaram meios para que fosse possível o máximo aproveitamento da pós-graduação.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular: Samantha, Ray, Sheyla, Louise, Danilo, Ildison, Victor, Karen, Thaís, Joaquim e Jaqueline, meus sinceros agradecimentos pelo companheirismo, colaborações, paciência e pelos momentos de descontração que marcaram este período.

À equipe da biblioteca, pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Socorro Cardoso, da Secretaria Acadêmica PPGDT-NMT, pela atenção que me foi dispensada durante a realização do curso de mestrado.

A Deus, pelo imensurável dom da vida e pelas valiosas oportunidades concedidas.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos de minha vida. Distante de casa sinto muitas saudades e dedico todo esse trabalho a vocês.

Ao meu esposo, Thiago Pinheiro Teixeira, por todo amor, estímulo e dedicação durante realização deste trabalho.

A todos, cujos nomes não foram citados, mas que direta e indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável:

além do pão, o trabalho,

além do trabalho, a ação;

e, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Apesar dos registros de cães infectados por *Leishmania* spp., o papel destes animais no ciclo de transmissão dos agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA) não foi elucidado. Este estudo teve como objetivo investigar a frequência da infecção canina em localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, onde até o momento não há casos registrados de leishmaniose visceral (LV) humana ou canina. Entre Maio e Dezembro de 2011, foram investigados 224 cães em localidades rurais de três municípios. Dos cães que apresentavam lesão foi coletado material para a pesquisa direta do parasito. Para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), foram utilizados como antígeno formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, sendo considerados reagentes soros com título igual ou superior a 40. A extração de DNA do material sanguíneo foi realizada através da técnica do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, sendo este utilizado posteriormente para a detecção molecular através da PCR, onde foram utilizados os primers S1629 e S1630, que amplificam genes do mini-exon. Dos 224 cães estudados, 18 (8,04%) apresentaram lesões sugestivas de LTA, dos quais apenas cinco foram positivos para a pesquisa direta do parasito. Na pesquisa sorológica, 118 (52,68%) soros caninos foram reagentes em pelo menos um dos antígenos testados, sendo que a maior porcentagem de concordância global (91,96%) foi encontrada na associação entre os resultados dos antígenos de *L. (V.) braziliensis* e de *L. (V.) shawi*. Na pesquisa molecular, dentre os 74 (33,04%) cães com PCR positiva foi detectado DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 68 (91,89%) animais e em quatro (5,40%) DNA de *L. (L.) amazonensis*, enquanto que dois (2,70%) cães apresentaram infecção mista. Não foi detectado DNA compatível com *L. (L.) infantum chagasi*. A alta frequência de cães sororeagentes e a detecção de DNA de *Leishmania* indicam a presença de cães infectados e a maior circulação de *Leishmania* do subgênero *Viannia* do que *L. (L.) amazonensis* nessa região, porém mesmo com grande número de animais sem sinais clínicos ainda serão necessários maiores estudos para esclarecer sobre o papel do cão no ciclo de transmissão dos agentes da LTA.

Palavras-chave: *Leishmania* spp.; Sorodiagnóstico; Cão; LTA; RIFI; PCR.

ABSTRACT

Despite the records of dogs infected by *Leishmania* spp., the role of animals in the transmission cycle of the agents of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) transmission has not been elucidated. This study aimed to investigate the frequency of the canine infection in rural localities from Ulianópolis, Dom Eliseu and Rondon do Pará county, where so far no reported cases of human or canine visceral leishmaniasis (VL). From May to December 2011, were investigated 224 dogs in rural areas of three counties. From dogs with lesions were collected material for the direct detection of parasites. For indirect immunofluorescence assay (IFA) were used as antigen promastogotes *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, reagents be considered sera with titers equal to or greater than 40. The DNA extraction from blood sample was performed using phenol:chloroform:isoamyl alcohol, which was subsequently used for molecular detection by the Polymerase Chain Reaction technique (PCR). Primers S1629 and S1630 were used to amplify the mini-exon genes. Of the 224 dogs studied, 18 (8,04%) had lesions suggestive of ATL, of which only five was positive for the direct detection of parasites. In the serologic survey, 118 (52,68%) canine serum were reagent at least on of the antigens tested, with the highest percentage of global agreement (91,96%) was found in the association between the results of the antigens of *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) shawi*. In molecular research, among the 74 (33,04%) dogs with positive PCR detected DNA from *Leishmania* subgenus *Viannia* in 68 (91,89%), and four (5,40%) animals DNA *L. (L.) amazonensis*, whereas two (2,70%) dogs had mixed infection. No DNA was found compatible with *L. (L.) infantum chagasi*. The high frequency of dogs with reactive serum and the detection of DNA from *Leishmania* indicating the presence of infected dogs and greater circulation of the subgenus *Leishmania Viannia* than *L. (L.) amazonensis* in this region, however even with a large number of animals without clinical signs larger studies are still needed to clarify the role of dogs in the transmission cycle of agents of the ATL. .

Keywords: *Leishmania* spp.; Serodiagnosis; Dog; ATL; IFA; PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fêmea de flebotomíneo adulto, ingurgitada.....	19
Figura 2 -	<i>Leishmania</i> – Formas amastigotas no interior do macrófago.....	21
Figura 3 -	<i>Leishmania</i> – Formas promastigotas.....	21
Figura 4 -	Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> spp.....	22
Figura 5 -	Reação de Imunofluorescência Indireta.....	34
Figura 6 -	Leishmaniose Tegumentar Americana em cão.....	36
Figura 7 -	Lesões tegumentares em felino infectado por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	37
Figura 8 -	Municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará localizados na mesorregião do sudeste paraense: Áreas de investigação da infecção canina por <i>Leishmania</i> spp.....	38
Figura 9 -	Localidades rurais envolvidas no estudo.....	39
Figura 10 -	Coleta das amostras sanguíneas.....	40
Figura 11 -	Resultado de PCR com iniciadores S1629 e S1630.....	51
Figura 12 -	Lâmina de um cão, procedente do Assentamento Nova Vida (Ulianópolis), com pesquisa direta do parasito positiva.....	54
Gráfico 1 -	Número de casos e coeficiente de detecção de casos autóctones de LTA. Brasil 1989 a 2008.....	28
Gráfico 2 -	Número de casos e coeficiente de detecção (por 100 mil habitantes) de leishmaniose tegumentar americana. Pará 2004 a 2008.....	30
Gráfico 3 -	Diferença das médias de idade entre os cães, reagentes e não reagentes, na RIFI, de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.....	50
Gráfico 4 -	Diferença das médias de idade entre os cães, positivos e negativos na PCR, de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.....	52

Quadro 1 - Resultados parasitológicos, sorológicos e moleculares de dezoito cães com lesões sugestivas de LTA, com respectiva localização e aspecto, provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará.....	55
Quadro 2 - Resultado da análise de 102 soros de cães de localidades rurais do município de Ulianópolis.....	77
Quadro 3 - Resultado da análise de 70 soros de cães de localidades rurais do município de Dom Eliseu.....	82
Quadro 4 - Resultado da análise de 52 soros de cães de localidades rurais do município de Rondon do Pará.....	86
Quadro 5 - Resultados parasitológicos, sorológicos e moleculares de dezoito cães com lesões sugestivas de LTA, com respectiva localização e aspecto.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela de contigência 2x2.....	45
Tabela 2 -	Escala de concordância do indicador <i>Kappa</i>	45
Tabela 3 -	Distribuição dos cães por gênero e faixa etária entre os 129 núcleos familiares visitados em localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.....	47
Tabela 4 -	Resultado da análise dos 224 soros de cães provenientes de localidades rurais dos Municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, pela RIFI utilizando quatro antígenos, entre maio e dezembro de 2011.....	48
Tabela 5 -	Concordância entre os resultados dos antígenos utilizados na RIFI.....	49
Tabela 6 -	Frequência e percentual da associação entre o gênero e a positividade na sorologia (RIFI) em 224 cães provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.....	49
Tabela 7 -	Frequência e percentual da associação entre o gênero e a positividade na PCR em 224 cães provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.....	52
Tabela 8 -	Frequência da associação entre RIFI e PCR em 224 cães de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
°C	Graus Celsius ou graus centígrados
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
CEPAN	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CRMV	Conselho Regional de Medicina Veterinária
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotidiotrifosfato
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> / Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Fig.	Figura
Fg	Fentograma
IEC	Instituto Evandro Chagas
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
Km	Quilômetro
LCAD	Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa
LCDB	Leishmaniose Cutânea Disseminada Boderline
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
M	Molar
mA	Miliampere
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
Ng	Nanograma
NK	Natural Killer
NR	Não Reagente
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> / Solução Salina Tampão
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase
PDP	Pesquisa Direta do Parasito
<i>Pe</i>	Proporção esperada
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmoles	Picomoles
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

RPMI	Meio de cultura para crescimento em massa de <i>Leishmania</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido Ribonucléico
RPM	rotações por minuto
SESPA	Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Pará
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
TE	Tris-EDTA
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UV	Ultravioleta
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	17
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	OBJETIVO GERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
4.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
4.2	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	24
4.3	PATOGENIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	30
4.4	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	32
4.5	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CANINA.....	34
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1	TIPO DE ESTUDO.....	38
5.2	ÁREA DE ESTUDO.....	38
5.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	40
5.4	COLETA DAS AMOSTRAS CANINAS.....	40
5.5	INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA.....	41
5.6	EXTRAÇÃO DE DNA DO MATERIAL SANGUÍNEO.....	42
5.7	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	43
5.8	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	44
5.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
5.10	ASPÉCTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	45
6	RESULTADOS.....	47

6.1	POPULAÇÃO CANINA E PERFIL DA AMOSTRA.....	47
6.2	ANÁLISE SOROLÓGICA.....	48
6.3	APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Leishmania</i> spp. EM AMOSTRAS DE SANGUE DE CÃES.....	50
6.4	CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DA RIFI E PCR.....	53
6.5	PESQUISA DIRETA DO PARASITO.....	53
7	DISCUSSÃO.....	56
8	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A	77
	APÊNDICE B	82
	APÊNDICE C	86
	APÊNDICE D	89
	ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

A ocorrência da LTA em ambientes domésticos tem sido citada por diversos autores, sendo aventada a possibilidade de que animais domésticos e peridomésticos, em especial o cão, estariam atuando como importantes fontes de infecção nesses locais (MARZOCHI E MARZOCHI, 1994).

No Brasil, a participação de animais domésticos no ciclo epidemiológico da LTA é conhecida desde o início do século XX, quando Pedroso (1913) e Brumpt & Pedroso (1913) observaram pela primeira vez a infecção natural em cães, no estado de São Paulo, mas somente a partir da década de 80 intensificaram-se estudos para melhores esclarecimentos (BARBOSA et al., 1999). Barreto et al. (1984) e Coutinho et al. (1985) ao realizar estudos em áreas endêmicas de LTA, na Bahia e no Rio de Janeiro, respectivamente, demonstraram ser relativamente comum a presença de cães infectados nessas áreas.

Até o momento não existem dados disponíveis de infecção canina por espécies de *Leishmania* que causam a LTA no estado do Pará, por esse motivo, o diagnóstico da infecção nesses animais é de grande valor no monitoramento desta enfermidade em regiões endêmicas. E a proposta do presente estudo é avaliar estas infecções utilizando técnicas sorológicas como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) que detecta os anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que é capaz de amplificar um gene específico do parasito.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, sabe-se que o cão doméstico possui um papel de grande importância dentro da cadeia de transmissão da Leishmaniose Visceral Americana (LVA), visto que é considerado um reservatório que está sempre em contato com o homem e que muitas vezes convive dentro da mesma casa, facilitando disseminação da doença.

Nas infecções por *Leishmania* spp. que causam a LTA, são numerosos os registros de infecção em animais domésticos. Entretanto, não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como reservatórios das espécies de *Leishmania*, sendo considerados apenas hospedeiros acidentais da doença.

A realização de inquéritos sorológicos caninos tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária.

O estudo proposto visa fornecer informações que resultem em subsídios para o planejamento e desenvolvimento de ações que possam reduzir o risco de transmissão da LTA na área estudada, visto que os municípios em estudo estão localizados em área endêmica de LTA, onde a colonização foi feita sem um plano estratégico adequado para a região, resultando em mudanças ambientais que comprometeram o ecossistema da região e a saúde da população.

Desse modo, existe uma necessidade urgente de avaliar se o cão apresenta papel importante como reservatório doméstico e quais as espécies de *Leishmania* podem estar atuando como agentes da doença no animal, para que se possam obter maiores conhecimentos da epidemiologia da doença, um prognóstico correto para a aplicação de medidas de controle por parte dos órgãos competentes.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar o perfil sorológico e detectar DNA de *Leishmania* spp. em cães de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará.

3.2 ESPECÍFICOS

i. Detectar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em cães nos municípios em estudo, pelo método da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e determinar o sexo e a faixa etária dos cães sororreagentes.

ii. Detectar a infecção canina pelas espécies de *Leishmania* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e determinar o sexo e a faixa etária dos cães positivos.

iii. Comparar os resultados obtidos nas técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são doenças infecciosas, de natureza parasitária, causadas por diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania* ROSS, 1903. Os agentes etiológicos pertencem ao Reino Protozoa, Classe Kinetoplastea, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae e Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON, 2010). Essas enfermidades acometem uma significativa parte da população mundial, incluindo adultos e crianças, além de várias espécies de animais silvestres e domésticos (WHO, 1990).

As espécies de *Leishmania* são intracelulares obrigatórios e parasitam as células do sistema fagocítico mononuclear (ALEXANDER et al.,1999), sendo transmitidas aos mamíferos por fêmeas de insetos vetores denominados flebotomíneos (Fig. 1), conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Esses insetos pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (RYAN et al., 1987) e apenas as fêmeas realizam a hematofagia e são os principais vetores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a). Este hábito está fisiologicamente relacionado em converter nutrientes sanguíneos em proteínas necessárias para a produção de ovos (RANGEL E LAINSON, 2003).

FIGURA 1 - Fêmea de flebotomíneo adulto, ingurgitada

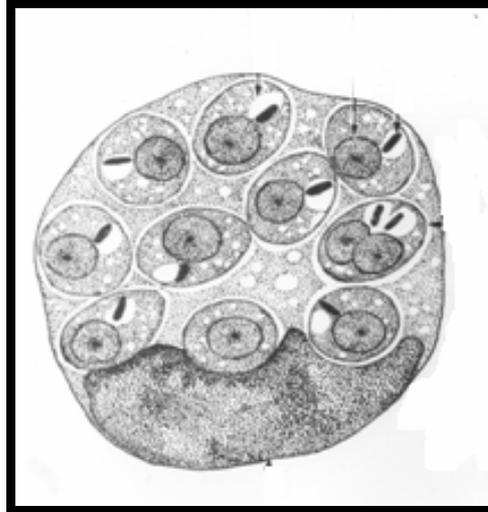


Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/MS, 2006a.

No Brasil, duas espécies foram descritas na transmissão do parasito responsável pela forma viscerotrópica, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a; MISSAWA et al., 2011; SANTOS et al., 1998). A espécie *Lutzomyia longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio, alimentando-se de sangue de hospedeiros vertebrados, entre esses as aves, o homem e animais silvestres ou domésticos (MONTEIRO et al., 2005).

As principais espécies envolvidas na transmissão dos parasitos responsáveis pelas formas dermatrópicas, no Brasil, são *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*, *Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei*, *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* e *Lutzomyia migonei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a). Dentre as principais, deve-se destacar a *Lutzomyia (Psychodopygus) wellcomei* uma espécie altamente antropofílica, sendo um importante vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Amazônia brasileira (RANGEL E LAINSON, 2003).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores (GONTIJO E CARVALHO, 2003). Caracterizam-se por apresentar apenas duas formas durante o seu ciclo vital: amastigota, que é tipicamente ovóide ou esférica, sem flagelo livre, encontrada no citoplasma dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Fig. 2), e promastigota, que apresenta um flagelo livre e é encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e também pode ser observada em meio de cultura (Fig. 3) (GENARO E REIS, 2005; LAINSON E SHAW, 1987; REY, 2002).

FIGURA 2 – *Leishmania* - Formas amastigotas no interior do macrófago

Fonte: Lainson e Shaw, 1992

FIGURA 3 – *Leishmania* - Formas promastigotas

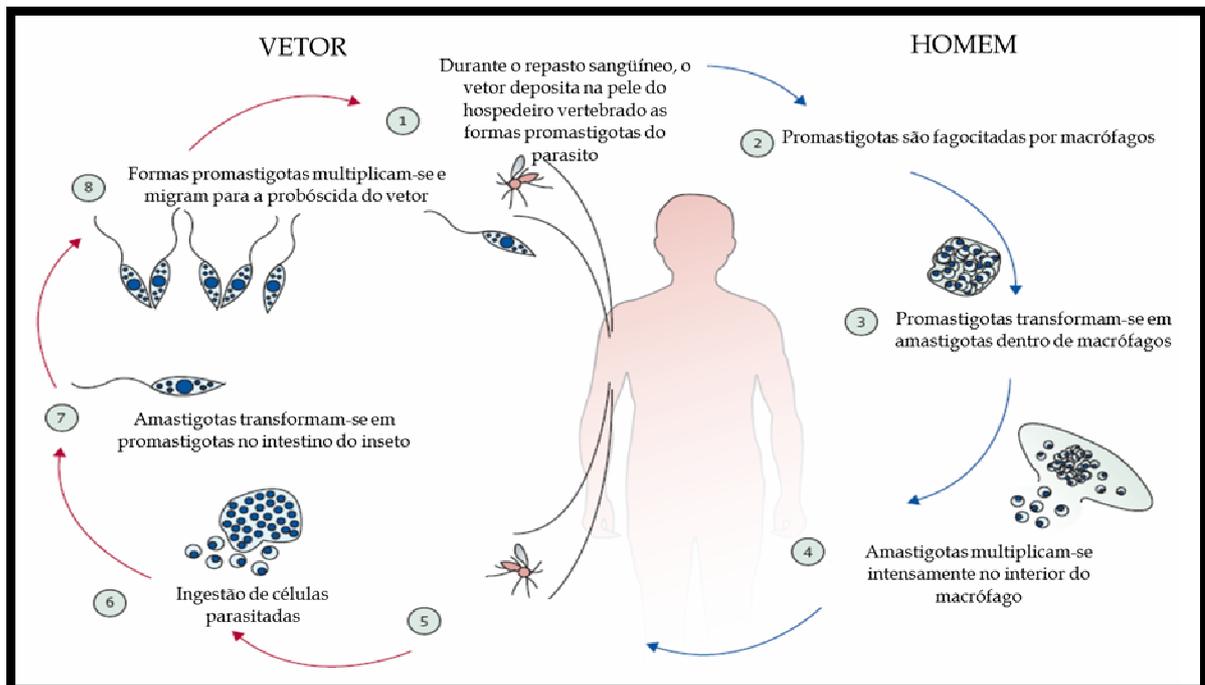
Fonte: Lainson e Shaw, 1992

Quando a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingere formas amastigotas contidas em macrófagos parasitados. Durante o trajeto pelo trato digestivo do inseto os macrófagos se rompem liberando as amastigotas, as quais sofrem uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, diferenciando-se no final do ciclo em promastigotas metacíclicas ou infectantes. Estas se movem para a porção anterior do tubo digestivo do vetor e desse modo, quando o inseto vetor realizar o repasto

sanguíneo, novamente, inocula na pele do hospedeiro vertebrado as promastigotas metacíclicas infectantes (MELO, 2004).

Após a inoculação, as formas promastigotas metacíclicas infectantes são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). Dentro do fagolisossoma dos macrófagos transformam-se em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Quando repleto de amastigotas o macrófago se rompe, liberando-as na circulação, onde irão infectar novos macrófagos localizados na pele, sangue e/ou alguns órgãos internos do hospedeiro, tornando-o uma fonte de infecção para outro flebotomíneo (ALEXANDER E RUSSEL, 1992; PIMENTA et al., 1992). O ciclo evolutivo está representado na Figura 4.

FIGURA 4 - Ciclo evolutivo de *Leishmania* spp..



Fonte: Adaptado de Reithinger et al. (2007).

A identificação e a classificação taxonômica do gênero *Leishmania* foram por muito tempo baseadas nos aspectos clínicos apresentados pela doença. Em 1972, Lainson e Shaw propuseram o agrupamento dos parasitos em complexos: *mexicana* e *braziliensis*. Após revisão, com base no desenvolvimento experimental das formas promastigotas no tubo digestivo dos flebotomíneos, Lainson e Shaw sugeriram utilização de dois subgêneros, *Leishmania* Ross, 1903, e *Viannia* Lainson e Shaw,

1987, substituindo os complexos *mexicana* e *braziliensis*, respectivamente (MICHALICK, 2005).

A real incidência da leishmaniose é incerta, devido aos inúmeros casos não notificados nas áreas onde a infecção é endêmica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata a ocorrência de leishmanioses em 88 países, com notificação compulsória em apenas 32 e estimativa de 12 milhões de pessoas acometidas em todo mundo. Aproximadamente 350 milhões de indivíduos estão sob o risco de adquirir a doença, estimando-se que ocorra dois milhões de casos anuais, dos quais 1,5 milhão das formas cutânea e cutaneomucosa e 500 mil da forma visceral, muitas vezes fatal.

Nas Américas, o Brasil é o país com mais registros de casos, tanto da forma cutânea como visceral (WHO, 2002), tendo apresentado a partir da década de 80 um aumento na incidência, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

As leishmanioses podem exibir diferentes manifestações clínicas que dependem não somente da espécie do parasito responsável pela infecção, como também da resposta imunológica do indivíduo infectado. Seu amplo espectro clínico vai desde formas assintomáticas até as formas desfigurantes de leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou a forma que acomete os órgãos do indivíduo infectado denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar, que quando não tratada adequadamente é potencialmente fatal na maioria dos casos (GRIMALDI E TESH, 1993).

A LVA é uma doença crônica, sistêmica, apresenta características geográficas, climáticas e sociais diferenciadas de acordo com sua distribuição, sendo encontrada em todas às cinco regiões geográficas brasileiras (ANDRADE et al., 2009; GONTIJO E MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a). Causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, tem o cão como principal reservatório em ambiente urbano, mantendo o ciclo de transmissão nesses locais (SANTOS, et al., 1998).

Diversos mamíferos podem se infectar por *Leishmania* sp.; entretanto, não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem. No Brasil, dos canídeos silvestres, somente a raposa (*Cerdocyon thous*) é considerada reservatório natural da leishmaniose visceral. Todavia, diversas espécies já foram relatadas com infecção, como lobo guará (*Chysocyon brachyurus*)⁶, raposa-do-campo (*Lycalopex*

vetulus) e cachorro-vinagre (*Spheotos venaticus*), além de outros mamíferos como o marsupial *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis* (SOUZA et al., 2010).

Na América Latina, a LVA já foi descrita em pelo menos 12 países, com 90% dos casos ocorridos no Brasil. Desde o primeiro registro da doença no país, em 1913, sua transmissão vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões. Na região Sul, recentemente foi detectado o primeiro caso de cão portador de LVA no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul (MONTEIRO et al., 2010). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LVA ocorreram na região Nordeste. Porém, à medida que a doença se expande para as outras regiões, esta situação se modifica, verificando-se que no período de 2000 a 2002, essa região representou 77% dos casos registrados no País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a).

O cão está frequentemente envolvido no ciclo urbano da LVA (ALMEIDA et al., 2009) e nas Américas, estima-se que milhões de cães tenham a infecção, principalmente no Brasil. Este hospedeiro representa uma fonte de infecção para o vetor, precedendo a maioria dos casos no homem e promovendo a dispersão da doença para áreas não endêmicas (ARIAS et al., 1996; DANTAS-TORRES E BRANDÃO-FILHO, 2006; MONTEIRO et al., 2005).

Os estudos de prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC), em cidades do Brasil, têm detectado índices de 9,7% em Montes Claros, Minas Gerais (FRANÇA-SILVA et al., 2003) e 40,3% em Paulista, Pernambuco (DANTAS-TORRES et al., 2006). Em Cuiabá, estudos de prevalência determinaram valores altos (64%), no período de 1997 a 1998 (MOURA et al., 1999), enquanto estudos mais recentes, no estado do Mato Grosso, demonstraram índice de 8,4% (MESTRE E FONTES, 2007). Inquéritos sorológicos caninos são de extrema importância para que as ações profiláticas sejam realizadas.

4.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença zoonótica, de caráter evolutivo e difícil controle, principalmente devido às suas complexas características epidemiológicas. É uma doença não contagiosa, endêmica em vastas áreas da América Latina podendo apresentar diferentes formas clínicas,

dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas na possibilidade de assumir formas clínicas crônicas que podem determinar lesões desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (ANDRADE et al., 2005).

Descrições da LTA podem ser encontradas no primeiro século d.C., na Ásia Central. As lesões encontradas nos doentes eram referidas de acordo com a região que ocorriam, como ferida de Balkh, nome de uma cidade no norte do Afeganistão, botão de Aleppo, na Síria, e botão-de-bagdá, no Iraque. Esta doença era conhecida pelos viajantes por botão-do-oriental (GENARO E REIS, 2005).

A primeira observação dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* foi feita por Cunningham, em 1885, em casos de leishmaniose visceral na Índia. Em seguida, vários pesquisadores passaram a encontrar e descrever o parasito até que, em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania* (BASANO E CAMARGO, 2004; GENARO E REIS, 2005).

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 cutânea-mucosa. Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, 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 “Antigüedad de la Syphilis en el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga, Amazonas, até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (BASANO E CAMARGO, 2004).

Alexandre Cerqueira (1885), na Bahia, foi o primeiro a identificar a leishmaniose, através do encontro de lesões de pele similares ao botão-do-oriental e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Em 1908, durante a construção da estrada de Ferro Noroeste Brasil, em São Paulo, ocorreram numerosos casos, principalmente na cidade de Bauru, ficando conhecida por úlcera-de-Bauru, os quais foram nominados por Gaspar Vianna, em 1911, como *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o agente específico da LTA no Brasil (GENARO E REIS, 2005; GONTIJO E CARVALHO, 2003).

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LTA eram atribuídos a *L. (V.) braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas (BASANO E CAMARGO, 2004).

A etiologia de LTA inclui uma multiplicidade de espécies dos subgêneros *Viannia* (LAINSON E SHAW, 1987) e *Leishmania* (ROSS, 1903). São conhecidas 31 espécies de *Leishmania* no mundo inteiro, das quais 22 são encontradas nas Américas. Destas, apenas 14 são agentes etiológicos de LTA (SILVEIRA et al., 2004). São conhecidas atualmente sete espécies de interesse médico na Amazônia brasileira, sendo seis pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania* (SOUZA et al., 2010).

As espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* são *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911, *Leishmania (Viannia) guyanensis* Floch, 1954, *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira, Shaw, Braga & Ishikawa, 1987, *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989, *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, Braga, Souza, Póvoa & Ishikawa, 1989 e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* Silveira, Ishikawa, De Souza & Lainson, 2002. A espécie do subgênero *Leishmania* é *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson e Shaw, 1972, e todas as espécies estão associadas à doença em humanos, sendo que *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as mais amplamente distribuídas (LAINSON E SHAW, 1987).

A espécie *L. (V.) braziliensis* apresenta distribuição em todo o território nacional, além de vários países da América Central e do Sul, sendo registrada de Belize até a Argentina. Na transmissão peridoméstica, apresentam-se como hospedeiros: cavalos, cães, jumentos e até gatos. No homem causa leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa (BASANO E CAMARGO, 2004).

Leishmania (V.) guyanensis, distribuiu-se ao norte do Rio Amazonas, Guianas, Suriname e Guiana Francesa. Há também alguns registros no Equador, Colômbia, Venezuela e algumas regiões do Peru. Frequentemente produzem infecções múltiplas na pele, comprometendo o sistema linfático, porém os casos de mucocutânea parecem ser bem raros (LAINSON, 2010).

Leishmania (V.) shawi, responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará, tem como reservatórios vários animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos e como vetor *Lutzomyia whitmani* (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

Leishmania (V.) naiffi distribui-se pelo Brasil, nos estados do Amazonas e Pará, e na Guiana Francesa. Tem como hospedeiro o tatu (*Dasyus novemcinctus*) e causa no homem principalmente a leishmaniose cutânea (BASANO E CAMARGO, 2004).

Leishmania (V.) lainsoni tem sido isolada no estado do Pará, no Peru e Bolívia. Causam lesões cutâneas simples sem registro de envolvimento das mucosas e sua baixa prevalência, possivelmente, está associada ao fato do seu vetor ser de baixa antropofilia (SILVEIRA et al., 1987)

Leishmania (V.) lindenbergi tem sido isolada no estado do Pará e causam lesões cutâneas simples em humanos. Essa espécie não foi associada aos casos de mucocutânea e apresentam-se bastante similar a *L. (V.) naiffi* (SILVEIRA et al., 2002).

Os parasitas do subgênero *Viannia* são extremamente heterogêneos, apresentando considerável polimorfismo entre suas populações. As investigações eco-epidemiológicas permitiram concluir que o gênero *Leishmania* representa um sistema bastante complexo, apresentando numerosas oportunidades para o desenvolvimento de estudos relacionados à evolução, biologia, assim como o seu papel na doença humana (LAINSON E SHAW, 1987).

No subgênero *Leishmania*, a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* encontra-se distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás). Agente etiológico de LTA, incluindo a forma anérgica ou leishmaniose cutânea difusa, possui como reservatórios roedores e marsupiais e como principais vetores *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca* (GONTIJO E CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a responsável pela maioria dos casos de LTA no Brasil, sendo *Leishmania (Leishmania) amazonensis* também considerada importante agente causador da doença nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (ANDRADE et al., 2005).

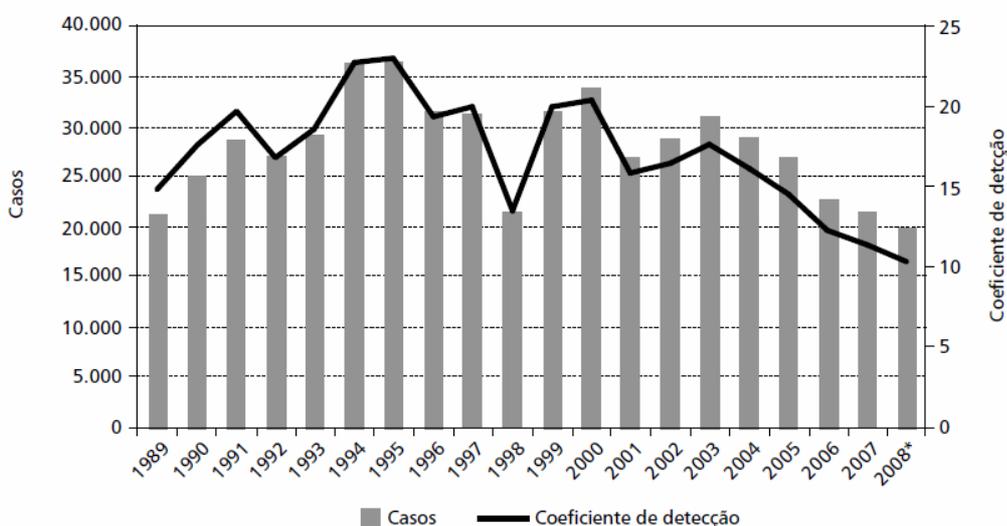
A LTA é capaz de produzir uma variedade de formas clínicas que acometem isoladamente ou em associação à pele e mucosas do nariz, boca, faringe e laringe, gerando o espectro das quatro formas clínicas da doença: a leishmaniose cutânea

localizada (LCL) provocada por diversas espécies de *Leishmania*, a leishmaniose mucocutânea (LMC) associada principalmente à *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) associada à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a leishmaniose cutânea disseminada boderline (LCDB) associada às duas espécies (SILVEIRA et al., 2004).

Uma única espécie muitas vezes pode causar diferentes manifestações clínicas, dependendo da patogenicidade do parasito e da resistência do hospedeiro à infecção. Portanto, enquanto a detecção do parasita é suficiente para fins de diagnóstico, a identificação das espécies de *Leishmania* é importante por razões epidemiológicas e clínicas, ajudando a investigar a patogenia das diferentes formas clínicas da LTA (ALESSI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

Analisando-se a evolução da LTA no Brasil (Gráfico 1), observou-se uma expansão geográfica no início dos anos 80, quando se registrou casos em 19 unidades federadas e, em 2003, todos os estados registraram autoctonia. A Região Norte contribuiu com o maior número de casos (cerca de 36% do total de casos registrados, no período) e com os coeficientes médios mais elevados (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-Oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

GRÁFICO 1 - Número de casos e coeficiente de detecção de casos autóctones de LTA. Brasil 1989 a 2008



Fonte: SVS/MS, 2009a.
Dados sujeitos a revisão

De 1988 a 2007, a LTA apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

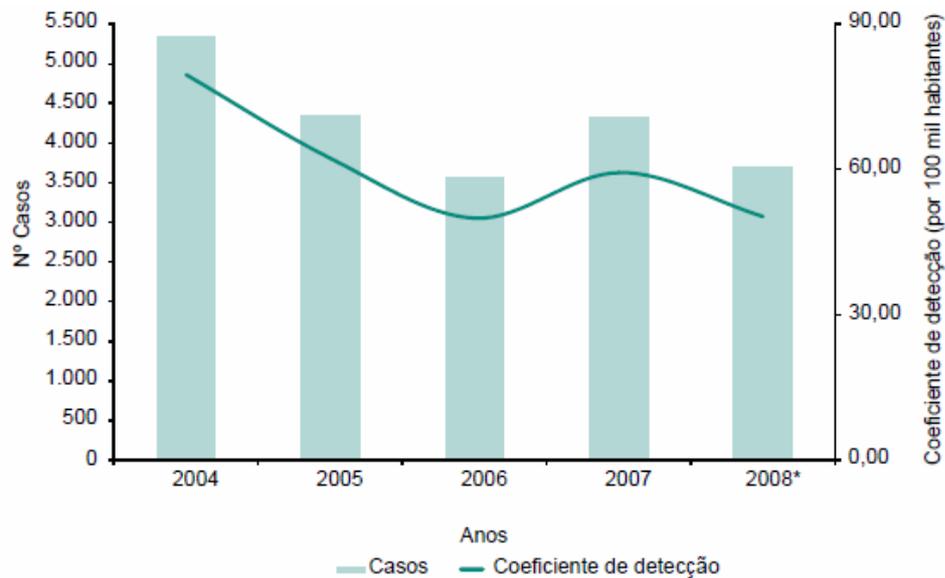
No período de 2001 a 2003, observa-se que o maior número de casos de LTA foi representado pela Grande Região do Tucuruí, envolvendo os estados do Pará, Maranhão e Tocantins, apresentando densidade de 551,84 casos. A faixa etária mais acometida são os maiores de 10 anos com aproximadamente 90% dos casos. Os indivíduos do sexo masculino representaram 60% dos casos e a forma mucosa 4,71% do total registrado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Variações cíclicas na incidência da LTA seriam influenciadas fortemente por fatores geográficos e climáticos, responsáveis pelas flutuações nas populações de flebotomíneos (DIAS et al., 2007).

A doença é contraída principalmente por trabalhadores responsáveis por atividades que requerem a entrada na floresta, assim como pelos nativos locais. Estes fatores são importantes na epidemiologia da doença, por serem responsáveis pela manutenção do elevado número de casos na região.

No período de 2004 a 2008, foram registrados 21.213 casos de LTA no Pará, o que corresponde a 41% dos casos registrados na Região Norte e 18% no País. O Pará é o estado com maior registro de casos. O coeficiente médio de detecção para o período foi de 60,3 casos por 100 mil habitantes (Gráfico 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

GRÁFICO 2 - Número de casos e coeficiente de detecção (por 100 mil habitantes) de leishmaniose tegumentar americana. Pará 2004 a 2008



Fonte: SVS/MS, 2009b.
Dados sujeitos a revisão

4.3 PATOGENIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A patogenia da LTA centraliza-se no mecanismo da relação parasito-hospedeiro o qual estimula uma resposta imune específica. A infecção pelas espécies de *Leishmania* que causam a LTA tem seu início logo após a inoculação das formas promastigotas do parasito na pele. A partir desse momento, inicia-se um processo de escape do parasito frente às defesas do organismo, o qual, quando vencido pelo parasito, resultará na sua fagocitose pelas células do SFM (SILVEIRA et al., 2008).

Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as espécies de *Leishmania* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, proferida por produtos do metabolismo do oxigênio, baixo pH e proteínas catiônicas, conseguindo sobreviver neste ambiente tóxico e multiplicando-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (ALMEIDA, 2006). Como consequência deste processo, haverá a liberação de partículas antigênicas que provocarão uma resposta específica do sistema imune, influenciando na

evolução da doença para cura espontânea ou formas autolimitadas ou formas progressivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

Evidências clínicas e experimentais demonstram que a imunidade específica na LTA é basicamente mediada por células T CD4+. Para dar início à resposta imune específica, células de Langerhans transportam os parasitos e seus antígenos aos linfonodos regionais, visando a apresentar o antígeno às células T CD4+ que, ao liberarem citocinas, regulam o potencial microbicida dos macrófagos. O IFN- γ tem papel importante na defesa contra microrganismos intracelulares como a *Leishmania*, ativando macrófagos e estimulando a liberação de outras citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006b).

O TNF- α , citocina produzida principalmente por macrófagos ativados, também é responsável pela ativação policlonal de células B. Em decorrência dessa ativação, há considerável indução da resposta humoral com produção de anticorpos anti-*Leishmania* que participam, na interação inicial do parasito, com elementos inespecíficos da resposta inflamatória (REIS et al., 2006).

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada para examinar aspectos da relação parasito-hospedeiro na leishmaniose, como o controle genético de susceptibilidade e resistência, o papel da resposta imune mediada por células e a interação parasito-macrófago. A resistência é conferida por células Th1, enquanto a susceptibilidade é conferida por células Th2. A dicotomia Th1 X Th2 é observada nesse modelo e está associada à produção de IL-4 em camundongos susceptíveis e de IFN- γ em camundongos resistentes. Muitas linhagens de camundongos resistentes apresentam um aumento na produção de IL-12, que ativa células NK, e células T CD4+ e CD8+ para produzirem IFN- γ , necessário para o desenvolvimento da resposta Th1 (REIS et al., 2006).

Linhagens susceptíveis apresentam um aumento na expressão de mRNA para IL-4 e na produção de IL-5, IL-10 e IL-13. IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos receptores da IL-12 nas células Th1, suprimindo o desenvolvimento de IFN- γ , o que leva ao desenvolvimento da resposta Th2. A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrófagica e contribui para o crescimento do parasito nas lesões. Tem sido demonstrado que células NK representam uma fonte inicial de IFN- γ , que é um importante mediador da resistência inata contra o parasito (REIS et al., 2006).

Nos cães a resposta imunológica celular positiva deve ser a base para a proteção contra o desenvolvimento da doença. A determinação exata da resposta imune celular específica às espécies de *Leishmania* em cães é um indicador fundamental de um fenótipo Th1, associada a um controle efetivo de infecção e sobrevivência do hospedeiro (MAIA E CAMPINO, 2008).

4.4 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Frequentemente, a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final (ANDRADE et al., 2005).

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinado foco de transmissão, particularmente em regiões onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é muito importante para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e planejamento de estratégias de controle (LIMA et al., 2009).

O diagnóstico clínico da LTA é sugerido na anamnese e baseia-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos do doente (pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente) (ANDRADE et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial é feito por meio de exames direto e indireto. Pode ser realizado por meio da demonstração direta do parasito, que é considerado o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano. Para a pesquisa direta, são utilizados os seguintes procedimentos: escarificação, biópsia e punção aspirativa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Outro método utilizado é o isolamento do parasito em meio de cultura *in vitro*, que permite a identificação da espécie presente na lesão. Entretanto, as espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e mais de 10 dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. A sensibilidade global desse método está em torno de 50% para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Casos crônicos, como aqueles com baixa carga

parasitária na lesão, também resultam em uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método (ANDRADE et al., 2005).

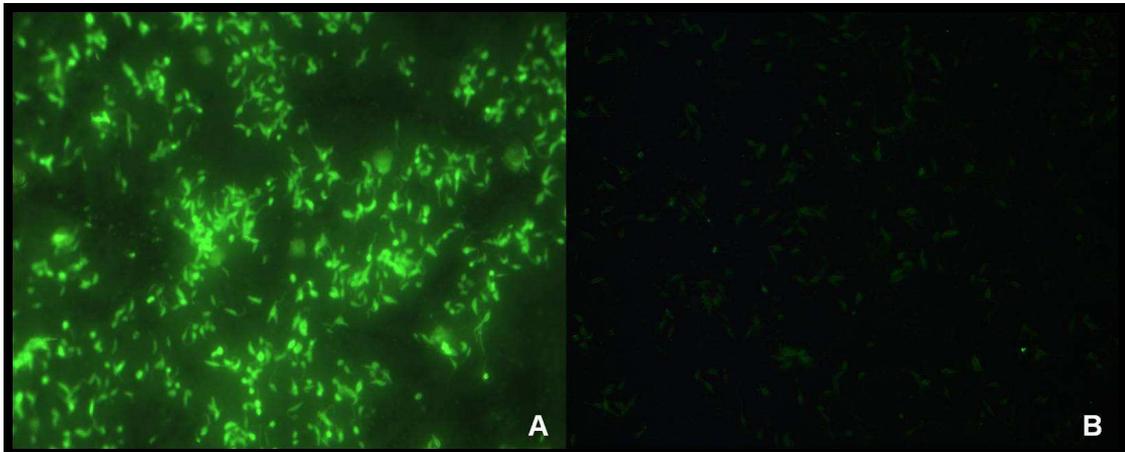
Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação de material da biópsia cutânea em animais de laboratório, de preferência em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses em média) e da necessidade de um laboratório adequado, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania*. Esse método é mais utilizado em laboratórios de pesquisa (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

O exame imunológico de primeira escolha é a Intradermoreação de Montenegro (IDRM) que se fundamenta na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. A IDRM geralmente persiste positiva após o tratamento, ou a cicatrização da lesão cutânea tratada, ou curada espontaneamente, podendo negatizar nos indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

Testes sorológicos têm sido empregados, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos dessas enfermidades. Estes testes detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes e geralmente apresentam títulos baixos. A análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da infecção, bem como fornecer dados sobre as características de sua resposta imune (GUTIERREZ et al., 1991).

Dentre os métodos sorológicos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o mais utilizado (Fig. 5). É uma técnica sensível, porém, existe a possibilidade de reações cruzadas, especialmente com *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas, e com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, agente da LVA, ambas muito prevalentes em áreas endêmicas de LTA, causando confusão em termos de diagnóstico (KAR, 1995). A RIFI apresenta resultados variáveis na LTA, quer pela reduzida antigenicidade do parasito quer pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Portanto, não deve ser empregada como critério isolado para o diagnóstico (MARZOCHI E MARZOCHI, 1994).

FIGURA 5 - Reação de Imunofluorescência Indireta: (A) Reagente e (B) Não Reagente.



Fonte: IEC/Laboratório de Leishmaniose.

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

A PCR baseia-se na replicação *in vitro* do DNA. É usada para amplificar um segmento de DNA posicionado entre duas regiões de sequência conhecida. Este método também é útil na identificação da persistência parasitária após terapêutica e no estudo da infecção subclínica (FAGUNDES et al., 2007).

A utilização da PCR possibilitou a identificação de material genético de *Leishmania*, mesmo em quantidades mínimas como 50fg de DNA do parasita (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2006; VELASQUEZ et al., 2006).

A PCR é particularmente útil no caso da LTA em decorrência da necessidade da confirmação parasitológica. Além disso, os métodos convencionais, como a Intradermorreação de Montenegro e a sorologia, apresentam baixa sensibilidade. A detecção precoce do parasita pode prevenir casos da doença, permitindo a implementação do tratamento específico.

4.5 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA CANINA

A LTA é originalmente silvestre, mas nos últimos anos vem ocorrendo em áreas rurais e urbanas. A doença ocorre em locais onde há derrubada de matas e

colonização recente, mas ultimamente vem sendo verificada também em áreas de colonização antiga de diversos estados brasileiros, onde existem matas residuais ou de segunda formação. Nessas áreas os cães estão frequentemente parasitados (LONARDONI et al., 2006; SANGIONE et al., 2007).

Há muito tem suspeitado da importância do cão no ciclo epidemiológico da LTA. Em 1949, Romãa et al. levantaram a hipótese de transmissão domiciliar ao encontrarem pessoas e cães doentes na mesma casa. Admitiram os autores que os cães teriam contraído a doença na floresta, levando-a para o ambiente doméstico onde teria sido transmitida às pessoas pelos flebotomíneos. Na época parecia opor-se a este ponto de vista o fato de que este achado ocorreu em casas próximas das florestas. Predominava então o conceito clássico da transmissão silvestre, no qual os animais domésticos seriam hospedeiros acidentais do parasito (FALQUETO et al, 1986).

Os achados de Herrer nos anos de 1949 e 1951, no Peru, revolucionaram esse conceito, pois o autor observou uma nítida relação entre a presença de cães parasitados e a existência de grande número de crianças doentes, fatos esses associados à aparente ausência de reservatórios silvestres na região (FALQUETO et al., 1986).

Posteriormente foram publicados os primeiros estudos de infecção natural por *Leishmania* em animais silvestres em áreas endêmicas no Brasil, mas não produziram resultados conclusivos, pois o que existiu em comum foi a raridade de infecção de animais silvestres por *Leishmania* (FALQUETO et al., 1986). Forantini (1960), no estado de São Paulo, examinou 928 animais silvestres, de 15 diferentes espécies, encontrando infectadas por *Leishmania* três espécimes de três diferentes espécies (*Cuniculus paca*, *Dasyprocta azarae*, *Kannabateomys amblyonyx*). Anos mais tarde, Dias et al. (1977), em Minas Gerais, investigaram 300 animais pertencentes a 17 diferentes espécies e não foi obtida qualquer evidência de infecção por *Leishmania*. A demonstração da presença de *Leishmania*, nestes estudos, foi feita através de exame direto de esfregaço de pele e/ou baço.

A descrição de cães infectados por *Leishmania* que causam a LTA data da década de 80, quando achados sobre a LTA em animais domésticos foram publicados por Falqueto et al. (1986). Os autores encontraram 32 (17,2%) cães infectados em Viana, Espírito Santo e esses animais ao invés de aparecerem em domicílios instalados junto às florestas, foram observados mais frequentemente

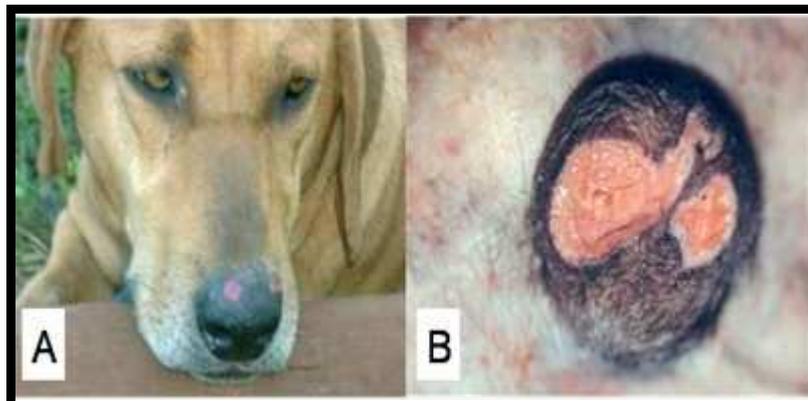
onde havia maior concentração de casas. Cinco anos depois, em Itarana no estado do Espírito Santo, encontrou-se uma frequência de 12,5% de cães parasitados pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FALQUETO et al., 1991).

Vários autores observaram a presença frequente de cães infectados em áreas endêmicas de LTA humana, no Brasil. Em estudos realizados nos estados do Rio de Janeiro e Paraná foi relatada a existência de um alto percentual de cães com sorologia positiva (LONARDONI et al., 1993; SANTOS et al., 1998; SILVEIRA et al., 1996; ZANZARINI et al., 2005; VELÁSQUEZ et al., 2006).

Estudos realizados por Barbosa et al. (1999) e Serra et al. (2003) no estado do Rio de Janeiro, demonstraram a presença de lesões sugestivas de LTA em cinco e dezoito cães, respectivamente.

As alterações dermatológicas sugestivas de LTA em cães, quando presentes, localizam-se nas orelhas, na bolsa escrotal e no focinho (Fig. 6), sendo na maior parte, lesões únicas, ulceradas ou ulcero-crostosas e de evolução crônica (MADEIRA et al., 2003).

FIGURA 6 - Leishmaniose Tegumentar Americana em cão: A) Lesões no focinho; B) Lesões na bolsa escrotal.



Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/MS (2007).

No Brasil, além dos cães, também tem sido encontrado casos de felinos com LTA; foram diagnosticados a infecção natural em gatos domésticos, sendo encontrados registros em Belo Horizonte, Rio de Janeiro e Campo Grande (FIGUEIREDO et al., 2008; PASSOS et al., 1996; SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

Souza et al. (2009) demonstraram em um estudo realizado em Mato Grosso de Sul a presença de um felino infectado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Fig. 7). Embora vários estudos tenham relatado animais domésticos como reservatórios dos agentes da leishmaniose tegumentar americana (LTA), a literatura indica que os casos de felinos são raros e esporádicos (BARBOSA et al., 1999; SANTOS et al., 2005; SERRA et al., 2003).

FIGURA 7 - Lesões tegumentares em felino infectado por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: (A) Lesão ulcerada no nariz e (B) Nódulos na orelha.



Fonte: SOUZA et al. (2009).

Apesar do encontro de cães e gatos infectados, diversos questionamentos ainda permanecem quanto ao verdadeiro papel dos animais domésticos, principalmente o cão, no ciclo de transmissão da LTA, sendo necessários mais estudos que contribuirão não só para o diagnóstico precoce dos casos caninos bem como para o esclarecimento do papel dessa espécie animal na epidemiologia da LTA (MADEIRA et al., 2003).

5 MATERIAL E MÉTODOS

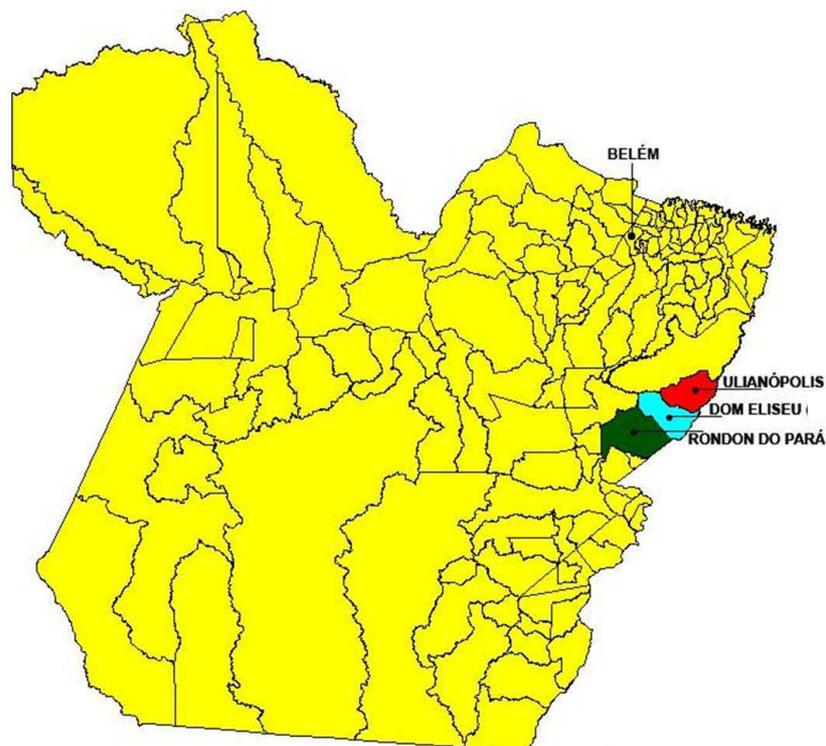
5.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal para investigar a frequência da infecção canina em localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará.

5.2 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado entre maio e dezembro de 2011, em localidades rurais, nos municípios de Ulianópolis ($03^{\circ}45'35.00''S$: $47^{\circ}29'42.54''W$), Dom Eliseu ($04^{\circ}17'47.80''S$: $47^{\circ}33'23.79''W$) e Rondon do Pará ($04^{\circ}46'29.18''S$: $48^{\circ}04'01.16''W$) (Fig. 8), pertencentes à mesorregião do sudeste paraense, de clima tropical de transição, que distam 420, 470 e 550 Km de Belém, respectivamente.

FIGURA 8 - Municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará localizados na mesorregião do sudeste paraense: Áreas de investigação da infecção canina por *Leishmania* spp..



Fonte: LAB/Informática/NMT

A vegetação desta mesorregião corresponde ao subtipo floresta densa da sub-região dos altos platôs do Pará-Maranhão, floresta densa de planície aluvial e densa dos terraços. Entretanto, os constantes desmatamentos, aliados à sua condição de frente pioneira, vêm degradando a vegetação original, propiciando o aparecimento de grandes áreas de capoeira.

A escolha dos municípios foi com base nos dados e sugestões da Secretaria de Saúde do Estado do Pará (SESPA), pois Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará são municípios endêmicos para LTA humana, sem qualquer caso de LVA humana e canina registrados até o presente momento, sendo que as áreas de trabalho foram sugeridas pelos coordenadores de endemias e da vigilância epidemiológica de cada secretaria municipal de saúde.

As localidades rurais (Fig. 9) envolvidas foram: Assentamento Nova Vida e Vila Rossi e Gabriel, que distam aproximadamente 14 e 50 km respectivamente do centro do município de Ulianópolis; Colônias Paraíso e Betel, localizadas aproximadamente a 6 e 30 km respectivamente do centro do município de Dom Eliseu; Comunidade Santa Helena, Vila José Dutra e Vila Santa Lúcia, localizados a 26, 45 e 51 km respectivamente do centro do município de Rondon do Pará.

FIGURA 9 - Localidades rurais envolvidas no estudo: (A) Assentamento Nova Vida, Ulianópolis e (B) Vila Santa Lúcia, Rondon do Pará.



5.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população canina incluída nesta investigação foi formada estritamente por cães domiciliados, com ou sem sinais de LTA, de ambos os sexos, idade igual ou maior a cinco meses, de pesos variados, cujo responsável pelo animal aceitou participar da pesquisa.

5.4 COLETA DAS AMOSTRAS CANINAS

Foi investigado no total 224 cães, que após análise clínica, se coletou sangue periférico por punção venosa (Fig. 10), de uma das patas. Dependendo do tamanho do animal, 5 a 10 mL de sangue foram retirados e aliquotados em dois tubos estéreis, um contendo EDTA para separação de leucócitos e outro sem anticoagulante para separação do soro. O material do tubo sem EDTA foi centrifugado para a separação do soro e o material do tubo com EDTA foi centrifugado para a separação da camada de leucócitos. O soro foi estocado em freezer a -20°C para posterior pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A camada de leucócitos foi utilizada para extração de DNA sendo este utilizado posteriormente para a detecção molecular de *Leishmania* através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

FIGURA 10 - Coleta das amostras sanguíneas.



Foi colhido material para parasitoscopia de alguns animais que apresentavam lesões sugestivas de leishmaniose. O material foi obtido por escarificação da parte interna da borda da lesão, fixado com metanol em lâminas, corado pelo método de Giemsa e examinado ao microscópio óptico (E100/Nikon) para pesquisa de formas amastigotas.

5.5 INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para a pesquisa de IgG, foi realizada com promastigotas formolizadas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania (Viannia) shawi* (MHOM/BR/1996/M15789), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1966/PH8) e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MCAN/BR/2005/M23485).

As formas promastigotas foram obtidas do criobanco do Laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC) e cultivadas em meio RPMI 1640. Após atingirem a fase estacionária de crescimento, foram lavadas com solução tamponada de salina fosfatada - PBS (14mM NaCl, 2,5mM NaH₂PO₄H₂O, 7,4mM Na₂HPO₄, pH 7,2) para posterior contagem dos parasitas em Câmara de contagem do tipo Neubauer (Loptik-Labor). Após contagem foi feita a diluição adequada de 10⁴ parasitas/mL para o preparo da lâmina antígeno.

Para a realização da RIFI, 10µL de antígeno foram incubados em cada orifício da lâmina a 37°C por duas horas. O soro dos cães foi diluído em PBS de 1:40 até 1:1280. Em uma câmara de acrílico, forrada com papel absorvente e umedecida com água destilada (câmara úmida), as lâminas foram dispostas lado a lado, sendo estas previamente identificadas. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado utilizando-se 10µL de soro de equino (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) a 2,5%, diluído em PBS, sendo as lâminas incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida, por 30 minutos. Em seguida, 10µL de cada diluição do soro canino foram distribuídos na lâmina e incubados a 37°C durante 30 minutos.

Após retirar as lâminas da estufa os soros foram removidos sob delicado jato de PBS e as lâminas submergidas em PBS durante 10 minutos. Em seguida, lavadas com um leve jato de água destilada e submergidas em água destilada durante 5 minutos. As bordas dos poços das lâminas foram secas cuidadosamente com um lenço-papel e acrescentou-se aproximadamente 15 µL do conjugado

fluorescente anti-IgG canino (Sigma Chemical F 7884), na diluição 1:32, em cada orifício da lâmina. As etapas de incubação e lavagem foram repetidas como anteriormente.

As lâminas foram montadas com glicerina tamponada (0,5 M Na₂CO₃/Na₂HCO₃; pH 9,5; 30% glicerina) entre lâmina e lamínula e levadas ao microscópio de imunofluorescência para a realização da leitura sob objetiva de 40X. Foram considerados reagentes todos os títulos iguais ou superiores a 40.

Para a padronização do protocolo da RIFI com as espécies selecionadas na forma promastigota, foram realizados testes em paralelo com antígenos de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, na forma amastigota.

Para descartar possíveis reações cruzadas com outras infecções, todos os antígenos, de formas promastigotas, foram testados com soros de cães infectados com *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp., utilizando o mesmo protocolo descrito acima.

5.6 EXTRAÇÃO DE DNA DO MATERIAL SANGUÍNEO

A extração de DNA foi realizada por meio da técnica do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), segundo Sambrook et al. (1989). Para a lavagem da camada de leucócitos foi adicionado 1mL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) com leve agitação durante 3 minutos e submetido a centrifugação a 5.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a lavagem foi repetida 5 vezes e em seguida foi adicionado o tampão de lise NET (10mM NaCl, 10mM EDTA, 1mM Tris), 1% SDS e 2µL de proteinase K (em uma concentração final de 50 µg/mL), seguida de incubação a 42 °C por 12 horas.

Após o período de incubação foi adicionado igual volume de fenol e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), agitando-se levemente por 5 minutos e então centrifugado a 5.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e identificado para repetir o procedimento. Em seguida, foi adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) que foi agitado levemente por 5 minutos e então centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril e identificado, sendo adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 2 ½ volume de etanol absoluto gelado, mantendo a -20 °C para a precipitação do DNA.

Em seguida, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente e todo o sobrenadante foi desprezado por inversão. Posteriormente foram adicionados ao sedimento de DNA 500µL de etanol 75%, sendo centrifugados a 14.000rpm por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Todo o sobrenadante foi desprezado e o sedimento levado à estufa a 37 °C. O sedimento seco foi suspenso em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantido a - 20 °C até o momento do uso.

5.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a amplificação *in vitro* do DNA de *Leishmania*, foram utilizados os marcadores S1629 (5'- GGG AAT TCA ATA WAG TAC AGA AAC TG - 3') e S1630 (5'- GGG AAG CTT CTG TAC TWT ATT GGT A - 3'), descritos por Fernandes et al. (1994), que amplificam o fragmento de aproximadamente 400 pb do gene de Mini-exon das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas, 250 pb para o subgênero *Viannia* e 350 pb para a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (DEGRAVE et al., 1994; FERNANDES et al., 1994).

A reação foi realizada em um volume total de 10 µL contendo 100 µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5 mM de MgCl₂; 100 mM de solução tampão de PCR; 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos sintéticos (marcadores); 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO); 1,5 µL (aproximadamente 10 ng) de DNA extraído.

Em um termociclador Eppendorf (Mastercycler® personal) programado, a reação foi incubada a uma temperatura inicial de desnaturação de 95°C por 3 minutos, seguida de 5 ciclos de 95°C por 1 minuto, 45°C por 30 segundos e 65°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A etapa de extensão final foi mantida por 10 minutos a 72°C (FERNANDES et al, 1994).

Para confirmação da infecção mista foi realizada PCR utilizando outros marcadores, B1 (5'- GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG - 3') e B2 (5'- CTA ATT GTG CAC GGG GAG G - 3') (DE BRUIJIN E BARKER, 1992) e M1 (5'- CCA GTT TCG AGC CCC GGA G - 3') e M2 (5'- GGT GTA AAA TAG GGG CGG ATG CTC TG - 3') (ERESH et al., 1994).

Cada reação de amplificação foi feita em um volume final de 25 µL contendo 2,5 U/µL de *Taq* DNA polimerase (GIBCO), 200 µM de cada dNTPs, 1,5 mM de

MgCl₂, 50 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5 com 25 pmoles dos oligonucleotídeos sintéticos (marcadores) por reação e 2 µL de DNA extraído. Os marcadores B1 e B2 (DE BRUIJIN E BARKER, 1992) e M1 e M2 (ERESH et al., 1994) amplificam 700pb do kDNA das espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e da *L. (L.) amazonensis*, respectivamente.

Foi utilizada água destilada como controle negativo e três cepas de *Leishmania* como controle positivo: *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (MCAN/BR/2005/M23485), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1966/PH8).

5.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1,5% com tampão tris-acetato-EDTA (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0), sendo submetida a 100V e 50 mA por 1 hora. O fragmento amplificado de DNA foi corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL e as bandas foram visualizadas em transluminador UV (Electronic UV Transilluminator/Ultra-Lum). As imagens foram capturadas e fotodocumentadas pelo equipamento Vilber Loumart.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Neste trabalho foi aplicada a estatística descritiva e analítica para organizar e descrever os dados em estudo. Deste modo, o Teste do Qui-Quadrado foi utilizado para verificar uma suposta associação entre gênero e positividade na RIFI e na PCR. A análise comparativa das médias de idade (variável quantitativa) foi realizada através do teste T. Os resultados estatísticos dos testes foram obtidos através do BioEstat 5.0, considerando o nível de confiança estatístico pré-definido de 95% ($p < 0,05$).

A análise da concordância entre os antígenos testados na RIFI foi analisada através de tabelas de contingência 2x2 (Tabela 1) utilizando o indicador *kappa* (k) (Tabela 2) (ANDRADE E ZICKER, 1997). A máxima proporção de concordância não devida ao acaso é o máximo valor encontrado para k , ou seja $k = 1$, levando em consideração que proporção esperada (Pe) será igual a 0,5.

Tabela 1. Tabela de contingência 2x2.

Antígeno A	Antígeno B		Total
	RIFI Reagente	RIFI Não Reagente	
RIFI Reagente	A	B	A+B
RIFI Não Reagente	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	N

O índice *kappa* se define como:

$$\kappa = \frac{\frac{(A+D)}{N} - Pe}{1 - Pe}$$

Tabela 2. Escala de concordância do indicador *Kappa*

<i>Kappa</i>	Concordância
<0.00	Nenhum
0.00 – 0.20	Fraco
0.21 – 0.40	Sofrível
0.41 – 0.60	Regular
0.61 – 0.80	Boa
0.81 – 0.99	Ótima
1.00	Perfeita

Fonte: Andrade e Zicker, 1997

A correlação, entre os resultados das técnicas RIFI e PCR, foi analisada através do Teste de McNemar, empregando o programa BioEstat 5.0, o nível de confiança estatístico pré-definido de 95% ($p < 0,05$) foi considerado. A concordância entre as duas técnicas foi analisada através do indicador *kappa* (ANDRADE E ZICKER, 1997).

5.10 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Foram incluídos nesta investigação, cães domiciliados que residam nas localidades do estudo cujo responsável aceitou participar da pesquisa. Cães errantes e fêmeas grávidas ou recém-paridas foram excluídos. Os riscos foram considerados mínimos, tendo em vista que os procedimentos para a obtenção do

material biológico foram os convencionais para o diagnóstico de rotina, durante os quais todos os cuidados técnicos foram observados pelos profissionais veterinários. O benefício direto desta investigação será inicialmente para os pesquisadores e aos programas de vigilância epidemiológica envolvidos, pois proporcionará um melhor conhecimento dos aspectos da infecção pelas espécies de *Leishmania* que causam a LTA, em cães.

Este estudo constitui um subprojeto do projeto de pesquisa: “Avaliação da infecção canina em áreas endêmicas da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Pará”. O projeto foi elaborado seguindo recomendações do Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV), com base nos procedimentos regulamentados pelo Projeto de Lei nº 1153, de 1995, sobre Pesquisa em animais, aprovado na Câmara de Deputados em 25 de junho de 2003. O Projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais, do Instituto Evandro Chagas-SVS, sob o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais 0005/2008/CEPAN/IEC/SVS/MS (Anexo).

6 RESULTADOS

6.1 POPULAÇÃO CANINA E PERFIL DA AMOSTRA

Foram estudados 224 cães provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis (n= 102), Dom Eliseu (n= 70) e Rondon do Pará (n= 52), equivalendo a 129 núcleos familiares. Dos cães investigados, 142 (63,39%) eram machos e 82 (36,61%) fêmeas. Na distribuição por faixa etária, 171 (76,34%) tinham idades entre um e cinco anos. A idade média foi de 2,9 anos (desvio padrão de ± 2 anos), variando de cinco meses a nove anos. Quanto à raça, 100% dos cães não apresentaram raça definida. A Tabela 3 apresenta a distribuição dos cães entre os 129 núcleos familiares visitados.

Tabela 3. Distribuição dos cães por gênero e faixa etária entre os 129 núcleos familiares visitados em localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.

Municípios	Localidades	Nº de Residências Visitadas	Nº de Cães/Residência			Gênero		Idade dos cães (Anos)		
			1	2	≥3	Macho	Fêmea	< 1	1 - 5	> 5
Ulianópolis										
	Assentamento Nova Vida	39	24	8	7	39	27	5	55	6
	Vila Rossi e Gabriel	20	9	8	3	19	17	9	26	1
Dom Eliseu										
	Colônia Paraíso	18	9	3	6	28	12	3	32	5
	Colônia Betel	21	13	7	1	20	10	4	16	10
Rondon do Pará										
	Comunidade Santa Helena	14	11	1	2	16	3	1	13	5
	Vila José Dutra	7	4	1	2	10	7	0	16	1
	Vila Santa Lúcia	10	5	2	3	10	6	3	13	0

Total	129	75	30	24	142	82	25	171	28
--------------	------------	-----------	-----------	-----------	------------	-----------	-----------	------------	-----------

6.2 ANÁLISE SOROLÓGICA

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada em 224 amostras de soros de cães, dos quais 118 (52,68%) apresentaram título de anticorpos anti-*Leishmania* spp. igual ou superior a 40, em pelo menos um dos quatro antígenos testados, cujos títulos variaram de 40 a 1.280.

Das 224 amostras testadas, pela RIFI com diferentes antígenos foi demonstrado que 29,91% (67/224) foram reagentes quando utilizado o antígeno de *L. (L.) infantum chagasi*, 40,61% (91/224) foram reagentes com o antígeno *L. (V.) braziliensis*, 45,09% (101/224) foram reagentes com o antígeno *L. (L.) amazonensis* e 43,30% (97/224) foram reagentes com o antígeno *L. (V.) shawi*. O resultado da análise dos soros caninos, pela RIFI, utilizando quatro antígenos, encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado da análise dos 224 soros de cães provenientes de localidades rurais dos Municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, pela RIFI utilizando quatro antígenos, entre maio e dezembro de 2011.

Municípios	Nº de cães	RIFI Reagente			
		<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
Ulianópolis	102	36 (35,19%)	40 (39,26%)	40 (39,26%)	42 (41,18%)
Dom Eliseu	70	7 (10%)	24 (34,29%)	31 (44,29%)	28 (40%)
Rondon do Pará	52	24 (46,15%)	27 (51,92%)	30 (57,69%)	27 (51,92%)
Total	224	67 (29,91%)	91 (40,61%)	101 (45,09%)	97 (43,30)

A Tabela 5 apresenta a concordância entre os resultados dos antígenos utilizados na RIFI, testados nas amostras de soro dos 224 cães estudados.

Tabela 5. Concordância entre os resultados dos antígenos utilizados na RIFI.

Antígenos	Kappa	Antígenos	Kappa
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> X <i>L. (V.) braziliensis</i>	k=0.75 CG: 87,50% Concordância Boa	<i>L. (L.) amazonensis</i> X <i>L. (V.) braziliensis</i>	k=0.71 CG: 85,71% Concordância Boa
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> X <i>L. (L.) amazonensis</i>	k=0.59 CG: 79,46% Concordância Regular	<i>L. (V.) braziliensis</i> X <i>L. (V.) shawi</i>	k=0.84 CG: 91,96% Concordância Ótima
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> X <i>L. (V.) shawi</i>	k=0.71 CG: 85,71% Concordância Boa	<i>L. (L.) amazonensis</i> X <i>L. (V.) shawi</i>	k=0.75 CG: 87,50% Concordância Boa

CG: Concordância Global

Os resultados de cada antígeno utilizado na RIFI das 224 amostras de soro de cães encontram-se nos Apêndices A, B, e C.

A Tabela 6 representa a associação entre o gênero e a positividade na sorologia, onde verifica-se que dos 118 cães, 82 (69,49%) eram machos e 36 (30,51%) fêmeas. De acordo com o resultado do Qui-Quadrado, onde o valor de p ($p = 0,0629$) foi maior que o nível de significância adotado ($p < 0,05$), não houve associação significativa entre o gênero dos cães e a positividade na sorologia.

Tabela 6. Frequência e percentual da associação entre o gênero e a positividade na sorologia (RIFI) em 224 cães provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.

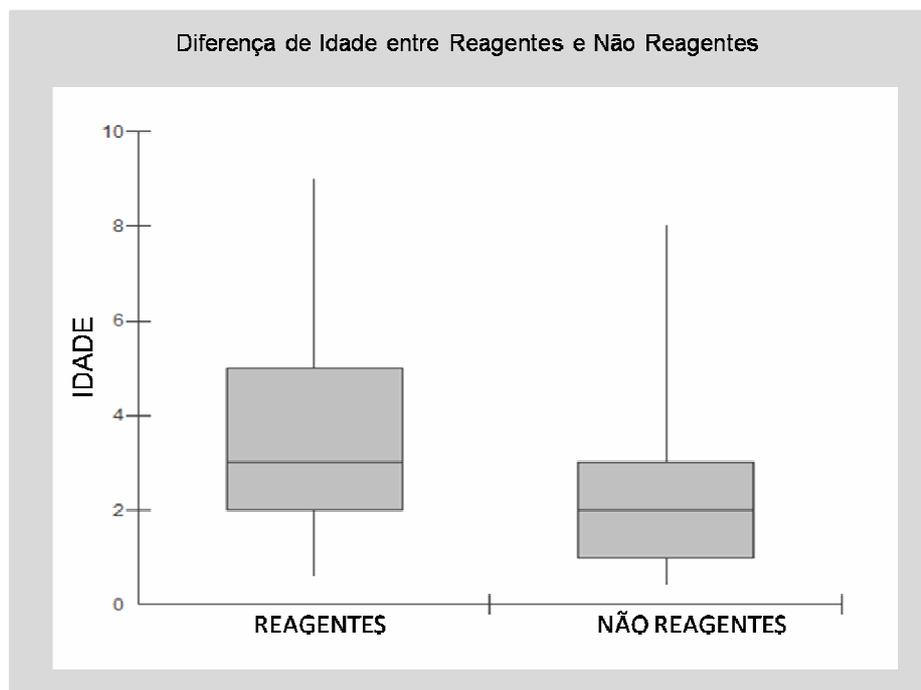
Gênero	RIFI					
	Positivo		Negativo		Total	
	Frequência	%	Frequência	%	Frequência	%
Macho	82	69,49	60	56,60	142	63,39

Fêmea	36	30,51	46	43,40	82	36,61
Total	118	100	106	100	224	100

Teste do Qui-Quadrado; $p = 0,0629$

Na distribuição por faixa etária, de cães com RIFI reagente, dos 118 cães, 94 (79,66%) tinham idades entre um e cinco anos. Observa-se no Gráfico 3 que a média de idade dos cães reagentes é de 3 anos e 4 meses (desvio padrão de ± 2 anos), mediana (3), sendo significativamente maior ($p = 0,0002$) que a dos não reagentes, com idade média de 2 anos e 5 meses (desvio padrão de ± 1 ano e 10 meses) e mediana (2).

GRÁFICO 3 - Diferença das médias de idade entre os cães, reagentes e não reagentes, na RIFI, de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.



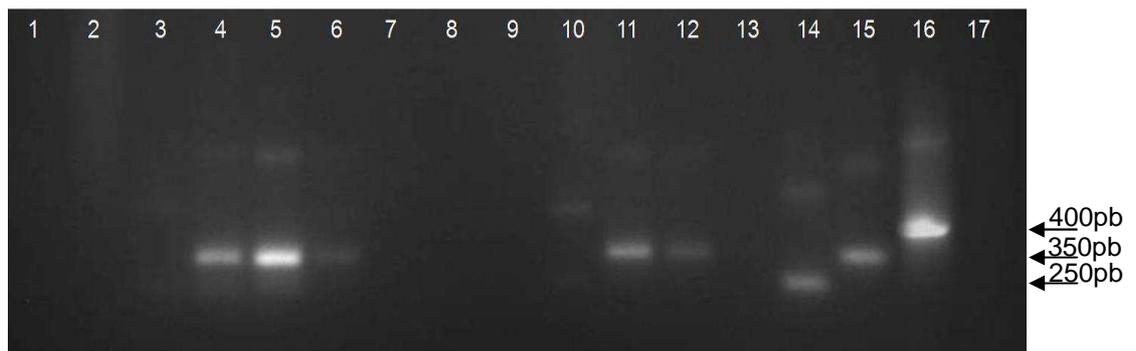
6.3 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. EM AMOSTRAS DE SANGUE DE CÃES

Dos 224 cães analisados no estudo, 150 (66,96%) apresentaram reação negativa e 74 (33,04%) apresentaram reação positiva.

Dentre os 74 cães com PCR positiva foi detectado, no sangue, DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em 68 (91,89%) e DNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em quatro (5,41%), enquanto que dois (2,70%) cães apresentaram infecção mista, sendo detectado tanto DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* quanto de DNA de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Fig. 9). Em nenhuma das amostras testadas foi encontrado DNA compatível com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Os cães que apresentaram infecção mista residem respectivamente na Comunidade Santa Helena (Rondon do Pará) e no Assentamento Nova Vida (Ulianópolis).

FIGURA 11 - Resultado de PCR com iniciadores S1629 e S1630.



Gel de agarose 1,5% - Colunas 1, 2, 3, 7, 8, 9 e 13: amostras negativas; Coluna 10: amostra positiva para DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*; Colunas 6, 11 e 12: amostras positivas para DNA de *L. (L.) amazonensis*; Colunas 4 e 5: amostras com infecção mista por *Leishmania* do subgênero *Viannia* e *L. (L.) amazonensis*; Coluna 14: controle positivo de *L. (V.) braziliensis*; Coluna 15 controle positivo de *L. (L.) amazonensis*; Coluna 16: controle positivo de *L.(L.) infantum chagasi*; Coluna 17: controle negativo.

A Tabela 7 apresenta a associação entre o gênero e a positividade na PCR dos 224 cães. Na tabela verifica-se que 51 dos 74 cães (68,92%) eram machos, assim como a maioria dos 150 negativos para PCR, 91 (60,67%), também eram machos. De acordo com o resultado do Teste do Qui-Quadrado, onde o valor de p ($p = 0,2899$) foi maior que o nível de significância adotado ($p < 0,05$), não houve associação significativa entre o gênero dos cães e a positividade na PCR.

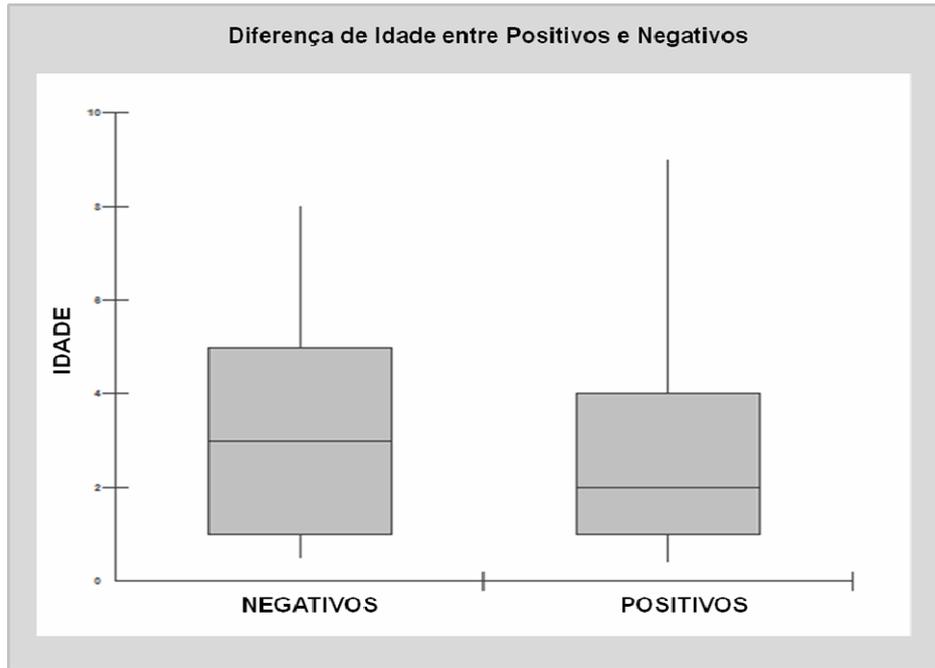
Tabela 7. Frequência e percentual da associação entre o gênero e a positividade na PCR em 224 cães provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011

Gênero	PCR					
	Positivo		Negativo		Total	
	Frequência	%	Frequência	%	Frequência	%
Macho	51	68,92	91	60,67	142	63,39
Fêmea	23	31,08	59	39,33	82	36,61
Total	74	100	150	100	224	100

Teste do Qui-Quadrado; $p = 0,2899$

Na distribuição por faixa etária, de cães com PCR positiva, dos 74 cães positivos, 52 (70,27%) tinham idades entre um e cinco anos. Observa-se no Gráfico 4 que a média de idade dos cães positivos é de 3 anos e 2 meses (desvio padrão de ± 2 anos e 2 meses), mediana (3), não foi significativamente maior ($p = 0,2073$) que a dos negativos, com idade média de 2 anos e 9 meses (desvio padrão de ± 1 ano e 11 meses) e mediana (2).

GRÁFICO 4 - Diferença das médias de idade entre os cães, positivos e negativos na PCR, de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011.



6.4 CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DA RIFI E PCR

Apenas 29 (12,95%) cães apresentaram RIFI e PCR positivas. A Tabela 8 apresenta os resultados detectados pela RIFI e PCR nos 224 cães estudados, agrupados conforme a concordância dos resultados.

Tabela 8. Frequência da associação entre RIFI e PCR em 224 cães de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará, entre maio e dezembro de 2011

RIFI	PCR		Total
	Positiva	Negativa	
Reagente	29	89	118
Não Reagente	45	61	106
Total	74	150	224

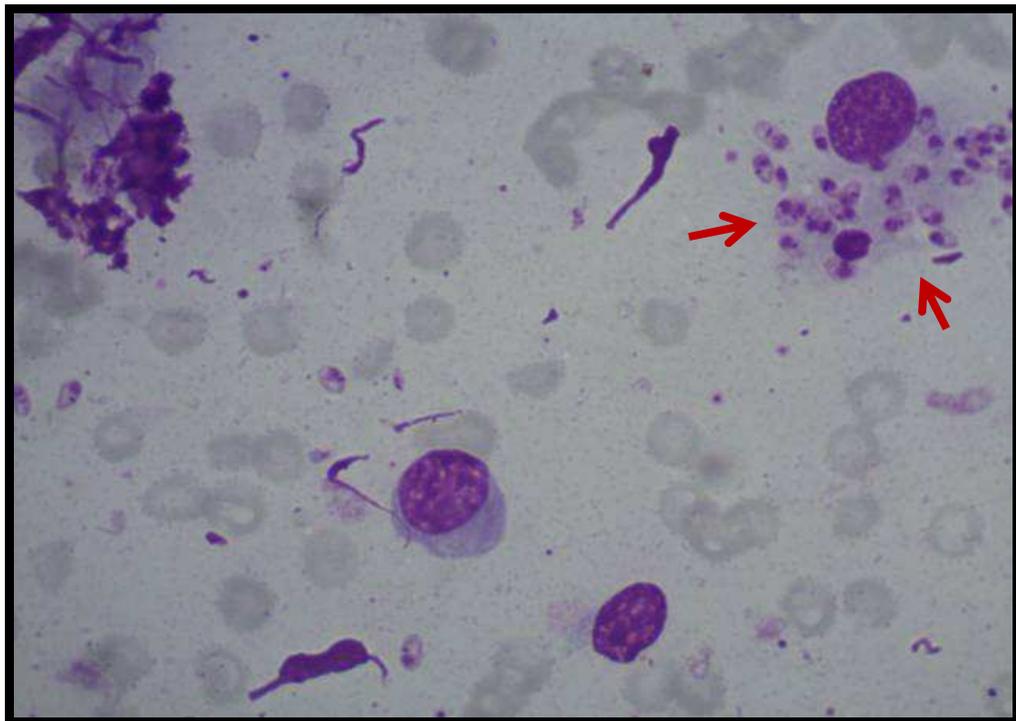
Teste de McNemar ($p = 0,0002$)
Índice $kappa = 0.19$

O Teste de McNemar, aplicado aos dados da Tabela 8, evidenciou um $p = 0.0002$, indicando uma diferença significativa entre as duas técnicas. A porcentagem de concordância global foi de 40,18%. O índice $kappa$ determinado foi de 0.19 ($p = 0,0023$), que indica uma concordância fraca entre os dois testes (ANDRADE E ZICKER, 1997).

6.5 PESQUISA DIRETA DO PARASITO

Dezoito (8,04%) dos 224 cães estudados, apresentaram lesões sugestivas de LTA, dos quais cinco (27,78%) foram positivos para a pesquisa direta do parasito (PDP) (Fig. 12), não sendo possível o isolamento de *Leishmania* spp. devido a contaminação das culturas.

FIGURA 12 - Lâmina de um cão, procedente do Assentamento Nova Vida (Ulianópolis), com pesquisa direta do parasito positiva.



As lesões estavam localizadas nas orelhas e no flanco esquerdo, sendo lesões únicas e ulceradas.

Os resultados parasitológicos, sorológicos e moleculares dos dezoito cães com lesões sugestivas de LTA (Apêndice D) encontram-se resumidos no Quadro 1.

Quadro 1. Resultados parasitológicos, sorológicos e moleculares de dezoito cães com lesões sugestivas de LTA, provenientes de localidades rurais dos municípios de Ulianópolis, Dom Eliseu e Rondon do Pará.

Dados Laboratoriais	Número de Cães
PDP - / RIFI - / PCR -	4
PDP - / RIFI + / PCR -	7
PDP - / RIFI + / PCR +	2
PDP + / RIFI + / PCR -	3
PDP + / RIFI + / PCR +	2
Total	18

PDP: Pesquisa Direta do Parasito; RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase.

Dos 206 (91,96%) cães que não apresentaram lesão, 105 (50,97%) tiveram RIFI reagente e 70 (33,98%) apresentaram PCR positiva para a pesquisa de DNA de *Leishmania* spp..

7 DISCUSSÃO

Devido à inexistência de um antígeno específico para a detecção de anticorpos em cães de áreas endêmicas para LTA, foram selecionadas três espécies de *Leishmania*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis*, causadoras de LTA no estado do Pará, por serem as espécies mais frequentes no estado.

No presente estudo foi observada uma frequência global de 52,68% (118/224) de cães com RIFI reagente, sem apresentar qualquer significância ($p = 0,0524$) com relação ao gênero dos cães.

Analisando a faixa etária dos cães, verificou-se que a média de idade (3 anos e 4 meses) dos cães reagentes na RIFI foi significativamente maior ($p = 0,0002$) que a dos não reagentes (2 anos e 5 meses), possivelmente esses cães por serem mais velhos costumam acompanhar os seus responsáveis em suas atividades diárias, tornando-se alvo dos flebotomíneos durante a alimentação destes insetos.

A taxa obtida de sororeagentes foi considerada alta quando comparada ao estudo realizado por Reis et al. (2011), no estado do Paraná, que utilizaram o antígeno de *L. (V.) braziliensis*, na forma promastigota, na RIFI e obtiveram uma frequência de 45,4% (222/489), quando investigaram cães do município de Bela Vista do Paraíso, região endêmica para LTA.

Silveira et al. (1996) e Zanzarine et al. (2005), investigaram cães no norte estado do Paraná, e obtiveram uma frequência de 18,2% (24/132) e 55,2% (37/67),

de cães sororeagentes na RIFI, respectivamente, com o antígeno de *L. (V.) braziliensis* na forma promastigota. No entanto, De Jesus et al. (2006), observaram que 3,5% (7/200) dos cães apresentaram positividade para o mesmo tipo de antígeno, em Porto Alegre, Rio Grande Do Sul e Heusser Júnior et al. (2010), no município de Balneário Camboriú, estado de Santa Catarina, investigaram 275 cães obtendo 5,8% (16/275) de positividade com a RIFI e 6,2% (17/275) com o ELISA, também utilizando o antígeno de *L. (V.) braziliensis* na forma promastigota. Essa variação da frequência de cães soropositivos dentre os estudos, pode ser explicada pelas características epidemiológicas particulares de cada área, dentre elas as condições sanitárias, habitações, e a densidade de flebotomíneos. Muitas vezes leva ao questionamento sobre a validade da sorologia nos inquéritos epidemiológicos para LTA, mas a falta de um antígeno específico a exemplo do que acontece para LVA.

O exame sorológico através das técnicas de RIFI e ELISA já está bem consolidado em inquéritos caninos para a detecção de anticorpos contra o agente da leishmaniose visceral, apresentando altas taxas de sensibilidade e especificidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a). Apesar do uso destas técnicas sorológicas não ser preconizado pelo Ministério da Saúde para a detecção de anticorpos contra os agentes da LTA, alguns autores (SANTOS et al., 2005; SILVEIRA et al., 2006; VELÁSQUEZ et al., 2006; ZANZARINE et al., 2005) as tem utilizado, sendo relatada a presença de cães com sorologia positiva em áreas endêmicas, evidenciando que os parasitos podem estar induzindo uma resposta humoral nos animais.

Quando comparamos diferentes espécies de *Leishmania* como antígenos na RIFI, observamos que o grau de concordância global entre os resultados mostraram percentuais similares, demonstrando que nenhum dos antígenos testados apresentou-se como espécie-específico para o sorodiagnóstico da LTA em cães.

Baleeiro et al. (2006), em Jequié, estado da Bahia, demonstraram que o antígeno pode influenciar significativamente nos resultados dos testes para o diagnóstico e avaliação da resposta imune de cães. Esses autores, ao realizarem uma investigação em área endêmica para LVA, relataram que conseguiram melhores resultados para a detecção de IgG em soros de cães com LVA quando o antígeno homólogo de *L. (L.) infantum chagasi* foi utilizado, ao invés dos antígenos heterólogos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Contudo, quando Ribeiro et al. (2007), no Rio de Janeiro, avaliaram a detecção das subclasses de IgG por

ELISA, comparando os antígenos *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (V.) braziliensis*, objetivando melhorar o desempenho do ensaio para o diagnóstico de LTA em cães, obtiveram maior detecção de IgG, IgG1 e IgG2 em soro de cão com LTA quando o antígeno homólogo de *L. (V.) braziliensis* foi usado. Tudo indica que a utilização de antígenos homólogos aumenta a eficiência de detecção de imunoglobulina anti-*Leishmania* o que pode ser de grande valia para o propósito de diagnóstico.

Em regiões onde a LVA é endêmica, antígenos de *L. (L.) infantum chagasi* são os mais indicados para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, entretanto, em regiões endêmicas de LTA, onde é comum a presença de diferentes espécies de *Leishmania*, como no estado do Pará, então nesses casos seria recomendado o uso de diferentes antígenos, visto que a utilização de antígenos homólogos só seria possível com a informação prévia da espécie responsável pela infecção. Isso tornaria o serviço bem mais laborioso e de alto custo.

Durante a padronização do protocolo da RIFI com as espécies selecionadas na forma promastigota, foram realizados testes em paralelo com antígenos de *L. (L.) infantum chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, na forma amastigota, que tem demonstrado índices elevados de sensibilidade e especificidade para diagnóstico da LVA em Belém, no Estado do Pará (DE JESUS et al., 2003; LIMA et al., 2004).

Reações inespecíficas observadas nos antígenos da forma promastigota foram solucionadas com o uso de soro de equino a 2,5%. O soro foi adicionado antes de adicionar os soros caninos para bloquear a reação inespecífica, eliminando assim, reações com proteínas que competem com os anticorpos secundários nos sítios de adesão diminuindo as chances de reações indesejáveis.

O kit de RIFI para o diagnóstico da LVC, produzido por Bio-Manguinhos, utiliza como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major-like* (MHOM/BR/76/JOF) (LIRA et al., 2006). Este kit tem demonstrado uma menor eficiência no diagnóstico da LVC, pois tem apresentado reações falso positivas (DE JESUS et al., 2003). Silva (2005), na tentativa de aperfeiçoar os testes sorológicos empregados no programa de controle da LVC, trabalhou com amostras de soro de cães de área endêmica para LVA, com diagnóstico clínico e parasitológico positivo. O autor utilizou o kit produzido por Biomanguinhos e antígeno de *L. (L.) infantum chagasi* na forma promastigota. O teste realizado com o antígeno de *L. (L.) infantum chagasi* mostrou-se capaz de separar todos os verdadeiros negativos dos

verdadeiros positivos, no entanto, o kit de Biomanguinhos apresentou uma eficiência de 60% a 76%.

Os parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos das técnicas sorológicas são de extrema importância para se evitar resultados falsos positivos ou negativos. O kit de RIFI para o diagnóstico da LVC, produzido por Bio-Manguinhos tem evidenciado baixa especificidade e alta fração de falso positivos, provavelmente, isto vem ocorrendo devido a espécie de *Leishmania* utilizada, como antígeno não ser específica para o diagnóstico da LVA canina. Segundo Badaró et al. (1996), a melhor forma para melhorar a especificidade dos testes sorológicos é o uso de antígenos específicos.

Para descartar possíveis reações cruzadas com outras infecções, todos os antígenos, de formas promastigotas, foram testados com soros de cães infectados com *Ehrlichia* sp. e *Babesia* sp., não sendo evidenciada reatividade cruzada. Lira et al. (2006) obtiveram resultado semelhante ao testar soros de cães com babesiose utilizando os kits Bio-Manguinhos de ELISA e RIFI.

Oliveira et al. (2008) utilizaram amostras de soro canino provenientes de área endêmica (Belo Horizonte) e não endêmica (Jaboticabal) de LVA, para verificar a existência de reação cruzada entre os agentes da LVA, erliquiose e babesiose, por meio da RIFI e ELISA, utilizando antígenos de *Leishmania* sp. na forma promastigota. Todos os soros provenientes de área endêmica foram positivos para *Leishmania* sp. pelo ELISA e RIFI, 51% para *Babesia canis* e 43% para *Ehrlichia canis* pela RIFI. A cidade de Belo Horizonte é endêmica para as três doenças, por esse motivo os autores sugerem a presença de uma co-infecção entre os três parasitos e não a reação cruzada entre eles, nos testes sorológicos de RIFI e ELISA descritos. Pela RIFI, nenhum dos soros provenientes de área não endêmica foi positivo para *Leishmania* sp, sendo 67% positivos para *B. canis* e 78% para *E. canis* pelo mesmo teste, sendo rejeitada a possibilidade da presença de reação cruzada, visto que até o momento não existem relatos de casos de LVA em Jaboticabal. Quando testados pelo ELISA para *Leishmania* sp., quatro soros da área não endêmica foram positivos. Estes foram retestados pelo ELISA e pela RIFI e um resultado negativo foi obtido.

No presente estudo, não foi possível realizar o teste com soro de cão infectado por *Trypanosoma cruzi* e *Dirofilaria* sp., devido a indisponibilidade dos soros. Porém, quando Luciano et al. (2009) avaliaram as reações cruzadas entre os

antígenos de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi*, em Bauru, São Paulo observaram que, em 150 soros de cães positivos para LVC de Bauru, apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* spp. e anti-*T. cruzi*, demonstrando um grande número de reações cruzadas nesses animais, necessitando portanto de confirmação diagnóstica pela detecção específica do DNA do parasito.

Zanette (2006) utilizou o antígeno de *L. (L.) infantum chagasi*, na forma promastigota, na RIFI e no ensaio de ELISA para o diagnóstico sorológico de cães positivos parasitologicamente para LVC. Com relação à ocorrência de reações cruzadas, das 14 amostras de soro positivas para doença de Chagas, 64,3% (9/14) foram consideradas positivas pelo ELISA e 42,9% (6/14) pela RIFI; das 13 amostras de soros de animais portadores de erliquiose, 7,7% (1/13) apresentaram resultado positivo pelo ELISA, das seis amostras de soro de cães apresentando co-infecção por erliquiose e babesiose, 83,3% (5/6) foram positivas pela técnica de ELISA, não sendo observados resultados positivos pela RIFI e das 12 amostras de soros de cães com babesiose nenhuma apresentou reação positiva pelos testes empregados. O autor concluiu que a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* depende não somente da sensibilidade e especificidade, do teste utilizado, mas também do conhecimento da ocorrência de reações cruzadas com outros agentes etiológicos.

Souza et al. (2009) avaliaram a ocorrência da infecção natural por *T. cruzi* em cães do município de Jaquari, Mato Grosso do Sul e utilizaram os testes de RIFI e ELISA em 75 cães residentes na área. A fim de avaliar a possível ocorrência de reação cruzada com anticorpos anti-*Leishmania*, também foi realizada RIFI utilizando antígeno de *L. (L.) infantum chagasi*. Dos 75 cães, 45,3% (34/75) foram sororeagentes para *T. cruzi* na RIFI e 24,0% (18/75) no ELISA, sendo que 22,7% (17/75) foram considerados positivos, pois foram positivos nos dois testes. Dos 17 cães positivos, 58,8% (10/17) também apresentaram reatividade na RIFI para anticorpos anti-*Leishmania*. Os autores concluíram que embora nenhum cão revelasse sinais clínicos de leishmaniose, existe uma alta probabilidade de uma reatividade cruzada ou a presença concomitante dos dois parasitos.

A utilização da PCR, no presente estudo, revelou que 74 (33,04%) cães estavam positivos apresentando DNA de *Leishmania*, dos quais, somente 29 apresentaram RIFI reagente, com títulos variando entre 40 a 1.280. Em 2003, quando Reithinger et al. realizaram um estudo no Peru, detectaram, no sangue de 52 cães, DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, porém com sorologia negativa.

E no Paraná, no município de Mariluz, Velasquez et al. (2006), também detectaram presença de DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em nove cães que apresentaram RIFI negativa. Os autores comentaram que embora estes cães estivessem infectados, ainda teriam que desenvolver uma resposta imune à infecção, o que possivelmente foi o caso dos cães que avaliamos, apesar de não conhecermos quando esses cães adquiriram a infecção.

Observou-se ainda, que dos 150 cães que apresentaram PCR negativa, 89 foram reagentes na sorologia, e segundo Riera et al. (2004) um resultado positivo por técnicas sorológicas não representa uma infecção ativa, podendo estar relacionada com a detecção de memória imunológica na ausência do parasito. Assim, a comparação dos resultados obtidos pela sorologia e pela técnica de PCR mostrou uma concordância fraca entre os dois testes, de 40,18%.

Quanto à presença de lesão, dos 224 cães apenas 18 apresentaram lesões sugestivas à doença, sendo cinco confirmados pelo parasitológico direto. No entanto, o alto índice de cães com presença de DNA de *Leishmania* sp. no sangue de cães sem sinais clínicos fornece uma evidência de que o cão pode apresentar um papel como reservatórios em potencial das espécies causadoras da LTA em domicílios humanos, implicando que os cães infectados são portadores silenciosos do parasito e uma fonte de infecção para os flebotomíneos.

Ao realizar a PCR utilizando os iniciadores S1629 e S1630, que amplificam gene de Mini-exon, em todas as áreas trabalhadas foi encontrado um maior número de cães infectados por *Leishmania* do subgênero *Viannia* do que infectados por *L. (L.) amazonensis*. Duas amostras que apresentaram bandas inespecíficas sugestivas de infecção mista por *Leishmania* do subgênero *Viannia* e de *L. (L.) amazonensis* foram testadas com os marcadores, B1 e B2 (DE BRUIJIN E BARKER, 1992) e M1 e M2 (ERESH et al., 1994), que detectam genes de kDNA das espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e de *L. (L.) amazonensis*, respectivamente. A amplificação do fragmento de aproximadamente 700pb confirmou a infecção mista por essas duas espécies nos cães provenientes do Assentamento Nova Vida (Ulianópolis) e Comunidade Santa Helena (Rondon do Pará).

Madeira et al. (2006) relataram o primeiro caso de co-infecção com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* chagasi em um cão naturalmente infectado do Rio de Janeiro. A análise da PCR confirmou a presença de DNA de *L. (V.) braziliensis* na

lesão cutânea e de DNA de *L. (L.) infantum chagasi* no baço e nos fragmentos dos linfonodos.

Em humanos, a presença de infecção mista já havia sido relatada por Silveira et al. (1984), em um paciente, sendo determinada por duas espécies distintas de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*.

Relatos sobre infecção mista em humanos são raros, porém a detecção em dois cães do estudo enfatiza a importância da identificação de espécies de *Leishmania* que infectam cães em áreas endêmicas.

A investigação dos cães residentes nas localidades rurais demonstrou que apenas cinco foram positivos na pesquisa direta, todos apresentaram escassez de parasito, exceto em um cão do Assentamento Nova Vida (Ulianópolis), que apresentou grande quantidade de parasito, porém, não foi possível realizar a identificação da espécie por anticorpos monoclonais ou isoenzimas, devido à inviabilidade das culturas. Desses apenas dois cães apresentaram PCR positiva. A baixa positividade na PCR possivelmente ocorreu devido às espécies de *Leishmania* dermatrópicas localizarem-se principalmente na pele, local da infecção. A baixa sensibilidade da pesquisa direta do parasito pode ser consequência da irregularidade na distribuição ou escassez do parasito nas lesões (MARCO et al., 2001; MENGISTU et al., 1992). Nos casos de LTA causada por espécies do subgênero *Viannia*, a escassez de parasitos na lesão é uma característica comum, o que torna a confirmação parasitológica pelo exame direto ainda mais difícil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a).

Dois cães negativos pela pesquisa direta do parasito apresentaram PCR positiva, indicando que ocorreu a disseminação hematogênica do parasito (WEIGLE E SARAVIA, 1996), permitindo a detecção do DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* no sangue do cão.

Observou-se que dos 206 cães que não apresentaram lesão, 105 (50,97%) foram sorologicamente positivos. A presença de cães sem lesão e com sorologia positiva em áreas endêmicas também tem sido reportada por outros autores (MADEIRA et al., 2000; SANTOS et al., 2005).

Barbosa et al. (1999) que consideram como infectados aqueles cães que foram reagentes a pelo menos uma das técnicas sorológicas utilizadas (ELISA e RIFI), afirmaram que a inexistência de lesões suspeitas em cães de áreas endêmicas de LTA humana não significa ausência da infecção canina. E, no entanto,

a possibilidade de que a sorologia positiva do cão é consequência de infecção antiga, não deve ser descartada.

Durante este estudo foi realizado o levantamento da fauna flebotomínea, onde foram capturados exemplares de *Lutzomyia whitmani*, nos três municípios e *Lutzomyia flaviscutellata* no município de Dom Eliseu (dados não publicados). *Lutzomyia whitmani* é uma espécie de ampla distribuição na América do Sul e no Brasil, desenvolveu hábito antropofílico e ocorre em ambientes peridomésticos e intradomiciliares, sendo incriminada na transmissão de *L. (V.) shawi* no Estado do Pará (LAINSON et al., 1994). Enquanto que a espécie *L. flaviscutellata* é conhecida como vetora de *L. (L.) amazonensis*, que vem adaptando-se não só às áreas de vegetação secundária (capoeira), como ao ambiente domiciliar (REBÊLO et al., 1999).

A presença de vetores de *Leishmania* spp. nas áreas estudadas parece criar ambientes favoráveis à manutenção do ciclo destes agentes e possibilitar a transmissão para o homem e para os animais domésticos.

Apesar da detecção de cães com infecção por *Leishmania* sp., a investigação demonstra que o parasito está circulando nas áreas onde o estudo foi realizado. Contudo, nas regiões endêmicas de LTA no estado do Pará, ainda não está elucidado se o cão tem um papel na manutenção do parasito ou se a infecção é acidental. Futuros estudos sobre a infecção em cães, bem como o acompanhamento desses animais e a investigação da infecção em vetores poderão ajudar a esclarecer o papel do cão no ciclo de transmissão dos agentes da LTA.

8 CONCLUSÃO

- Considerando os altos índices de soropositividade (52,68%) encontrados, ressalta-se a necessidade da utilização de testes diagnósticos mais específicos para estudos na área, a fim de esclarecer a real prevalência da infecção, estabelecer a epidemiologia e identificar o papel do cão na transmissão dos agentes da LTA.
- Apesar dos antígenos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) shawi* terem apresentado maior porcentagem de concordância global entre os resultados, não podemos afirmar qual o melhor antígeno a ser utilizado em áreas endêmicas de LTA, sendo recomendando o uso de mais de um antígeno associados a outros parâmetros para a definição do diagnóstico em cães.
- A detecção de DNA de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e DNA da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* evidencia que o parasito está circulando nas áreas onde o estudo foi realizado.
- Apesar da detecção de DNA do parasito em sangue circulante, ainda não se pode implicar que os cães apresentam um papel como reservatórios em potencial das espécies causadoras da LTA, necessitando assim, maiores estudos para esclarecer o papel do cão no ciclo de transmissão dos agentes da LTA.

REFERÊNCIAS

- ALESSI, C.A.C.; GALATI, E.A.B.; ALVES, J.R.; CORBETT, C.E.P. American cutaneous leishmaniasis in the pontal of Paranapanema – SP, Brazil: ecological and entomological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, n.5, p.277-282, Sep-Out., 2009.
- ALEXANDER, J.; RUSSEL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v.31, p.175-254, 1992.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSEL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v.112, p.2993-3002, 1999.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; FARIA, R.P.; PIMENTEL, M.F.A.; DAHROUG, M.A.A.; TURBINO, N.C.M.R.; SOUSA, V.R.F. Inquérito soroepidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n.2, p.156-159, Mar-Abr., 2009.
- ALMEIDA, G.F. **Leishmanioses visceral e tegumentar canina: revisão da literatura**. 2006. 63f. Monografia (pós-graduação “Latu Sensu” em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais). Universidade Castelo Branco. Campo Grande. Mato Grosso do Sul.
- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F. (Org). Avaliação de testes diagnósticos. In: _____. **Métodos De Investigação Epidemiológica Em Doenças Transmissíveis**: volume 1. Brasília: OPAS: FNS, 1997. p. 9-30.
- ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; ARRUDA, C.C.P.; SANTOS, M.F.C.; ROCCA, M.E.G.; AQUINO,R.B. Epidemiological study on leishmaniasis in an

area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n. 5, p.488-493, Out., 2009.

ANDRADE, B.B.; BOAVENTURA, V.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v.75, n.1, p.75-82, Jan-Jun., 2005.

ARIAS, JR; MONTEIRO, P.; ZICKER, F. The re-emergence of visceral leishmaniasis in Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v.2, p.145-146, 1996.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, S.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.173, p.758-61, 1996.

BALEEIRO, C.O., PARANHOS-SILVA, M., DOS SANTOS, J.C., OLIVEIRA, G.G.S., NASCIMENTO, E.G., DE CARVALHO, L.P., DOS-SANTOS, W.L.C. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.21-28, 2006.

BARBOSA, G.M.S.; MARZOCHI, M.C.A.; MASSARD, C.L.; LIMA, G.O.S.; CONFORT, E.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.15, n.3, p.641-646, Jul-Set., 1999.

BARRETTO, A.C.; CUBA, C.C.; VEXENAT, J.A.; ROSA, A.C.; MARSDEN, P.D.; MAGALHÃES, A.V. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia. II. Leishmaniose canina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.17, p.59-65, 1984.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

COUTINHO, S.G.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.P.A.; TRAMONTANO, N. A survey for american and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from áreas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.80, p.17-22, Jan-Mar., 1985.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting Paradigms of Epidemiology and Control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.54-60, 2006.

DE BRUIJIN, M.H.L., BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v.52, p.45-58, 1992.

DE JESUS, J.R.; ARAÚJO, F.A.P.; SPALDING, S.; TIECHER, F. Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania* spp. na população canina em região de foco de leishmaniose tegumentar americana na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.61, p.121-125, 2006.

DE JESUS, R.C.S.; CORRÊA, Z.C.; EVERDOSA, D.R.; MARTINS, A.P.; ELISEU, L.S.; CAMPOS, M.B.; JENNINGS, V.L.L.; ISHIKAWA, E.A.Y.; DE SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T. Comparação das técnicas de RIFI (Ag.IEC x Ag. Bio-manguinhos) e ELISA no sorodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, Suplemento I, 2003.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, p. 463-469, 1994.

DIAS, E.S.; FRANÇA-SILVA, J.C.; SILVA, J.C.; MONTEIRO, E.M.; PAULA, K.M.; GONÇALVES, C.M.; BARATA, R.A. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, n.1, p.49-52, Jan-Fev., 2007.

DIAS, M.; MAYRINK, W.; DEANE, L.M.; DA COSTA, C.A.; MAGALHÃES, P.A.; MELO, M.N.; BATISTA, S.M.; ARAÚJO, F.G.; COELHO, M.V.; WILLIAMS, P. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana: I- Estudo dos reservatórios em área endêmica no estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.19, p.403-410, 1977.

ERESH, S., McCALLUM, S.M., BARKER, D.C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, v.109, p.423-433, 1994.

FAGUNDES, A.; MARZOCHI, M.C.A.; FERNANDES, O.; PEREZ, M.A.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MOUTA-CONFORT, E.; MARZOCHI, K.B.F. 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.; COURA, J.R.; BARROS, G.C.; GRIMALDI, G.F.; SESSA, P.A.; CARIAS, V.R.D.; JESUS, A.C.; ALENCAR, J.T.A. 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.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; VAREJÃO, J.B.M.; BARROS, G.C.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR, G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo

State, Brazil. Further evidence of the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, p.499-500, 1991.

FERNANDES, O.; MURTHY, V. K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W. M.; CAMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.66, p.261-271, 1994.

FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, A.S.; GREMIÃO, I.D.F.; NASCIMENTO, L.D.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, T.M.P. Leishmaniose tegumentar americana em felino doméstico no município do Rio de Janeiro: relato de caso. **Veterinary Clinic**, v.74, p.58-60, 2008.

FORATTINI, O.P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.2, p.195-203, 1960.

FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.161-173, 2003.

GARCIA, F.C.B.; SANTOS, S.S.R.; CHOCIAY, F.; MEDEIROS, A.C.R.; ROSELINO, A.M.F. Subsidiary methods for the diagnosis of american tegumentar leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of *Leishmania* species in skin samples. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, n.3, p. 339-344, 2005.

GENARO, ODAIR; REIS, ALEXANDRE BARBOSA. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. In: NEVES, David Pereira (Org.) Parasitologia Humana. São Paulo, SP: Atheneu, 2005. 11. Ed. p.41-46.

GONTIJO, B; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n.1, p.71-80, Jan-Fev, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338, 2004.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**. v.6, n.3, p. 230-250, Jul., 1993.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G.H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L.B.; SANTRICH, C.V.; SARAIVA, N.G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.45, p. 281-289, 1991.

HEUSSER JÚNIOR, A.; BELLATO, V.; SOUZA, A.P.; MOURA, A.B.; SARTOR, A.A.; SANTOS, E.G.B.; SILVA, V.L. Canine tegumentar leishmaniasis in the town of Balneario Camboriu in the State of Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n.6, p.713-718, Nov-Dez, 2010.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Review of Microbiology**, v.21, n.2, p.123-152, 1995.

LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v.11, n.1, p.29-40, 1997.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, n.2, p.13-32, Dez., 2010.

LAINSON, R., SHAW, J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v.44, p.94-106, 1992.

LAINSON, R., SHAW, J. **Evolution, classification and geographical distribution**. In: W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology*. London, Academic Press, 1987, v.1, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, p.435-443, 1994.

LIMA, L.V.R.; DE SOUZA, A.A.; JENNINGS, Y.L.; CORRÊA, Z.J.; DE JESUS, R.S.; EVERDOSA, D.R.; AYRES, M.; SILVEIRA, F.T. Avaliação da sensibilidade e especificidade entre antígenos de *Leishmania (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *Leishmania* sp. (Bio-Manguinhos) no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral através da reação de imunofluorescência indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.37, suplemento I, 2004.

LIMA, M.S.C. JR.; ANDREOTTI, R.; DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.G.; MATOS, F.C. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n.3, p.303-308, maio-junho, 2009.

LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C.; SOUZA, W.V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE- leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI- leishmaniose-visceralcanina-Bio-Manguinhos kits, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.137, agosto, pp. 11-16, 2006.

LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V.; ALVES, W.A.; MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; MEMBRIVE, U.A.; MEMBRIVE, N.A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P.D.;

ISHIKAWA, E.; TEODORO, U. Leishmaniose tegumentar americana humana e canina no Município de Mariluz, Estado do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.12, p.2713-2716, dez, 2006.

LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; ARRAES, S.M.A.A.; SILVEIRA, T.G.V.; BERTOLINE, D.A.; ISHIKAWA, E.A.Y.; SHAW, J.J. Nota sobre Leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.27, p.378-379, 1993.

LUCIANO, R.M.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.46, n.3, p.181-187, 2009.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A., SCHUBACH, T.M.; PACHECO, R.S.; OLIVEIRA, F.S.; PEREIRA, S.A.; FIGUEIREDO, F.B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M.C. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n.5, p.442-5, May., 2006.

MADEIRA, M.F.; SERRA, C.M.B.; UCHOA, C.M.A.; DUARTE, R.; CRUZ, D.A.M.; PERDOMO, C.C. Leishmaniose canina: avaliação sorológica de 310 cães na região de Itaipu, Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, p.568, 2000.

MADEIRA, M.F.; UCHÔA, C.M.A.; LEAL, C.A.; SILVA, R.M.M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SERRA, C.M.B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, p.551-555, 2003.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, v.158, p.274–287, 2008.

MARCO, J.D.; PADILHA, A.M.; DIOSQUE, P.; FERNANDEZ, M.M.; MALCHIODI, E.L.; BASOMBRIO, M.A. Force of infection and evolution of lesions of canine tegumentary leishmaniasis in Northwestern Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p.649-52, 2001.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, suppl.2, p.S359-S375, Jul., 1994.

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, supl. 1, 2004.

MENGISTU G, AKUFFO H, FEHNINGER TE, NEGESE Y, NILSEN R. Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in

Ethiopia. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p.154-157, 1992.

MESTRE, G.L.C.; FONTES, C.J.F. A expansão da epidemia de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, p.42-48, 2007.

MICHALICK, Marilena Suzan Marques. **Gênero *Leishmania***. In: NEVES, David Pereira (Org.) Parasitologia Humana. São Paulo, SP: Atheneu, 2005. 11. ed. p.41-46.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília, DF, 2006b. 136p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Tegumentar America. In: **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: MS, 2000. 62p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Caderno 11. Brasília, DF: MS, 2009a. p.640-668.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª Ed. Atual – Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180p.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema Nacional de Vigilância em saúde: Relatório de situação, Pará** – Brasília, DF, 2009b. 67p.

MISSAWA, N.A.; VELOSO, M.A.E.; MACIEL, G.B.M.L.; MICHALSKY, E.M.; DIAS, E.S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.44, n.1, p.76-78, Jan-Fev, 2011.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.2, p.147-152, Mar-Abr., 2005.

MONTEIRO, S.G.; STAINKI, D.R.; DALMOLIN, F.; BRACCINI, E.T.; PINTO-FILHO, S.T.L.; GAIRA, M.S.; MELLO, F.P.S.; QUARESMA, P.F.; GONTIJO, C.M.F. Detecção de *Leishmania infantum* em cão no município de Uruguaiana, RS: uma contribuição para a discussão das leishmanioses na Região Sul do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.4, p. 497-501, Dez., 2010.

MOURA, S.T.; FERNANDES, C.G.N.; PANDOLPHO, V.C.; SILVA, R.R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato

Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, p.101-102, 1999.

OLIVEIRA, M.A.P.; PIRES, A.S.; BASTOS, R.P.de; LIMA, G.M.C.A.; PINTO, S.A.; PEREIRA, L.I.A.; PEREIRA, A.J.C.S.; ABRAHAMSOHN, I.A.; DORTA, M.L.; RIBEIRO-DIAS, F. *Leishmania* spp. Parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.52, n.2, p.83-88, Mar-Abr., 2010.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y.N.; REBÊLO, J.M.M.; MORAES, J.L.P.; PEREIRA, S.R.F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp. na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.6, p.540-543, Nov-Dez., 2006.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURURA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z.. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.7-11, 2008.

PASSOS, V.M.A.; ASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.F.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, n.1, p.19-20, 1996.

PIMENTA, P.F.; TURCO, S.J.; McCONVILLE, M.J.; LAWYER, P.G.; PERKINS, P.V.; SACKS, D.L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v.256, p.1812-1815, 1992.

PIRMEZ, C.; COUTINHO, S.G.; MARZOCHI, M.C.A.; NUNES, M.P.; GRIMALDI, G. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.38, p.52-58, 1988.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Ecologia das Leishmanioses**. In: RANGEL, Elizabeth F.; Lainson, Ralph. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2003. 368p.

REBÊLO, J. M.; ARAÚJO, J.; CARVALHO, M.; OLIVEIRA, S. T. & SILVA, F. S., 1999. Flebotomos (*Lutzomyia*, Phlebotominae) da Ilha de São Luís, zona do Golfão maranhense, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32:247-253.

REIS, H.R.; LOPES-MORI, F.M.R.; REIS, C.R.; FREIRE, R.L.; MARANA, E.R.M.; CHRYSSAFIDIS, A.L.; TEDIM, A.V.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; CASTRO, E.A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; NABUT, L.B. NAVARRO, I.T. Seroprevalence of Cutaneous Leishmaniasis (LC) in dogs and identification of vectors (*Diptera:Psychodidae*) in Bela Vista do Paraíso, Paraná State. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1083-1094, jul/set. 2011.

REIS, L.C.; BRITO, M.F.; SOUZA, M.A. PEREIRA, V.R.A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n.2, p.103-115, Mai-Ago., 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.9, p.581-96, Sep., 2007.

REITHINGER, R.; ESPINOZA, J.C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C.R. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1486-93, 2003.

REY, Luís. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara-Koogan, 2002. 2ª. ed. p.50-60.

RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH, A.O.; MOUTA-CONFORT, E.; SCHUBACH, T.M.P.; MADEIRA, M.F.; MARZOCHI, M.C.A. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.200–206, 2007.

RIERA, C.; FISA, R.; UDINA, M.; GÁLLEGO, M.; & PORTUS, M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 102–110, 2004.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by *Leishman* and Donovan. **British Medical Journal**, v.2, p.1261-1401, 1903.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.1, p.383-395, 1987.

SAMBROOK, D. S.; JOPLING, W. H. The classification of leprosy for research purposes. **Leprosy Review**, v.33, p.119-128, 1989.

SANGIONE, L.A.; GEBARA, C.M.S.; ARAGÃO, G.M.; BEZERRA, C.A.A.; ALMEIDA, C.C. Busca ativa de casos de leishmaniose cutânea em humanos e cães em área periférica do município de Campo Mourão - PR, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1492-1494, Set-Out, 2007.

SANTOS, E.G.O.B.; MARZOCHI, M.C.A.; CONCEIÇÃO, N.F.; BRITO, C.M.M.; PACHECO, R.S. 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, p.41-47, 1998.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A.; SANTOS, E.G.O.B.; SILVA, V.L.; PACHECO, R.S.; MOUTA-CONFORT, E.; ESPINDOLA, C.B.; SOUZA, M.B.;

PONTE, C.S.; CONCEIÇÃO, N.F.; ANDRADE, M.V. 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**, Uberaba, v.38, n.2, p.161-6, 2005.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; HOFFMANN, M.P.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A.F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, p.315-317, 1998.

SERRA, C. M. B.; LEAL, C.A.; FIGUEIREDO, F.; SCHUBACH, T.M.; DUARTE, R.; UCHÔA, C.M.A.; SILVA, R.M.M.; MADEIRA, M.F. Leishmaniose tegumentar canina em Morada das Águias (Serra da Tiririca), Marica, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.6, p.1877-1880, Nov-Dez., 2003.

SESSA, P.A.; FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M. Tentativa de controle da leishmaniose tegumentar americana por meio do tratamento dos cães doentes. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, p.457-463, 1994.

SILVA, A.F.; LATORRE, M.R.D.O.; GALATI, E.A.B. Fatores relacionados à ocorrência de leishmaniose tegumentar no Vale do Ribeira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n.1, p.46-51, Jan-Fev., 2010.

SILVA, M.R. **Estudo comparativo entre os métodos de ELISA e RIFI na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para LVC**. 2005. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. São Paulo.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A.Y., DE SOUZA, A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v.9, p.43- 50, 2002.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonia Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.3, p.239-251, May., 2004.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; RIBEIRO, R.S.M. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmanias: *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.26, n.5, p.272-275, Set-Out., 1984.

SILVEIRA, F.T.; MULLER, S.R.; SOUZA, A.A.A.; LAISON, R., GOMES, C.M.C.; LAURENTI, C.E.P., CORBERTT, C.E.P. Review of the pathogenesis of the american tegumentary leishmaniasis in Amazonian, with emphasis to the disease due to *Leishmania (V.) brasiliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v.22, n.1, Jan- Mar, 2008.

SILVEIRA, F.T.; SHAW, J.J.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the state of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.82, p.289- 292. 1987.

SILVEIRA, T.G.; TEODORO, U.; LONARDONI, M.V.C.; TOLEDO, M.J.O.; BERTOLINE, D.A.; ARRAES, S.M.A.A.; VEDOVELLO FILHO, D. Investigação sorológica em cães de área endêmica de leishmaniose tegumentar, no estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cadernos Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.12, p.89-93, 1996.

SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T.; LAISON, R.; BARATA, I.R.; SILVA, M.G.S.; LIMA, J.A.N.; PINHEIRO, M.S.B.; SILVA, F.M.M.; VASCONCELOS, L.S.; CAMPOS, M.B.; ISHIKAWA, E.A.Y. Fauna flebotomínica da Serra dos Carajás, Estado do Paraná, Brasil, e sua possível implica o na transmissão da leishmaniose tegumentar americana. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, n.1, p.45-51, 2010.

SOUZA, A.I.; BARROS, E.M.S.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I.M.N.; MARIN, G.R.B.; NUNES, V.L.B. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.128, n.1-2, p.41-5, 2005.

SOUZA, A.I.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; CAMACHO, A.A. Soroprevalência da infec o por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.2, p.150-152, Fev., 2009.

SOUZA, A.L.; V.L.B.; BORRALHO, V.M.; ISHIKAWA, E.A.Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. **Jornal of Venomous Animals Toxins including Tropical Disease**, v.15, n.2, p.359-365, 2009.

SOUZA, N.P.; ALMEIDA, A.B.P.F.; FREITAS, T.P.T.; PAZ, R.C.R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R.F. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 3, p.333-335, mai-jun, 2010.

UCHÔA, C.M.; SERRA, C.M.B.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C.M.; SILVA, R.M.; THEOPHILO, F.; FIGLIUOLO, L.P.; HORTA, F.T.; MADEIRA, M.F. Aspectos sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maric , Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.34, n.6, p.563-568, Nov-Dez, 2001.

VELASQUEZ, L.G.; MEMBRIVE, N.; MEMBRIVE, U.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; TESSMANN, I.P.B.; SILVEIRA, T.G.V. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.571-578, Mar., 2006.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.433–450, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee**. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, nº 793, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, v.77, n.44, p.365-372, 2002. Disponível em: < <http://www.who.int/wer> >. Acesso em: 14/02/2011.

ZANZARINE, P.D.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. Canine American cutaneous leishmaniasis in municipalities of northern Paraná State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.6, p.1957-1961, Nov-Dez, 2005.

ZANETTE, M.F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araçatuba (SP).

APÊNDICE A

QUADRO 2 – Resultado da análise de 102 soros de cães de localidades rurais do município de Ulianópolis

<i>Amostra</i>	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
1	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	160	320	320	320
3	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
4	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
5	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
6	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
7	40	80	80	80
8	40	80	80	80
9	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
10	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
12	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
13	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
14	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
15	80	160	80	80
16	Não Reagente	40	Não Reagente	40
17	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
18	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
19	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
20	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
21	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
22	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
23	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

QUADRO 2 – Resultado da análise de 102 soros de cães de localidades rurais do município de Ulianópolis (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
24	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
25	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
26	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
27	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
28	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
29	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
30	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
31	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
32	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
33	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
34	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
35	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
36	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
37	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	40
38	160	160	640	320
39	320	320	640	320
40	40	40	Não Reagente	80
41	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	40
42	160	160	160	160
43	40	40	40	40
44	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
45	1280	1280	1280	1280
46	320	320	320	320

QUADRO 2 – Resultado da análise de 102 soros de cães de localidades rurais do município de Ulianópolis (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
47	40	40	40	40
48	Não Reagente	40	Não Reagente	Não Reagente
49	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
50	80	80	80	80
51	80	80	40	160
52	320	320	320	640
53	40	40	Não Reagente	40
54	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
55	40	40	40	40
56	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
57	40	40	Não Reagente	40
58	640	640	320	640
59	320	320	320	320
60	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
61	40	40	40	40
62	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
63	320	320	640	320
64	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
65	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
66	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
67	40	40	80	80
68	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
69	40	40	40	40

QUADRO 2 – Resultado da análise de 102 soros de cães de localidades rurais do município de Ulianópolis (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
70	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
71	320	320	320	320
72	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
73	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	40
74	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
75	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
76	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
77	40	40	40	40
78	40	40	Não Reagente	40
79	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
80	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
81	80	80	80	160
82	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
83	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
84	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
85	40	40	40	80
86	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
87	Não Reagente	40	80	40
88	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
89	Não Reagente	40	40	40
90	160	160	80	80
91	320	320	160	320

QUADRO 2 – Resultado da análise de 102 soros de cães de localidades rurais do município de Ulianópolis (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
92	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
93	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
94	160	160	320	320
95	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
96	Não Reagente	40	40	Não Reagente
97	40	40	40	80
98	320	160	160	320
99	40	40	40	80
100	320	320	640	320
101	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
102	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

APÊNDICE B

QUADRO 3 – Resultado da análise de 70 soros de cães de localidades rurais do município de Dom Eliseu

<i>Amostra</i>	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
1	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	80	40	40	80
3	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
4	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	40
5	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
6	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
7	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
8	Não Reagente	Não Reagente	40	40
9	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
10	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	Não Reagente	40	40	40
12	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
13	640	640	640	640
14	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
15	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
16	Não Reagente	Não Reagente	80	80
17	Não Reagente	80	40	80
18	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
19	Não Reagente	Não Reagente	80	Não Reagente
20	Não Reagente	160	80	40
21	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
22	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
23	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

QUADRO 3 – Resultado da análise de 70 soros de cães de localidades rurais do município de Dom Eliseu (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
24	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
25	40	80	40	40
26	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
27	80	40	40	80
28	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
29	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
30	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
31	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
32	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
33	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
34	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
35	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
36	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
37	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
38	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
39	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
40	Não Reagente	Não Reagente	40	40
41	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
42	Não Reagente	80	40	40
43	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
44	Não Reagente	40	80	80
45	Não Reagente	Não Reagente	40	40

QUADRO 3 – Resultado da análise de 70 soros de cães de localidades rurais do município de Dom Eliseu (Continuação)

Amostra	L.(L.) <i>chagasi</i>	L. (V.) <i>braziliensis</i>	L. (L.) <i>amazonensis</i>	L. (V.) <i>shawi</i>
46	Não Reagente	40	40	40
47	Não Reagente	40	40	80
48	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
49	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
50	Não Reagente	40	40	40
51	Não Reagente	40	80	Não Reagente
52	Não Reagente	40	Não Reagente	Não Reagente
53	Não Reagente	80	160	80
54	Não Reagente	Não Reagente	40	80
55	80	80	80	80
56	Não Reagente	40	40	40
57	Não Reagente	40	Não Reagente	Não Reagente
58	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
59	Não Reagente	Não Reagente	40	40
60	Não Reagente	40	80	40
61	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	40
62	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
63	Não Reagente	40	40	40
64	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
65	40	40	40	80
66	160	320	160	80
67	Não Reagente	40	40	80
68	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
69	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

QUADRO 3 – Resultado da análise de 70 soros de cães de localidades rurais do município de Dom Eliseu (Continuação)

<i>Amostra</i>	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
70	Não Reagente	80	Não Reagente	Não Reagente

APÊNDICE C

QUADRO 4 – Resultado da análise de 52 soros de cães de localidades rurais do município de Rondon do Pará

<i>Amostra</i>	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
1	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
3	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
4	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
5	160	160	160	160
6	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
7	40	40	80	40
8	80	80	40	80
9	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
10	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
11	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
12	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
13	640	640	640	640
14	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
15	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
16	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
17	Não Reagente	40	40	40
18	80	80	160	40
19	Não Reagente	40	Não Reagente	40
20	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
21	80	80	40	40
22	40	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
23	Não Reagente	40	40	40

QUADRO 4 – Resultado da análise de 52 soros de cães de localidades rurais do município de Rondon do Pará (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
24	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
25	320	160	320	160
26	40	40	40	40
27	320	320	640	320
28	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
29	40	40	40	40
30	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
31	40	40	40	40
32	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
33	40	40	40	40
34	160	320	160	640
35	40	40	40	40
36	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
37	Não Reagente	Não Reagente	80	Não Reagente
38	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
39	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
40	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente
41	320	640	640	640
42	80	80	Não Reagente	80
43	40	40	40	40
44	40	40	40	40
45	160	160	80	80
46	40	40	40	40

QUADRO 4 – Resultado da análise de 52 soros de cães de localidades rurais do município de Rondon do Pará (Continuação)

Amostra	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
47	40	80	80	80
48	40	80	80	80
49	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
50	160	160	160	80
51	Não Reagente	40	40	40
52	Não Reagente	Não Reagente	40	Não Reagente

APÊNDICE D

QUADRO 5 - Resultados parasitológicos, sorológicos e moleculares de dezoito cães com lesões sugestivas de LTA, com respectiva localização e aspecto.

Localidades	Cão	Gênero	Lesão			Dados Laboratoriais		
			Localização	Nº	Aspecto Dermatológico	Pesquisa Direta	RIFI	PCR
Assentamento Nova Vida	1	Fêmea	Flanco esquerdo	1	Úlcera	Negativa	40	Negativa
	2	Macho	Flanco esquerdo	1	Úlcera	Negativa	NR	Negativa
	3	Fêmea	Orelha esquerda	1	Úlcera	Positiva	320	Positiva
	4	Macho	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	80	Positiva
	5	Macho	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	320	Negativa
	6	Macho	Orelha esquerda	1	Úlcera	Positiva	40	Negativa
	7	Macho	Orelha direita	1	Úlcera	Negativa	NR	Negativa
	8	Macho	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	40	Negativa
	9	Fêmea	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	320	Negativa
	10	Fêmea	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	80	Negativa
	11	Macho	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	NR	Negativa
	12	Macho	Orelha direita	1	Úlcera	Positiva	320	Negativa
Vila Rossi e Gabriel	13	Macho	Orelha direita	1	Úlcera	Positiva	320	Positiva
	14	Fêmea	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	80	Negativa
	15	Fêmea	Orelha direita	1	Úlcera	Negativa	NR	Negativa
Colônia Paraíso	16	Macho	Orelha direita	1	Úlcera	Negativa	40	Negativa
	17	Macho	Orelha esquerda	1	Úlcera	Negativa	80	Positiva
Vila Santa Lúcia	18	Macho	Orelha direita	1	Úlcera	Positiva	160	Negativa

NR= Não Reagente

ANEXO



Parecer Nº 0005/2008/CEPAN/IEC/SVS/MS

Registro CEPAN - Nº 0006/2008

Ananindeua/PA, 16 de maio de 2008.

Projeto: “**Avaliação da infecção canina em áreas endêmicas da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Pará**”.

Pesquisador Responsável: EDNA AOBAYASSUI ISHIKAWA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, em sua reunião realizada no dia 15/05/2008, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este CEPAN, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC